

Título: EVOLUTION OF BORAGINACEAE: THE EFFECT OF HOMOPLASY AND PLESIOMORPHY IN SYSTEMATICS AND BIOGEOGRAPHY OF THE SUBFAMILY CYNOGLOSSOIDEAE

Nombre: Otero Gómez, Ana

Universidad: Universidad Rey Juan Carlos

Departamento: Biología y geología, física y química inorgánica

Fecha de lectura: 29/05/2019

Programa de doctorado: Programa de Doctorado en Conservación de Recursos Naturales por la Universidad Rey Juan Carlos

Dirección:

- > **Director:** PABLO LUIS VARGAS GOMEZ
- > **Codirector:** VIRGINIA VALCARCEL NUÑEZ
- > **Codirector:** Pedro Jiménez Mejías

Tribunal:

- > **presidente:** ENRIQUE RICO HERNÁNDEZ
- > **secretario:** ANA MARÍA MILLANES ROMERO
- > **vocal:** Santiago Martín Bravo
- > **vocal:** MARIA MONTSERRAT MARTÍNEZ ORTEGA
- > **vocal:** Jun Wen

Descriptores:

- > BIOGEOGRAFIA BOTANICA
- > BIOLOGIA MOLECULAR DE PLANTAS
- > TAXONOMIA DE PLANTAS VASCULARES

El fichero de tesis no ha sido incorporado al sistema.

Resumen: ANTECEDENTES

La presente memoria doctoral se centra en una de las familias megadiversas de angiospermas: las Boragináceas. Dentro de esta familia se pone el foco en Cynoglossoideae, la subfamilia con mayor distribución y diversidad de especies y rasgos morfológicos de toda la familia Boraginaceae. En concreto, los tratamientos más recientes reconocen unas 1100 especies distribuidas por todos los continentes (excepto la Antártida). Su diversidad de formas va desde plantas herbáceas de portes minúsculos que no superan unos pocos milímetros (*Microcaryum*) hasta arbustos de cuatro metros (*Trichodesma*) (Weigend et al., 2016). Sus centros de diversidad parecen estar en el este y centro de Asia, aunque también la cuenca del mediterráneo y la Región Irano-Turánica suponen importantes fuentes de diversidad (Weigend et al., 2013). La comprensión de los procesos que dominan la evolución de esta familia, así como su sistemática, suponen una de las grandes lagunas del conocimiento en angiospermas en la botánica moderna de principios del s. XXI.

Tanto la circunscripción de las Boragináceas como su división interna han sido muy controvertidas a lo largo del siglo XX hasta hoy en día (Capítulo 1). Las clasificaciones dentro de Boraginaceae tradicionalmente se han basado en caracteres morfológicos llegando a reconocer desde cuatro hasta trece tribus (De Candolle, 1846; Gürke, 1893; Popov, 1953; Riedl, 1997). Las filogenias moleculares basadas en secuencias nucleares y plastidiales de la familia son más congruentes con los tratamientos sintéticos, y sugieren el reconocimiento de tres subfamilias monofiléticas: Boraginoideae, Echiochileae y Cynoglossoideae (Chacón et al., 2016). Las dos primeras subfamilias están apoyadas además por caracteres únicos (autoapomorfías) de los frutos ,(Långström and Chase, 2002; Hilger, 2014) mientras que la tercera (Cynoglossoideae) ha necesitado de una reorganización constante debido a los numerosos cambios originados recientemente a partir de nuevos resultados morfológicos y moleculares. La última reorganización taxonómica de Cynoglossoideae (Chacón et al., 2016) propone la división de la subfamilia en ocho tribus: Seis de coincidentes con tribus taxonómicas previamente descritas (Asperugeae, Craniospermeae, Cynoglosseae, Myosotideae, Rochelieae y Trichodesmeae) y dos tribus descritas por primera vez (Lasiocaryeae y Omphalodeae). Cynoglosseae es la tribu más grande (ca. 550 especies) y está subdividido a su vez en cuatro subtribus (Amsinckiinae, Bothriosperminae, Cynoglossinae y Microulinae) que agrupan entre otros muchos géneros a *Cynoglossum* y sus ζ géneros satélite ζ (p.ej. *Paracaryum*, *Rindera*, *Solenanthus* y *Trachelanthus*), géneros asiáticos cuya posición ha sido incierta (como por ejemplo, *Bothriospermum* y *Microula*), y las especies previamente consideradas dentro de la subtribu *Cryptanthinae*.

De acuerdo con la última propuesta de clasificación taxonómica en Chacón et al. (2016), Cynoglossoideae contaría con alrededor de 50 géneros y 1100 spp., lo que representa más del 50% de todos los géneros y especies de Boragináceas, con un amplio rango de distribución en zonas templadas de ambos hemisferios. En particular, la tribu Omphalodeae (antiguo género *Omphalodes* con cerca de 28 especies y géneros satélites) destaca por su llamativo patrón de distribución, que constituye una de las disyunciones más espectaculares dentro del mundo de las angiospermas. Esta disyunción abarca Eurasia occidental, Norte y Sudamérica y Zealandia y necesita un estudio profundo. Por otro lado, las especies de Cynoglossoideae medran en una gran variedad de hábitats incluyendo zonas subtropicales de Asia y América del sur, zonas desérticas del norte de África, zonas de altas cumbres o incluso en el Ártico. Desde el punto de vista morfológico, esta subfamilia es muy heterogénea, especialmente en lo que a la variabilidad del fruto se refiere. Las cuatro núculas presentan un amplio rango de formas (redondeadas, reniformes o deltoideas, de sección globosa trígona hasta aplanada) y ornamentaciones en su epidermis (de densamente gloquidiadas a ligeramente papilosas o totalmente lisas, a veces con la presencia de alas a modo de sámara, rectas o incurvas, a su vez lisas o gloquidiadas). Muchas de estas ornamentaciones se han asociado con diferentes especializaciones para la dispersión a corta y larga distancia (Cohen, 2013). Dentro de las especializaciones a la dispersión a larga distancia, los caracteres epizoócoros son los más frecuentes, seguidos de los caracteres anemócoros. Entre los primeros, destacan los gloquidios, apéndices terminados en forma de anzuelos, reforzados con sílice, localizados en diferentes partes de la núcula, y, únicos de Cynoglossoideae dentro las Boragináceas (Selvi et al., 2011). Las núculas con gloquidios predominan tanto en las tribus con más especies de Cynoglossoideae (Rochelieae y Cynoglosseae) como en diferentes linajes poco diversificados a lo largo del árbol de la subfamilia. Además de este tipo de apéndices ubicados en la núcula, hay linajes en los que se encuentran otros apéndices epizoócoros (principalmente pelos uncinados) en los cálices (ej. Amsinckiinae, Myosotideae), como es frecuente en otras Boragináceas. La anemocoria en Cynoglossoideae se acusa por la manifestación de núculas con márgenes que forman amplias alas y que podrían facilitar la dispersión por viento. Las alas se observan en grupos independientes (ej. Omphalodeae, Cynoglosseae). Se ha descrito una tercera especialización de dispersión a

corta distancia en la que se han identificado caracteres mirmecócoros como la aparición de protusiones del mesocarpo a modo de eleosomas (Gorb and Gorb, 2003).

Los últimos estudios filogenéticos (2005-2016) están suponiendo por un lado un gran avance en el conocimiento de las relaciones evolutivas dentro de Boraginaceae, a la vez que están planteando numerosos interrogantes nuevos que afrontar. Entre ellos, el esclarecimiento de las relaciones filogenéticas dentro de alguna de las tribus de Cynoglossoideae, así como de las fuerzas evolutivas que han dado lugar a la gran diversidad de formas y expansión geográfica de esta subfamilia. Por tanto, la confluencia en Cynoglossoideae de numerosos géneros monotípicos de distribución restringida junto con géneros muy ampliamente diversificados y distribuidos, así como la gran variabilidad de los caracteres reproductivos, nos brinda una oportunidad única para estudiar el papel diferencial de factores extrínsecos y/o intrínsecos que subyacen a los procesos evolutivos en grupos taxonómicos complejos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En el árbol de las plantas parece que hay un patrón persistente de parafilia, cuando se baja a escalas filogenéticas más someras la polifilia también es importante, como en Boragináceas. La gran diversidad de hábitats, formas de vida, estrategias reproductivas y especializaciones de dispersión se observa por todos los linajes de la subfamilia Cynoglossoideae sin ningún patrón aparente. Esto revela esquemas de diversificación complejos y contrastantes, que son en parte responsables de la controversia taxonómica que ha afectado a esta subfamilia hasta hace relativamente poco (Chacón et al. 2017). Nosotros hipotetizamos que la evolución de Cynoglossoideae está marcada por una homoplasia generalizada debida a un recurrente cambio evolutivo en la variación morfológica.

Con el propósito de abordar dicha hipótesis, realizamos un estudio integrado por datos moleculares (secuencias de ADN), morfológicos y ecológicos para evaluar el papel de los procesos ecológicos (intrínsecos) y geográficos (extrínsecos) como motores subyacentes a los distintos patrones evolutivos de Cynoglossoideae. La memoria doctoral se compone de cuatro capítulos (capítulos 2 a 5) en los que se tratan los diferentes procesos evolutivos que operan a las diferentes escalas taxonómicas y temporales. En concreto se analizó desde el estudio de los procesos que operan al nivel de grandes linajes (subfamilia, tribu) hasta el nivel interespecífico. Los cuatro objetivos de cada uno de los capítulos centrales son los siguientes:

Objetivo 1. Inferir las relaciones filogenéticas de la subfamilia Cynoglossoideae con el fin de obtener un marco evolutivo sólido sobre el que evaluar nuestra hipótesis general. Es fundamental inferir de manera precisa y robusta las relaciones filogenéticas para acometer las reorganizaciones taxonómicas oportunas y así sentar las bases del marco evolutivo de la subfamilia. Teniendo en cuenta la controversia taxonómica de Cynoglossoideae, esperamos encontrar un patrón homoplásico.

Objetivo 2. Evaluar las principales presiones selectivas que han producido los cambios morfológicos que están actuando a escalas evolutivas profundas en Cynoglossoideae. Con este fin analizamos el papel de las especializaciones del fruto en las tasas de diversificación y patrones geográficos de Cynoglossoideae. Esta subfamilia representa un modelo ideal para investigar los motores evolutivos a escalas profundas teniendo en cuenta el patrón contrastado de distribución y diversificación en el que se encuentran tanto clados cosmopolitas hiperdiversificados como clados poco diversificados y de distribución restringida. Debido a la distribución de la variabilidad morfológica del fruto a lo largo del árbol sin patrón aparente, esperamos que los factores extrínsecos sean los principales motores de la evolución a nivel de subfamilia, como también se ha encontrado

en otras familias de angiospermas.

Objetivo 3. Reconstruir la historia biogeográfica de la tribu Omphalodeae con el objetivo de investigar el papel de los factores intrínsecos y extrínsecos a escalas evolutivas intermedias. Consideramos la tribu Omphalodeae un modelo ideal ya que este grupo está formado por linajes ampliamente distribuidos en tres continentes (Eurasia, América y Oceanía) y con una variedad de especializaciones asociadas con la dispersión. En este caso, también esperamos que sean los factores extrínsecos los principales motores que estén operando a estos niveles evolutivos intermedios.

Objetivo 4. Inferir los patrones de especiación reciente en el género *Iberodes* (*Omphalodes* p.p.). Se analizan datos geográficos junto con datos morfológicos y ecológicos para describir los patrones evolutivos predominantes a escalas evolutivas más bajas. *Iberodes* con tan solo cinco especies, ocupa hábitats muy diferentes (interior frente a costero), rangos de distribución de distintos tamaños (restringido frente a amplio) y manifiesta diferentes rasgos en los frutos (núculas con pelos uncinados, amplios márgenes y/o protusión del mesocarpo). Debido a la variabilidad de hábitats asociada a los patrones de distribución y rasgos morfológicos observados, esperamos que en este nivel sean factores intrínsecos, como caracteres del fruto o capacidad de cambio del nicho ecológico, los que estén determinando la evolución.

METODOLOGÍA

La metodología utilizada ha sido ajustada a cada una de las escalas evolutivas de cada capítulo. Para los cuatro capítulos que constituyen el cuerpo central de la tesis, el primer paso ha sido hacer una toma de muestras vegetales para la posterior extracción de ADN. Se han revisado e identificado en torno a 1600 pliegos pertenecientes a 25 herbarios. Además también se ha analizado el material recolectado en diversas campañas de campo a las Sierras Béticas, Sistema Central, Galicia, Portugal y Costa del Golfo de Vizcaya. De todo este material se seleccionaron 302 muestras para su estudio morfológico y molecular. El esfuerzo de muestreo se realizó siguiendo los siguientes criterios:

- 1) Maximizar la representación taxonómica: Mayor número de géneros o especies dependiendo de la escala evolutiva abordada.
- 2) Maximizar la representación de las distribuciones: Selección de especímenes que en conjunto represente el rango de distribución de los géneros o especies según la escala evolutiva.
- 3) Maximizar la variabilidad morfológica del fruto: Selección de especímenes que en conjunto represente el rango de variación morfológica del fruto de los géneros o especies según la escala evolutiva.

A continuación se procedió a la extracción, amplificación y secuenciación de ADN de las muestras vegetales utilizando Kits de extracción basados en columnas (capítulo 2). Debido a la escasa concentración de ADN en las extracciones obtenidas mediante el kit por columnas usado en el primer trabajo, en los restantes estudios hubo que emplear bromuro de cetil-trimetilamonio (CTAB; capítulos 3-5), como técnica de extracción genómica. Una vez extraído el ADN se procedió a la amplificación a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de las regiones de ADN seleccionadas en cada caso (nucleares y plastidiales) por PCR y secuenciación Sanger (capítulos 2-4). En algunos casos (capítulos 2, 3 y 4) fue necesario el diseño de primers específicos y la realización de PCR anidadas para la correcta amplificación de las regiones de ADN seleccionadas. En total, se obtuvieron 992 secuencias (cuatro regiones de ADN: 3 plastidiales + 1 nuclear). Una vez obtenidas las secuencias, se realizó la revisión y alineamiento de las mismas a través de programas informáticos como Geneious (capítulos 2-4). Por otro lado, para el capítulo 5 se cuantificó la concentración de ADN con el fin de

conseguir altas concentraciones y llevar a cabo protocolo de secuenciación de alta densidad de zonas del ADN asociadas con puntos de restricción (RAD-sequencing). Este procedimiento se llevó a cabo a través del servicio externo Floragenex (Portland, Oregón). Debido a la gran cantidad de datos obtenidos con esta técnica de secuenciación masiva (RAD-seq) se utilizaron paquetes específicos de filtrado, ordenación y alineamiento de los fragmentos obtenidos como el programa Pyrad.

Las diferentes matrices de secuencias alineadas fueron utilizadas para realizar reconstrucciones filogenéticas a través de diferentes algoritmos matemáticos (inferencia bayesiana, MrBayes; máxima verosimilitud, RaxML; capítulos 2-5) así como la datación molecular de las filogenias obtenidas a partir de calibración fósil (BEAST, TreePL; capítulos 3-5). En varios análisis fue difícil alcanzar la convergencia, por lo que hubo que realizar múltiples réplicas y análisis independientes que fueron finalmente combinados para poder obtener unas reconstrucciones robustas. Los Análisis biogeográficos fueron realizados en los capítulos 3 y 4 con el fin de inferir áreas ancestrales y patrones biogeográficos históricos en casa escala evolutiva (Lagrange, BioGeoBears). Asimismo, para estos dos capítulos (3 y 4) se llevaron a cabo análisis de reconstrucción de caracteres ancestrales asociados a síndromes de dispersión (SIMMAP). Para estos análisis (capítulos 3 y 4), así como para los realizados en el capítulo 2, se analizaron frutos a través de Microscopía Electrónica de Barrido y Microscopio Óptico. Además, para el capítulo 3 se implementaron análisis de tasas de diversificación y su correlación con caracteres asociados a la dispersión (BAMM y HiSSE). Para el capítulo 5 se abordaron análisis acordes a la escala evolutiva supraspecífica, como estructura genética (DAPC, AMOVA), morfometría (PCA), solapamiento de nicho bioclimático (ecospat) y reconstrucción de nicho ancestral a través de modelización (Maxent).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Capítulo 2 (Objetivo 1)

Las reconstrucciones filogenéticas realizadas junto con la caracterización morfológica del fruto nos permitió identificar las potenciales bases morfológicas subyacentes la controversia taxonómica de la subfamilia, así como proponer nuevas reorganizaciones taxonómicas encaminadas a una clasificación más natural de las especies del género *Omphalodes*. Tanto los datos moleculares como morfológicos del fruto apoyaron la polifilia de *Omphalodes* en tres linajes independientes, en línea con otras publicaciones que salieron en el transcurso de nuestro estudio. Además, detectamos cómo caracteres descritos en tratamientos taxonómicos previos (inflorescencia, orientación del embrión, ornamentación del polen, entre otros; De Candolle, 1846; Brand, 1921; Popov, 1953; Nazaire and Hufford, 2012; Pereira-Coutinho et al., 2012) apoyan la segregación de dos géneros de nuevo cuño para acomodar a aquellas especies no cercanamente relacionadas al resto de las especies núcleo de *Omphalodes*: *Memoremea* y *Nihon*. A pesar de haber realizado un esfuerzo de muestreo considerable, la reorganización final de *Omphalodes* aún requería de investigaciones adicionales para clarificar las relaciones filogenéticas entre las especies americanas de *Omphalodes*, así como las relaciones de *Nihon* con otros géneros cercanos.

Capítulo 3 (Objetivo 2)

El origen de *Cynoglossoideae* se remonta a principios del Eoceno en la zona del C-NE del Paleártico, desde donde se expandió a ambos hemisferios. Los nueve clados principales de *Cynoglossoideae* presentan patrones diferentes de diversificación e historias biogeográficas, aunque dos de ellos (*Cynoglosseae* y *Rochelieae*) comparten una ventana geográfica y temporal similar; es decir, se ajustan al concepto de congruencia biogeográfica (Vargas et al., 2014). Ninguno de estos patrones está inequívocamente relacionado con frutos con

un síndrome de dispersión a larga distancia en particular. La diversificación in-situ (C-NE paleártico) de dos de los seis clados que presentan gloquidios (*Cynoglossinae* y *Rochelieae*) resultó en un incremento significativo de las tasas de diversificación, los dos mismos grupos que presentan esa congruencia biogeográfica. Por tanto, la presencia per se de gloquidios no explica la expansión de áreas y la especiación. Contrariamente a lo esperado, parece que hay una contribución importante de los factores intrínsecos a esta escala evolutiva profunda dentro de *Cynoglossoideae*, no solo de factores extrínsecos. Nuestros resultados están de hecho en línea con estudios previos que abogan por la importancia del efecto conjunto de múltiples factores, como vectores de dispersión, disponibilidad de hábitat o condiciones climáticas para explicar los eventos históricos de diversificación (Moore and Donoghue, 2007).

Capítulo 4 (Objetivo 3)

Las relaciones filogenéticas que obtuvimos para la tribu *Omphalodeae* son congruentes con los estudios previos (Holstein et al., 2016a; Holstein et al., 2016b) excepto para *Selkirkia* cuya monofilia no resultaba inequívocamente apoyada por nuestras reconstrucciones. La diversificación de la tribu ocurrió durante el Oligoceno tardío en el oeste de la región florística Mediterránea. Posteriormente, la colonización del Nuevo Mundo seguida de una rápida diferenciación tuvo lugar en la transición Oligoceno-Mioceno, como ya se conoce para en otros grupos de angiospermas (Wen and Ickert-Bond, 2009). Por el contrario, la colonización de islas remotas (islas Chatham, Nueva Zelanda; archipiélago Juan Fernández, Chile) tuvo lugar en tiempos más recientes durante el principio del Plioceno. Las dispersiones a larga distancia presentan una fuerte señal filogenética para la colonización de territorios distantes (madrea-tetano, anfitropical y transpacífico), de manera congruente con otras subfamilias de *Boraginaceae* o incluso similar a otras familias de *Boraginales* (Luebert et al., 2017). Se observan diferencias temporales considerables en las tasas de diversificación dentro de cada clado, debido a las diferentes historias biogeográficas de cada linaje. De nuevo, observamos un efecto conjunto de factores intrínsecos y extrínsecos en la dinámica evolutiva del grupo.

Capítulo 5 (Objetivo 4)

La edad de diversificación para la mayoría de linajes de *Iberodes* tuvo lugar después del establecimiento del clima Mediterráneo como ocurre en muchos de los linajes que actualmente forman la flora de la cuenca mediterránea (Vargas et al., 2018). Las técnicas de RAD-seq dan como resultado robustas reconstrucciones filogenéticas que revelan un patrón de parafilia predominante en la evolución de *Iberodes*. Además, la combinación de estas filogenias con análisis morfométricos y de modelización de nicho se postula como el mejor planteamiento para reconstruir empíricamente eventos de especiación reciente. La clara diferenciación morfológica y ecológica dentro del clado *Linifolia* revelan la importancia de los procesos de especiación derivados de una especie ancestral no extinta y refuerzan la consideración de las especies parafiléticas como unidades naturales en la clasificación taxonómica (Hörandl and Stuessy, 2010). Además, la diferente contribución de factores tanto intrínsecos (cambios en el nicho bioclimático) como extrínsecos (aislamiento espacial) juegan un papel relevante en los eventos alopátridos y parapátridos observados en *Iberodes*.

Discusión general

La evolución de la subfamilia *Cynoglossoideae* muestra parafilia y polifilia generalizadas a todos los niveles del árbol. Esta situación nos permite investigar los fundamentos de estos patrones. Un patrón parafilético continuado en el tiempo es conocido a lo largo del árbol de la vida a diferentes niveles taxonómicos (Donoghue, 2005). En *Cynoglossoideae* este patrón se encuentra reflejado desde el nivel de subfamilia (capítulos 2, 3, 4)

hasta los estadíos más tempranos de especiación (capítulo 5). La ausencia de monofilia puede ser el resultado o bien de una retención de un carácter plesiomórfico y pérdidas sucesivas del mismo, o bien, la aparición independiente de caracteres homoplásicos. Estos patrones de poli- y parafilia en Boraginaceae fueron inicialmente interpretados como la predominancia de la homoplasia en los caracteres usados en taxonomía (Weigend et al., 2013; Chacón et al., 2016). La investigación de estos casos de presunta homoplasia en la presente tesis nos ha permitido desentrañar los fundamentos evolutivos de los caracteres morfológicos implicados. En nuestro caso, encontramos dos caracteres morfológicos únicos de Cynoglossoideae y presentes en diferentes linajes a lo largo del árbol, que parecen estar implicados en la ausencia de monofilia: los gloquidios y el margen alado de las núculas. Contrariamente a lo esperado en estudios previos (Weigend et al., 2013), la aparición de gloquidios se infiere como estado ancestral de la subfamilia, por lo que los patrones polifiléticos observados serían explicados por una plesiomorfía y posteriores pérdidas independientes del carácter. Además, inferimos una posición ancestral de los gloquidios en la cara abaxial de la núcula (tanto en el margen como en el disco) frente a la aparición de gloquidios en ambas caras (abaxial y adaxial) que aparece de manera derivada en las núculas globosas del tipo *Cynoglossum*. No obstante, los gloquidios (relacionados con la especialización epizoócora) parecen influir igualmente en los incrementos de las tasas de diversificación de los grupos Rochelieae y Cynoglossinae (Capítulo 3) pese a que cada grupo tiene una disposición diferente de los gloquidios en las núculas (Capítulo 6). En el caso del carácter de margen alado, la polifilia observada se explica por homoplasia. En particular, aunque la funcionalidad de especialización anemócora se mantiene para los dos tipos de alas (abierto e involuto), en el caso de las alas involutas puede producirse una protrusión del mesocarpo que forma un eleosoma relacionado con la dispersión por hormigas (mirmecocoria). La compresión dorsoventral de la núcula y con ello la distinción de una cara abaxial y adaxial es una autapomorfía de Cynoglossoideae que contrasta con las núculas indiferenciadas del resto de Boragináceas. Además, esta condición viene acompañada por una elevación de la ginobase (de ancestral plana a derivada piramidal). Ambas circunstancias parecen haber producido una mayor exposición de la núcula fuera del cáliz y por tanto la posibilidad de diversificar la ornamentación de la núcula con repercusiones funcionales en la dispersión. Además de explorar las cuasas que subyacen a la ausencia de monofilia, hemos podido evaluar el papel de los factores bióticos (intrínsecos) y abióticos (extrínsecos) que operan en los patrones de especiación a diferentes escalas. Comúnmente se ha sugerido que los factores bióticos transforman la diversidad a escalas geográficas locales, mientras que los factores abióticos son más influyentes a escalas regionales y globales (Benton, 2009). Sin embargo, lo que en realidad detectamos a niveles evolutivos profundos son aquellos patrones que han dejado huella con el paso del tiempo. En realidad, ambos factores bióticos y abióticos están actuando en todas las escalas filogenéticas con el componente añadido del tiempo para aquellos niveles más profundos (Vargas et al., 2018). En nuestro caso hemos detectado que algunos factores bióticos, como ciertos caracteres del fruto, han influido a escalas profundas e intermedias (subfamilia, tribu), así como algunos factores abióticos, como el clima y la geografía, están actuando a escalas más someras (supraespecífica). En cualquier caso, nuestros resultados están reflejando la importancia del efecto conjunto de múltiples factores incluyendo la gran incidencia de la contingencia histórica, para explicar los patrones biogeográficos y de diversificación observados, en consonancia con estudios previos (Moore and Donoghue, 2007; Donoghue and Sanderson, 2015). A nivel de subfamilia, la adquisición o pérdida de gloquidios no explica por sí misma el total de la variación en las tasas de diversificación de Cynoglossoideae. De otro modo, los gloquidios parecen estar relacionados con las dispersiones transoceánicas nivel de tribu Omphalodeae a diferencia de un papel biogeográfico no esencial en las etapas tempranas de diversificación de la subfamilia. Finalmente, encontramos una interacción entre factores como el clima y la geografía y la habilidad para adaptarse a nuevos ambientes en el caso de la

diferenciación de los linajes de Iberodes.

HIPÓTESIS Y CONCLUSIONES

Los análisis realizados han permitido responder la hipótesis general inicialmente planteada: la evolución de Cynoglossoideae está marcada por una homoplasia generalizada debida a un recurrente cambio evolutivo en la variación morfológica. En este estudio se han identificado caracteres homoplásicos (e.g. ala ancha y abierta de las núculas) junto con plesiomórficos (e. g. gloquidios) subyacentes a la organización tradicional de Boraginaceae en grupos poli- y parafiléticos.

- 1.El análisis de 237 número de especies (c. 20% del total de especies de Cynoglossoideae, 1600 especímenes) y 47 géneros (94% del total de géneros de Cynoglossoideae) procedentes de 25 herbarios y numerosas campañas de recolección de campo nos ha permitido identificar los principales caracteres del fruto que son causantes de la falta de monofilia dentro de Cynoglossoideae.
- 2.Tanto la filogenia molecular como las diferencias morfológicas encontradas en la núcula revelan la polifilia de Omphalodes en tres linajes independientes. Con el fin de resolver esta polifilia y con ello proponer una clasificación más natural nivel de género, se describen los géneros Memoremea y Nihon.
- 3.La diferenciación dorsoventral en las núculas de Cynoglossoideae facilitó la diversificación de las ornamentaciones en la cara abaxial (incluidos gloquidios y margen alado).
- 4.Los caracteres epizoócoros que residen en los cálices Boraginaceae pasan a desarrollarse principalmente en las núculas en Cynoglossoideae.
- 5.Los gloquidios son plesiomórficos en Cynoglossoideae y únicos entre las Boragináceas.
- 6.La núcula alada es homoplásica, adquiriéndose de manera independiente en diferentes momentos de la evolución reciente de Cynoglossoideae.
- 7.El centro-noreste del Paleártico es el área ancestral de la subfamilia Cynoglossoideae entre el Eoceno temprano y el Mioceno. Un gran número de eventos de dispersión a larga distancia tuvieron lugar en la mayor parte de clados de la subfamilia del Mioceno en adelante, y resultó en una exitosa expansión de Cynoglossoideae en otros continentes.
- 8.No se encuentra una asociación inequívoca entre ciertos síndromes de dispersión a larga distancia y la distribución de los clados de Cynoglossoideae.
- 9.Los nueve clados que conforman Cynoglossoideae tienen una gran variedad de patrones de diversificación y expansión del rango de distribución. No obstante, dos clados (Rochelieae y Cynoglossinae) son congruentes con el concepto de ¿congruencia biogeográfica¿.
- 10.Dos incrementos significativos de las tasas de diversificación han sido inferidos únicamente en dos de los seis clados que presentan núculas con gloquidios (Rochelieae y Cynoglossinae), indicando que la presencia de gloquidios por sí sola no es responsable del patrón observado. Factores adicionales como vectores de dispersión, disponibilidad de hábitat o condiciones climáticas históricas son necesarios para explicar los eventos de diversificación.
- 11.Una serie de eventos biogeográficos conforman la compleja historia de la tribu Omphalodeae: (1) el origen de la tribu se infiere en el oeste del Mediterráneo durante el Oligoceno tardío; (2) se produce un impasse de diversificación en los dos géneros mediterráneos (Iberodes y Omphalodes) hasta tiempos más recientes (Plioceno); (3) la colonización y diferenciación de linajes de Omphalodeae en el Nuevo Mundo tuvo lugar en la frontera entre el Oligoceno y el Mioceno; y (4) en tiempos más recientes (frontera entre el Mioceno y el Plioceno) tuvo lugar la colonización de islas remotas (Islas Chatham y Archipiélago Juan Fernández).

12. Los caracteres epizoócoros son ancestrales en la mayor parte de clados de Omphalodeae. Estos caracteres parecen estar involucrados en las colonizaciones entre los tres pares de masas continentales (desde Europa a Norteamérica, de Norte- a Sudamérica, y de Sudamérica a Zealandia).
13. Las edades de diversificación de la mayor parte de linajes de *Iberodes* son posteriores al establecimiento del clima Mediterráneo durante el Plioceno-Pleistoceno. El patrón parafilético es el predominante en la especiación dentro de *Iberodes*.
14. La evidente diferenciación ecológica y morfológica dentro del clado *Linifolia* indica la importancia de procesos de especiación derivados de especies progenitoras vivas, y refuerza la idea de considerar las especies parafiléticas como unidades naturales de clasificación taxonómica.
15. Tanto los cambios de nicho bioclimático como el aislamiento geográfico parecen estar implicados en los eventos de parapatria y alopatria que subyacen a la especiación parafilética de *Iberodes*.
16. La especiación parapátrida en el clado *Linifolia* ha sido promovida por el cambio de nicho bioclimático en áreas periféricas de *I. linifolia* del oeste de Portugal y su posterior aislamiento reproductivo, y ciertas poblaciones han dado lugar al ancestro de las especies *I. kuzinskyana* e *I. littoralis*.
17. A su vez, la diferenciación alopátrida en el clado *Linifolia*, tanto en el caso de la especiación de *I. kuzinskyana* e *I. littoralis* como en la diferenciación de *I. littoralis* ssp. *gallaecica* e *I. littoralis* ssp. *littoralis*, debió comenzar con un primer aislamiento geográfico y un posterior cambio de nicho.
18. Algunos factores bióticos como ciertos caracteres del fruto han jugado un papel importante en procesos evolutivos a escalas profundas (subfamilia) e intermedias (tribu), y algunos factores abióticos como las condiciones climáticas y espaciales (geografía) han influido en escalas evolutivas someras (género y especie). De manera más importante, el efecto conjunto de ambos tipos de factores unido a la contingencia de cada clado y linaje han sido claves a todas las escalas evolutivas.

REFERENCIAS

- Benton, M. J. 2009. The Red Queen and the Court Jester: species diversity and the role of biotic and abiotic factors through time. *Science* 323: 728-732.
- Brand, A. 1921. Boraginaceae-Borraginoideae Cynoglosseae. In A. Engler [ed.], *Das Pflanzenreich*, 114-153. Engelmann, Leipzig.
- Chacón, J., F. Luebert, and M. Weigend. 2017. Biogeographic events are not correlated with diaspore dispersal modes in Boraginaceae. *Frontiers in Ecology and Evolution* 10.3389/fevo.2017.00026 DOI.
- Chacón, J., F. Luebert, H. H. Hilger, S. Ovchinnikova, F. Selvi, L. Cecchi, C. M. Williams, et al. 2016. The borage family (Boraginaceae s. str.): A revised infrafamilial classification based on new phylogenetic evidence, with emphasis on the placement of some enigmatic genera on the placement of some enigmatic genera. *Taxon* 65: 523-546.
- Chase, M. W., M. Christenhusz, M. Fay, J. Byng, W. S. Judd, D. Soltis, D. Mabberley, et al. 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society* 181: 1-20.
- Cohen, J. I. 2013. A phylogenetic analysis of morphological and molecular characters of Boraginaceae: evolutionary relationships, taxonomy, and patterns of character evolution. *Cladistics* 30: 1-31.
- De Candolle, A. P. 1846. *Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis*. Victoris Masson, Paris.
- Donoghue, M. J. 2005. Key innovations, convergence, and success: macroevolutionary lessons from plant phylogeny. *Paleobiology* 31: 77-93.
- Donoghue, M. J., and M. J. Sanderson. 2015. Confluence, synnovation, and depauperons in plant diversification. *New Phytologist* 207: 260-274.

- Gorb, E., and S. Gorb. 2003. Seed dispersal by ants in a deciduous forest ecosystem: mechanisms, strategies, adaptations.
- Gürke, M. 1893. Boraginaceae (Asperifoliaceae). In A. Engler AND K. Prantl [eds.], Die Natürlichen Pflanzenfamilien, 71-131. W. Engelmann, Leipzig.
- Hilger, H. H. 2014. Ontogeny, morphology, and systematic significance of glochidiate and winged fruits of Cynoglosseae and Eritrichieae (Boraginaceae). *Plant Diversity and Evolution* 131: 167-214.
- Holstein, N., J. Chacón, H. H. Hilger, and M. Weigend. 2016a. No longer shipwrecked: *Selkirkia* (Boraginaceae) back on the mainland with generic rearrangements in South American *Omphalodes* based on molecular data. *Phytotaxa* 270: 231-251.
- Holstein, N., J. Chacón, A. Otero, P. Jiménez-Mejías, and M. Weigend. 2016b. Towards a monophyletic *Omphalodes* or an expansion of North American *Mimophytum*. *Phytotaxa* 288: 131-144.
- Hörandl, E., and T. F. Stuessy. 2010. Paraphyletic groups as natural units of biological classification. *Taxon* 59: 1641-1653.
- Långström, E., and M. W. Chase. 2002. Tribes of Boraginoideae (Boraginaceae) and placement of *Antiphytum*, *Echiochilon*, *Ogastemma* and *Sericostoma*: A phylogenetic analysis based on atp B plastid DNA sequence data. *Plant Systematics and Evolution* 234: 137-153.
- Luebert, F., T. L. P. Couvreur, M. Gottschling, H. H. Hilger, J. S. Miller, and M. Weigend. 2017. Historical biogeography of Boraginales: West Gondwanan vicariance followed by long-distance dispersal? *Journal of Biogeography* 44: 158-169.
- Luebert, F., L. Cecchi, M. W. Frohlich, M. Gottschling, C. M. Williams, K. E. Hasenstab-Lehman, H. H. Hilger, et al. 2016. Familial classification of the Boraginales. *Taxon* 65: 502-522.
- Moore, B. R., and M. J. Donoghue. 2007. Correlates of Diversification in the Plant Clade Dipsacales : Geographic Movement and Evolutionary Innovations. *The American naturalist* 170: S28-S55.
- Nazaire, M., and L. Hufford. 2012. A broad phylogenetic analysis of Boraginaceae: implications for the relationships of *Mertensia*. *Systematic Botany* 37: 758-783.
- Pereira-Coutinho, A., S. Castro, R. Carbajal, S. Ortiz, and M. Serrano. 2012. Pollen morphology of the genus *Omphalodes* Mill. (Cynoglosseae, Boraginaceae). *Grana* 51: 194-205.
- Popov, M. G. 1953. Boraginaceae. In S. B. K. [ed.], *Flora SSSR*, vol. 19, 97-718. Izdatel'stvo Akademii Nauk SSSR, Moskva-Leningrad.
- Riedl, H. 1997. Boraginaceae. In C. Kalkman, D. W. Kirkup, H. P. Nootboom, P. F. Stevens, AND W. J. J. O. de Wilde [eds.], *Flora Malesiana*, vol. 13, Seed Plants, 43-144. Rijksherbarium/Hortus Botanicus, Leiden.
- Selvi, F., A. Coppi, and L. Cecchi. 2011. High epizoochorous specialization and low DNA sequence divergence in mediterranean *Cynoglossum* (Boraginaceae): Evidence from fruit traits and ITS region. *Taxon* 60: 969-985.
- Vargas, P., M. Fernández-Mazuecos, and R. Heleno. 2018. Phylogenetic evidence for a Miocene origin of Mediterranean lineages: species diversity, reproductive traits and geographical isolation. *Plant Biology* 20: 157-165.
- Vargas, P., L. M. Valente, J. L. Blanco-Pastor, I. Liberal, B. Guzmán, E. Cano, A. Forrest, and M. Fernández-Mazuecos. 2014. Testing the biogeographical congruence of palaeofloras using molecular phylogenetics: Snapdragons and the Madrean-Tethyan flora. *Journal of Biogeography* 41: 932-943.
- Weigend, M., F. Selvi, D. Thomas, and H. Hilger. 2016. Boraginaceae. In J. W. Kadereit AND V. Bittrich [eds.], *Flowering Plants. Eudicots*, vol. 14, 41-102. Springer, Hamburg, Germany.
- Weigend, M., F. Luebert, F. Selvi, G. Brokamp, and H. H. Hilger. 2013. Multiple origins for Hound's tongues (*Cynoglossum* L.) and Navel seeds (*Omphalodes* Mill.) - The phylogeny of the borage family (Boraginaceae

s.str.). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 68: 604-618.

Wen, J., and S. M. Ickert-Bond. 2009. Evolution of the Madrean-Tethyan disjunctions and the North and South American amphitropical disjunctions in plants. *Journal of Systematics and Evolution* 47: 331-348.