Hutchinson (Agavales) vs. Huber y Dahlgren (Asparagales): análisis moleculares sobre la filogenia y evolución de la familia Agavaceae *sensu* Hutchinson dentro de las monocotiledóneas

LUIS E. EGUIARTE

Departamento de Ecología Evolutiva, Centro de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México,
Apartado Postal 70-275, C.P. 04510, D.F., México.

Resumen: Para explorar diferentes ideas sobre la filogenia de las monocotiledóneas, y en particular sobre las Agavaceae *sensu* Hutchinson (1934, 1959) y su relación con grupos emparentados dentro de las Asparagales, se analizó la secuencia de ADN del gen del cloroplasto *rbcL* para 134 especies (118 monocotiledóneas, empleando 16 dicotiledóneas paleohierbas como grupo externo). Se llevaron a cabo análisis de parsimonia utilizando métodos de distancia (neighbor-joining y UPGMA) y de máxima verosimilitud. Las filogenias muestran que *Acorus calamus* es la representante actual más cercana a las monocotiledóneas ancestrales. Los diferentes análisis identifican tres principales linajes evolutivos en las Agavaceae *sensu* Hutchinson: 1) El de las Agavaceae *sensu stricto* (*Agave*, *Manfreda*, *Beschorneria*, *Hesperaloë* y *Yucca*), *Hosta* (Funkiaceae) y *Chlorophytum* (Anthericaceae). 2) El grupo que incluye a las Nolinaceae (*Nolina*, *Beaucarnea* y *Dasyllirion*), a *Sansevieria* (Dracaenaceae) y a *Danae* (Ruscaceae). 3) El formado por las Asphodelaceae (*Aloë*, *Haworthia* y *Kniphofia*) y *Dianella* (Phormiaceae). Estos linajes contienen a la mayoría de las Asparagales tal como fueron definidas por Huber (1969) y Dahlgren *et al.* (1985). También se estimó un reloj molecular para obtener las fechas de divergencia entre los grupos relacionados con las Agavaceae. Se calculó una tasa de 0.34×10^{-9} sustituciones nucleotídicas por sitio por año. Usando esta calibración se obtuvo un tiempo para el origen de las Agavaceae verdaderas (separación de Agavaceae-*Hosta*) de cerca de 14 millones de años, para la separación Agavaceae-Nolinaceae de hace unos 47 millones de años y para el origen de las Asparagales + Iridaceae + Cyanastraceae unos 84 millones de años. Sin embargo, estas estimaciones deben ser tomadas como preliminares.

Palabras clave: Agavaceae, Nolinaceae, filogenia, *rbcL*, monocotiledóneas, reloj molecular, evolución molecular.

Abstract: To explore different ideas in relation to the phylogeny of the monocotyledons, in particular about the Agavaceae *sensu* Hutchinson (1934, 1959) and their relationships with related groups of the Asparagales, the DNA sequence of the chloroplast gene *rbcL* for 134 species (118 monocotyledons, 16 dicotyledon paleoherbs as an outgroup) was analyzed. Parsimony, distance (neighbor-joining and UPGMA) and maximum likelihood analyses were performed. The phylogenies show that *Acorus calamus* is the living plant more closely related to the ancestral monocotyledons. The different analyses identify three main evolutionary lineages in the Agavaceae *sensu* Hutchinson: 1) One including the Agavaceae *sensu stricto*, (*Agave*, *Manfreda*, *Beschorneria*, *Hesperaloë* and *Yucca*) with *Hosta* (Funkiaceae) and *Chlorophytum* (Anthericaceae). 2) Other group that includes the Nolinaceae (*Nolina*, *Beaucarnea* and *Dasyllirion*), *Sansevieria* (Dracaenaceae) and *Danae* (Ruscaceae). 3) A third group formed by the Asphodelaceae (*Aloë*, *Haworthia* and *Kniphofia*) and *Dianella* (Phormiaceae). These lineages include the majority of the Asparagales, as were defined by Huber (1969) and Dahlgren *et al.* (1985). A molecular clock was also estimated to obtain the divergence times among the groups related to the Agavaceae. A rate of 0.34×10^{-9} nucleotide substitutions per site per year was obtained. Using this calibration, a date for the origin of the true Agavaceae (separation between Agavaceae-*Hosta*) was estimated to be about 14 million years, for the separation of the Agavaceae-Nolinaceae of about 47 million years and for the origin of the Asparagales + Iridaceae + Cyanastraceae of about 84 million years. Nevertheless, these estimates should be regarded as preliminary.

Key words: Agavaceae, Nolinaceae, phylogeny, *rbcL*, monocotyledons, molecular clock, molecular evolution.

INTRODUCCIÓN

Las monocotiledóneas actuales representan alrededor de 61,555 especies (2,744 géneros y 103 familias; Dahlgren *et al.*, 1985), en comparación con las cerca de 176,075 especies de dicotiledóneas (9,825 géneros y 354 familias; Thorne, 1992). Sin embargo, a pesar de que las monocotiledóneas son tan abundantes, se sabe relativamente poco sobre su evolución (Eguiarte, en prensa). Por una parte, esto se debe a que las monocotiledóneas presentan altos grados de convergencia morfológica (Dahlgren *et al.*, 1985). Por ejemplo los agaves y yucas, nolináceas, bromeliáceas, aloes, xantorroas,

dracenas, sansevierias, etc., crecen en lugares relativamente áridos similares en diferentes partes del mundo, y sus morfologías llegan a ser muy parecidas. Por otra, la mayoría de las monocotiledóneas son hierbas (más del 90% de las especies), por lo que existen pocos restos fósiles.

En este artículo se analiza la ubicación de las Agavaceae *sensu lato* dentro de las monocotiledóneas. Las Agavaceae representan uno de los grupos que han generado más controversia y sobre los cuales se ha discutido mucho su posición y estatus sistemático. Los sistemas Englerianos (Bentham y Hooker, 1883; Pax y Hoffman, 1930; Krause, 1930) clasifican a las Agaváceas *sensu lato* en dos familias diferentes:

Hutchinson, 1959

Dahlgren *et al.*, 1985

Orden Agavales

Orden Asparagales

Familia Xanthorrhoeaceae

Géneros:

Baxteria
Calectasia
Xanthorrhoea
Chamaexeros
Acanthocarpus
Dasypogon
Lomandra
Kingia

Familia Agavaceae

Tribus

Yuccaeae

Hesperaloe
Clistoyucca
Yucca
Samuela

Dracaenae

Cordyline
Cohnia
Dracaena
Sansevieria

Phormieae

Phormium

Nolinae

Nolina
Calibanus
Dasyllirion

Agavae

Agave
Furcraea
Beschorneria
Doryanthes

Polyantheae

Polianthes
Prochnyanthes
Pseudobravia

Familias:

Philesaciae
Luzuriagaceae
Convallariaceae
Asparagaceae
Ruscaceae
Herreriaceae
Dracaenaceae
Nolinaceae
Asteliaceae
Hanguanaceae
Dasypogonaceae
Calectasiaceae
Blandfordiaceae
Xanthorrhoeaceae
Agavaceae
Hypoxidaceae
Tecophilaeaceae
Cyanastraceae
Eriospermaceae
Ixioliriaceae
Phormiaceae
Doryanthaceae
Hemerocallidaceae
Asphodelaceae
Anthericaceae
Aphyllanthaceae
Funkiaceae
Hyacinthaceae
Alliaceae
Amaryllidaceae

Fig. 1. Las Agavales de Hutchinson (1959) y las Asparagales de Dahlgren *et al.* (1985); se muestra las relaciones entre ambas propuestas.

a) Amaryllidaceae, donde incluyen a *Agave* y géneros emparentados, por sus ovarios ínferos.

b) Liliaceae, que incluye a *Yucca* y géneros cercanos, por sus ovarios súperos.

Aunque la familia Agavaceae fue descrita en 1841 por Endlicher (incluyendo fundamentalmente a *Furcraea* y *Agave*), sus ideas tuvieron poco eco en la comunidad botánica, y no fue sino hasta 1934, año en que Hutchinson la vuelve a proponer (incluyendo 19 géneros, ver Fig. 1), cuando adquiere popularidad. Hutchinson (1959) también propuso el orden Agavales, formado por las familias Xanthorrhoeaceae y Agavaceae (Fig. 1). Las ideas de este autor han sido bastante populares entre los botánicos que trabajan en México (Reko, 1946; Gómez-Pompa *et al.*, 1971; Gentry, 1972, etc.), sin embargo, en la comunidad botánica no existe consenso. Por ejemplo, la familia ha sido rechazada por McVaugh (1989), mientras que otros autores han tomado las ideas de Hutchinson con pocas o sin modificaciones (por ejemplo, Cronquist, 1981). Algunos botánicos han dividido a sus Agavaceae en otras familias (Takhtajan, 1980; Dahlgren *et al.*, 1985). En concreto, Dahlgren *et al.* (1985), dividen a las Agavaceae *sensu* Hutchinson en seis familias dentro de su orden Asparagales, el cual tiene en total 30 familias (Fig. 1). El orden Asparagales fue propuesto por Huber (1969) basándose principalmente en la estructura y composición de la semilla (presencia de fitomelanina, estructura de la testa y el endospermo y el tamaño y forma del embrión), para incluir (en esa propuesta inicial) un total de 33 familias.

En este trabajo se analiza la posición y relaciones filogenéticas de diferentes géneros emparentados con la familia Agavaceae, tal como fue descrita originalmente por Hutchinson (1934, 1959) dentro de las monocotiledóneas, los análisis están basados en el gen *rbcL* del cloroplasto. En términos generales, se utiliza la terminología del sistema de Dahlgren *et al.* (1985), excepto que se cambió la terminación «-iflorae» de los superórdenes, por «-anae» siguiendo las sugerencias de Thorne (1992) Chase *et al.* (1993) y Duvall *et al.* (1993b), que la consideran más apropiada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis filogenéticos. Para estos análisis se utilizó un total de 134 secuencias: 118 de monocotiledóneas, y como grupo externo (outgroup) 16 dicotiledóneas («paleohierbas», ver Chase *et al.*, 1993), debido a que en estudios previos se había demostrado que ese grupo de dicotiledóneas era el más cercano a las monocotiledóneas (ver Hamby y Zimmer, 1992; Chase *et al.*, 1993; Duvall *et al.*, 1993a y b), y por lo tanto representaban el grupo externo adecuado. Los datos sobre estas secuencias (especie, familia, método de secuenciación, autor, etc.) se encuentran en los apéndices del Ann. Missouri Bot. Gard. 80: 767-785, en Duvall *et al.* (1993a) y en Eguiarte *et al.* (1994). Estas secuencias fueron analizadas con los métodos de UPGMA y de neighbor-joining (NJ), a partir de una matriz de distancias evolutivas

calculada con el método de «dos parámetros» de Kimura (1981), utilizando el programa Phylip 3.5c para Macintosh de Felsenstein (1993) en una Quadra800. Asimismo, se realizó la búsqueda del conjunto de árboles más parsimoniosos mediante estrategias de búsqueda heurística NNI (nearest-neighbor interchanges, ver Swofford y Olsen, 1990) con el programa PAUP 3.0s (Swofford, 1991). También, para un juego de nueve especies relacionadas con las Agavaceae *sensu stricto*, se llevó a cabo un análisis de máxima verosimilitud (maximum likelihood, Felsenstein, 1981) usando el programa DNAML del Phylip 3.5 de Felsenstein (1993).

Estimación de un reloj molecular. Para tener una idea de los tiempos en que surgieron las Agavaceae *sensu stricto* y cuándo se separaron de los otros grupos con los cuales están supuestamente relacionadas, se aproximó un reloj molecular. Para esto se estimó la tasa de sustitución promedio a partir de la comparación de la *K* (número de sustituciones estimadas con el método de Kimura (1981) de dos parámetros para pares de especies) promedio entre nueve paleohierbas y 118 monocotiledóneas, considerando que ambos grupos se separaron hace unos 150 millones de años (ver Dahlgren *et al.*, 1985 y Eguiarte, en prensa). Mediante estos valores se ajustó un eje de tiempo en una reconstrucción filogenética empleando el algoritmo UPGMA para 28 especies cercanas a las Asparagales *sensu* Dahlgren *et al.* (1985), usando también la distancia de dos parámetros de Kimura, todo calculado con el programa Phylip, versión, 3.5 (Felsenstein, 1993). También se aproximó un reloj molecular utilizando varias estimaciones contrastantes de las tasas de sustitución por sitio por año en cloroplasto para las angiospermas (Zurawski y Clegg, 1987, Wilson *et al.*, 1990; Clegg *et al.*, 1991; Eguiarte, en prensa).

RESULTADOS

134 especies. El primer análisis de reconstrucción filogenética, obtenido por el método de UPGMA, resulta muy distorsionado por la gran heterogeneidad en las tasas de sustitución en el gen *rbcL* (Gaut *et al.*, 1992; Bousquets *et al.*, 1992; Eguiarte *et al.*, 1994) al unir en la base a los grupos con tasas de sustitución más altas (por ejemplo, algunas dicotiledóneas con los pastos, etc.); debido a esto, se consideró que no valía la pena mostrar dicha reconstrucción. Sin embargo, el otro método de distancia, el NJ, es más resistente a las heterogeneidades (Hillis *et al.*, 1994), y es congruente con árboles equivalentes obtenidos por parsimonia y máxima verosimilitud para menos especies, empleando la secuencia de *rbcL* por Duvall *et al.* (1993a y b). La reconstrucción filogenética obtenida con el método de NJ se muestra en la Fig. 2 y uno de 7,200 árboles igualmente parsimoniosos obtenidos se ilustra en la Fig. 3. A partir de ambos árboles se puede señalar que los principales grupos de monocotiledóneas son:

1. *Acorus calamus*, que aparece en la base, y como hemos señalado (Duvall *et al.*, 1993a; Eguiarte, en prensa) parece ser el pariente vivo más cercano a las monocotiledóneas ancestrales.

Fig. 2. Análisis de distancia por el método de neighbor-joining, empleando las distancias obtenidas con el modelo de dos parámetros de Kimura (1981) para 118 monocotiledóneas y 16 especies de paleoherbas como grupo externo.

Fig. 3. Árbol tomado al azar de los 7,200 igualmente parsimoniosos (largo = 4,190 pasos, Índice de Consistencia = 0.288, Índice de Retención = 0.634) para 118 especies de monocotiledóneas y 16 especies de paleohierbas como grupo externo. Los números indican el número de pasos (substituciones).

2. El siguiente grupo más primitivo es el formado por las alismatáceas, potamogetonáceas y las aráceas verdaderas (sin *Acorus*).
  3. El grupo de las Liliales verdaderas es un grupo independiente y bastante primitivo.
  4. Otro grupo natural y primitivo es el formado por las Pandanaceae, Cyclanthaceae y Velloziaceae.
  5. Nuestro grupo de interés, donde aparecen todas las Agavaceas *sensu* Hutchinson, que corresponde en términos generales a las Asparagales de Huber (1969) y Dahlgren *et al.* (1985), aparece como el más emparentado con las iridáceas y con las orquidáceas.
  6. El grupo de las palmas (Arecaceae), que no está emparentado cercanamente con ningún otro grupo.
  7. El grupo de las Zingiberales.
  8. Un gran grupo formado por Bromeliaceae, Commelinaceae, Cyperales, Poales y Typhales.
- Sobre las Agaváceas *sensu* Hutchinson se pueden apreciar varios cladogramas (Figs. 2 y 3):
1. El formado por Agavaceae *sensu* Dahlgren *et al.* (1985), junto con *Hosta* (Funkiaceae) y *Chlorophytum* (Anthericaceae).
  2. Las Nolinaceae *sensu* Dahlgren *et al.* (1985) asociadas con *Sansevieria* (Dracunculaceae) y con *Danae* (Ruscaceae).
  3. *Dianella*, pariente de *Phormium* (otra Agavaceae según Hutchinson, 1959), resulta asociada a los parientes del *Aloë* (Asphodelaceae), a *Xanthorrhoea* (Xanthorrhoeaceae), y a *Hemerocallis* (Hemerocallidaceae). La posición de *Xanthorrhoea* es interesante, ya que Hutchinson (1959) incluye a esta familia, junto con las Agavaceae, para formar el orden Agavales.
- Análisis de máxima verosimilitud.* Este análisis, aunque se considera el más poderoso para la reconstrucción filogenética (Duvall *et al.*, 1993a y b), requiere mucho tiempo de computadora, por lo que no se pudo realizar con todas las secuencias; sin embargo, usando un juego de datos menor y el programa DNAML del Phylip (Felsenstein, 1993), se obtuvo este análisis para mostrar, de manera más clara, las relaciones entre las diferentes Agaváceas *sensu stricto* (la representación se dejó en forma de red, o sea, como árbol sin raíz, para que se pudiera apreciar mejor el largo de las ramas, que corresponden al número de sustituciones nucleotídicas, Fig. 4). En relación con esta reconstrucción filogenética se puede indicar que:
1. *Chlorophytum* y *Hosta* aparecen en la base de las Agavaceae *sensu stricto*.
  2. *Yucca* sería la Agavaceae *sensu stricto* más primitiva.
  3. *Agave* y *Manfreda* son grupos hermanos y terminales dentro de Agavaceae *sensu stricto*.

CUADRO 1. Tiempos de divergencia calculados a partir de diferentes estimaciones de la tasa de sustitución, empleando el promedio en el número de sustituciones por sitio de ADN, K, obtenida con el modelo de dos parámetros de Kimura (1981).

	Tiempo de divergencia en años, usando diferentes tasas de sustitución sitio/año				
	K promedio	0.34x10 ^{-9a}	0.2x10 ^{-9b}	1.5x10 ^{-9c}	4.2 x 10 ^{-11d}
Origen de las Agavaceae ^e	0.009	13.7x10 ⁶	23.5x10 ⁶	3.1x10 ⁶	112x10 ⁶
Separación Agavaceae-Nolinaceae	0.032	47.1x10 ⁶	80.7x10 ⁶	10.7x10 ⁶	385x10 ⁶
Origen Asparagales ^f	0.057	83.7x10 ⁶	144x10 ⁶	19.1x10 ⁶	684x10 ⁶

^a Tasa calculada a partir de comparar la K promedio entre nueve paleohierbas y 118 monocotiledóneas, y considerando que se separaron hace unos 150 millones de años (Eguiarte, en prensa).

^b Tasa menor promedio para el cloroplasto, Clegg *et al.* (1991).

^c Tasa obtenida para *rbcL* de la divergencia monocotiledóneas-dicotiledóneas, Zurawski y Clegg (1987).

^d Tasa más lenta extrema, obtenida de la divergencia en palmas en *rbcL*, Wilson *et al.* (1990).

^e Separación *Hosta*-Agavaceae *sensu stricto*.

^f *Curculigo* e *Hypoxis* al resto de las Asparagales + Iridaceae + Cyanastraceae.

Fig. 4. Árbol de Máxima Verosimilitud (Felsenstein, 1981) para las Agavaceae *sensu stricto*, empleando secuencias de nueve especies de Asparagales. Éste es el árbol con el valor del logaritmo natural de la verosimilitud (likelihood) más grande (menos negativo = -2789.4) de los obtenidos en cinco réplicas de los análisis, cada una empleando rearrreglos globales (DNAML81, Phylip 3.5, Felsenstein 1993).

Reloj molecular en las Asparagales. El Cuadro 1 muestra los resultados de las diferentes estimaciones de los tiempos de divergencia considerando que las tasas de sustitución del ADN del gen de *rbcL* son relativamente constantes. Los tiempos obtenidos a partir de la tasa calculada en este trabajo (0.34×10^{-9} sustituciones por sitio por año) resultan intermedios, lo cual da un tiempo promedio para el origen de las Agavaceae verdaderas de cerca de 14 millones de años. Sin embargo, como se puede observar en el cuadro 1, usando las diferentes tasas reportadas en la literatura se

obtiene un rango enorme, de 3.1 a 112 millones de años. La principal utilidad de este reloj es mostrar, en una escala temporal, la diferencia relativa en los tiempos de origen de los diferentes grupos. Así, empleando la tasa aquí obtenida, se estimó que las Agavaceae se separaron de las Nolinaceae hace unos 47 millones de años y el grupo Asparagales + Iridaceae + Cyamastaceae surgió hace unos 84 millones de años. Estas estimaciones deben ser tomadas como preliminares, y se presentan para poder pensar más claramente en los tiempos relativos en que se separaron estos taxa. Nuestra

estimación del tiempo de separación entre las monocotiledóneas y las dicotiledóneas se incorporó en la reconstrucción obtenida mediante el algoritmo UPGMA para 28 especies (Fig. 5). Este algoritmo es el más adecuado para este objetivo, ya que produce un árbol en el que las distancias son proporcionales a las diferencias promedio entre los grupos y considera que opera un reloj molecular (Nei, 1987). La filogenia reconstruida por el UPGMA es análoga a la obtenida con otros métodos empleando las 134 especies: las Asparagales verdaderas son el grupo hermano de las Iridaceae + Cyanastraceae y resultan lejanas a las Hypoxidaceae. Las Agavaceae *sensu* Dahlgren *et al.* (1985) son muy cercanas a *Hosta* y *Chlorophytum*, pero las Nolinaceae, las Dracenaceae y las Phormiaceae quedan bastante lejos de las Agavaceae verdaderas. Sin embargo, esta reconstrucción presenta algunas aparentes anomalías debido a la tendencia de este algoritmo a producir errores de reconstrucción si existen heterogeneidades en las tasas de sustitución (Nei, 1987; Hillis *et al.*, 1994). De esta manera, las Asphodelaceae (parientes del *Aloë*), al tener las tasas de sustituciones más altas, aparecen como grupo hermano del resto de las Asparagales + las Iridaceae. También *Dianella* aparece como un taxon más bien basal dentro de las Asparagales, ente *Asparagus* y *Lomandra*.

DISCUSIÓN

El primer intento de analizar la filogenia de las monocotiledóneas con métodos moleculares es el de Amkerman (1927, en Dahlgren y Clifford, 1982), quien utilizó métodos inmunológicos y datos morfológicos y obtuvo una filogenia preliminar de las monocotiledóneas. Sus resultados son poco confiables tanto por los métodos empleados para obtener los datos como los usados en el análisis. Recientemente, Hamby y Zimmer (1992) publicaron un análisis de 60 taxa usando genes ribosomales de cloroplasto (rRNA, con alrededor de 1,700 bases por especie). Sin embargo, sus resultados sólo se pueden considerar preliminares ya que a veces, cuando incluyen una nueva secuencia en su análisis, cambia la topología de todo el árbol; por eso se considera que la cantidad de información en las secuencias y/o que el número de las mismas no es adecuado para resolver claramente la filogenia de las plantas (Hamby y Zimmer, 1992; Chase *et al.*, 1993). Martin y Dowd (1991), empleando la secuencia de ADN para la unidad pequeña de la RuBisCo (*rbcS*), inferida a partir de la secuencia de aminoácidos) analizaron 335 especies de plantas. Sin embargo, su análisis tiene problemas similares a los que presenta el trabajo de Hamby y Zimmer (1992). Así, podemos decir que para grandes grupos de plantas, los únicos análisis que han funcionado son los basados en la *rbcL* (Chase *et al.*, 1993 y el resto de ese volumen del Ann. Miss. Bot. Gard.). En este trabajo presentamos análisis a partir de matrices de distancia evolutiva y de parsimonia para 134 especies de plantas, de las cuales 118 son monocotiledóneas. Usando la secuencia de *rbcL*, Chase *et al.* (1993) publicaron análisis para 475 y 499 especies de plantas con semillas, pero incluyeron sólo de 91

a 93 especies de monocotiledóneas, y emplearon exclusivamente análisis de parsimonia. Duvall *et al.* (1993a) presentaron análisis de la filogenia de monocotiledóneas usando 27 especies y métodos tanto de máxima verosimilitud como de parsimonia. Posteriormente, Duvall *et al.* (1993b) publicaron un análisis de parsimonia empleando 104 especies de monocotiledóneas y uno de máxima verosimilitud con 78 monocotiledóneas. Por otra parte, Eguiarte *et al.* (1994) presentaron tanto análisis de distancia como de parsimonia para un juego menor de especies de monocotiledóneas (53).

Los grandes grupos (órdenes y subclases en Cronquist (1988), órdenes y superórdenes en Dahlgren *et al.* (1985)) de las monocotiledóneas resultan claramente definidos para los que estudian la sistemática de las mismas (Dahlgren y Clifford, 1982; Dahlgren *et al.*, 1985); sin embargo, las relaciones entre estos grupos y dentro de ellos están poco entendidas. Esto se refleja en la gran diversidad de tratamientos sistemáticos de las monocotiledóneas. Los resultados aquí obtenidos, con la base de datos del gen *rbcL* más grande de monocotiledóneas que se haya analizado, resultan similares a los obtenidos por métodos tanto de parsimonia como de máxima verosimilitud (Chase *et al.*, 1993 y Duvall *et al.*, 1993a y b). Esto indica la robustez del conjunto de datos ya obtenido. Para tratar de hacer más claros nuestros resultados, podemos comparar las reconstrucciones filogenéticas aquí obtenidas (en particular la de parsimonia) con las propuestas de Cronquist (1988), lo cual se muestra en la Fig. 6. En nuestros diagramas, *Acorus* aparece en la base de las monocotiledóneas (Duvall *et al.*, 1993; Eguiarte, en prensa). Las Arecidae de Cronquist se separan en Arales, Cyclanthanae, Pandanae y en palmas (Arecanae); todos estos grupos aparecen en nuestras reconstrucciones como muy lejanos entre sí. Las Liliidae de Cronquist se dividen en varios grupos principales: en Lilianae, Asparagales *sensu lato* (Asparagales + Iridaceae + Orchidales + Hypoxidaceae), en Velloziales y en Dioscoreales; estas últimas quedan cerca de la base de la filogenia. En nuestro análisis, las Bromeliaceae están separadas de las Zingiberanae. Las Commelinidae de Cronquist se parten en Commelinaceae, Poales, Cyperales y Thyphales.

Sobre el grupo de taxa relacionados con las Asparagales de Huber (1969) y de Dahlgren *et al.* (1985), se puede indicar que los resultados de este trabajo apoyan la existencia del orden Asparagales *sensu* Dahlgren *et al.* (1985), aunque el ajuste no es perfecto, y sugiere la remoción de las Hypoxidaceae de las Asparagales y la inclusión de las Iridaceae. Este análisis muestra claramente la posición de las Agavaceae y Agavales *sensu* Hutchinson dentro de las monocotiledóneas y se puede ver que constituyen un grupo relativamente compacto, al quedar todas dentro de las Asparagales de Huber (1969) y de Dahlgren *et al.* (1985), pero en realidad constituyen un grupo heterogéneo, parafilético. Es notable la existencia de cuando menos dos grandes grupos que corresponden, *grosso modo*, con las divisiones en nivel familia propuestas por Dahlgren *et al.* (1995); las Agavaceae *sensu stricto*, y las Nolinaceae *sensu* Dahlgren *et al.* (1985).

FIG. 5. Árbol de distancia calculado por el algoritmo UPGMA para 28 especies de Asparagales y grupos cercanos, empleando las distancias obtenidas con el modelo de dos parámetros de Kimura (1981). El largo de las ramas indica la distancia evolutiva. También se incluye una aproximación a un reloj molecular empleando una tasa de sustitución de 0.34×10^{-9} sustituciones por sitio por año (Cuadro 1).

Cronquist, 1988

rbcL

FIG. 6. Relaciones entre la propuesta de evolución para las monocotiledóneas de Cronquist (1988), y los resultados presentados aquí obtenidos a partir de la secuencia *rbcL*, en particular nuestros árboles de parsimonia (Fig. 3).

Las Agavaceae *sensu stricto* resultan cercanas a la hierba pantropical *Chlorophytum* (Anthericaceae), y a la hierba *Hosta* (Funkiaceae) nativa de China y Japón. Dentro de las Agavaceae *sensu stricto*, las relaciones son menos claras, debido a que las diferencias nucleotídicas entre las especies de Agavaceae verdaderas fueron muy pequeñas, lo cual indica altas tasas de evolución morfológica y de especiación en las zonas áridas de América del Norte. La inclusión de *Hosta* cerca de las Agavaceae es interesante, pero no sorprendente, dadas las similitudes cariotípicas y morfológicas citadas por Cronquist (1981) y Álvarez de Zayas (1987). La mejor resolución de las relaciones dentro de la familia la ofrece el análisis realizado con el método de máxima verosimilitud. En este análisis, *Chlorophytum* y *Hosta* están en la base, mientras que *Yucca* aparece como la Agavaceae más primitiva, *Beschorneria*, *Hesperaloë* como grupos intermedios y *Manfreda* y *Agave* resultan como los taxa terminales. Sin embargo, no quedan bien resueltas las relaciones entre estos tres principales grupos de Agavaceae *sensu* Hutchinson, y así no se puede decir si las Agavaceae verdaderas están más cercanas a las Asphodelaceae + *Dianella*, o a las Nolinaceae.

La propuesta del reloj molecular, aunque relevante y potencialmente muy útil, se ve restringida en su uso por los problemas que presenta (Moritz *et al.*, 1987). En primer lugar, se necesitan varios tiempos obtenidos de manera independiente y confiable para poder calibrarlo (Moritz *et al.*, 1987). Por otra parte, si las tasas de sustitución no son constantes, los errores pueden ser muy grandes (Gaut *et al.*, 1992). En los resultados aquí presentados, es notable la gran variación en tiempos que sugieren las diferentes tasas calculadas a partir de distintos estudios. La tasa de Wilson *et al.* (1990) resulta extrema, ya que se calculó para palmas, y se ha demostrado que de las monocotiledóneas éstas constituyen el grupo con las tasas de sustitución más lentas (Gaut *et al.*, 1992). La tasa de Zurawski y Clegg (1987) es demasiado alta, y esto se debe a que en su cálculo se usaron pastos, que son el grupo de monocotiledóneas con las tasas de sustitución mayores y también a que algunas de las secuencias contenían errores que aumentaban los cálculos (Gaut *et al.*, 1992). La tasa más confiable sería la obtenida en este estudio, siempre y cuando la fecha de la separación monocotiledóneas-paleohierbas fuera confiable. Algunos trabajos moleculares (Eguiarte, en prensa) y ciertos datos paleontológicos sugieren que esta divergencia pudo ser más temprana, y esto modificaría proporcionalmente las estimaciones.

La tasa de sustitución aquí calculada indica un tiempo de origen de la familia Agavaceae (considerando a *Hosta* como de otra familia, en contraposición con la sugerencia de Álvarez de Zayas, 1987), de unos 14 millones de años. Para las Agavaceae el registro fósil es prácticamente nulo (Álvarez de Zayas, 1987 y 1989); sin embargo, esta fecha parece adecuada, debido a que corresponde, cuando menos en orden de magnitud, a la señalada por Álvarez de Zayas (1989). Él sugiere, a partir de consideraciones

biogeográficas, que la familia se originó en el Eoceno (hace 37-57 millones de años). Sin embargo, fechas de origen de la familia más recientes podrían explicar de la misma manera los fenómenos que él describe. De todas formas, mediante la tasa de sustitución aquí calculada, se obtiene que la separación entre Agavaceae *sensu stricto* y Nolinaceae ocurrió hace unos 47 millones de años, en el Eoceno. Por otra parte, usando esta tasa, el orden Asparagales *sensu lato* habría surgido hace unos 84 millones de años, durante el Cretácico superior.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a mi amada esposa, Valeria Souza su ayuda durante la realización de este proyecto. Agradezco también al Dr. M. T. Clegg su apoyo en las fases iniciales del proyecto, así como a Mel Duvall, Jerry Learn y Brandon Gaut. Valeria Souza, Elleli Huerta, Juan Nuñez-Farfán, Raquel Galván V. y Abisaf García-Mendoza revisaron cuidadosamente versiones previas de este artículo. Este proyecto fue realizado con el apoyo del PAPIIT, DGAPA, UNAM, proyecto número IN205894.

LITERATURA CITADA

- Álvarez de Zayas A. 1987. *Sistemática y Filogenia de la familia Agavaceae Endlicher*. PhD Thesis. La Habana, Cuba: Universidad de La Habana.
- Álvarez de Zayas A. 1989. Distribución geográfica y posible origen de las Agavaceae. *Revista del Jardín Botánico Nacional* 10: 25-36.
- Bentham GD, Hooker JD. 1883. *Genera Plantarum III*. London: Reeve and Co.
- Bousquets J, Strauss SH, Doerksen AH, Price RA. 1992. Extensive variation in evolutionary rate of *rbcL* gene sequences among seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 89: 7844-7848.
- Chase MW, Soltis DE, Olmstead RG, Morgan D, Les DH, Mishler BD, Duvall MR, Price R, Hills HG, Qiu Y, Kron KA, Rettig JH, Conti E, Palmer JD, Manhart JR, Systma KJ, Michaels HJ, Kress WJ, Karol KG, Clark WD, Hedrén M, Gaut BS, Jansen RK, Kim K, Wimpee CF, Smith JF, Furnier GF, Strauss SH, Xiang Q, Plunkett GM, Soltis PS, Swensen SM, Williams SE, Gadek PA, Quinn CJ, Eguiarte LE, Golenberg E, Learn Jr. GH, Graham SW, Barrett SCH, Dayanadan S, Albert VA. 1993. Phylogenetics of seed plants: An analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80: 528-580.
- Clegg MT, Learn Jr GH, Golenberg EM. 1991. Molecular evolution of chloroplast DNA. En: Selander RK, Clark AG, e Whittam TS. (Eds.). *Evolution at the molecular level*. 135-149. Sunderland, Mass: Sinauer.
- Cronquist A. 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press.
- Cronquist A. 1988. *The evolution and classification of flowering plants*. Second Edition. New York: The New York Botanical Garden.
- Dahlgren RMT, Clifford HT. 1982. *The Monocotyledons: A comparative study*. London: Academic Press.
- Dahlgren RMT, Clifford HT, Yeo PF. 1985. *The families of the monocotyledons. Structure, Evolution and Taxonomy*. Berlin: Springer-Verlag.

- Duvall MR, Learn Jr GH, Eguiarte LE, Clegg MT. 1993a. Phylogenetic analysis of *rbcl* sequences identifies *Acorus calamus* as the primal extant monocotyledon. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 90: 4641-4644.
- Duvall MR, Clegg MT, Chase MW, Clark WD, Kress JW, Hills HG, Eguiarte LE, Smith JF, Gaut BS, Zimmer A, Learn, Jr. GH. 1993b. Phylogenetic hypothesis for the Monocotyledons constructed from *rbcl* sequence data. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80: 607-619.
- Eguiarte LE (en prensa) Filogenia y evolución de las monocotiledóneas. En: Nuñez-Farfán J, Zamora JC. (Eds.) *Tópicos de biología evolutiva II*. México, D.F.: Facultad de Ciencias, UNAM.
- Eguiarte LE, Duvall MR, Learn, Jr GH, Clegg MT. 1994. The systematic status of the Agavaceae and Nolinaceae and related Asparagales in the Monocotyledons: An analysis based on the *rbcl* gene sequence. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 54: 35-56.
- Endlicher IL. 1841. *Enchiridion botanicum*. Leipzig: Engelmann.
- Felsenstein J. 1981. Evolutionary sequences from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* 17: 368-376.
- Felsenstein J. 1993. *Phylip (Phylogeny Inference Package)*. Seattle: University of Washington.
- Gaut BS, Muse SV, Clark WD, Clegg MT. 1992. Relative rates of nucleotide substitution at the *rbcl* locus of monocotyledonous plants. *Journal of Molecular Evolution* 35: 292-303.
- Gentry HS. 1972. *The Agave family in Sonora*. Washington: Agriculture Handbook No. 399. United States Department of Agriculture.
- Gomez-Pompa A, Villalobos-Pietrini R, Chimal A. 1971. Studies in the Agavaceae. I. Chromosome morphology and number of seven species. *Madroño* 21: 208-211.
- Hamby RK, Zimmer EA. 1992. Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics. En: Soltis PS, Soltis DE, Doyle JJ. (Eds.). *Molecular systematics of Plants*. 50-91. New York: Chapman Hall.
- Hillis DM, Huelsenbeck JP, Cunningham CW. 1994. Application and accuracy of molecular phylogenies. *Science* 264: 671-677.
- Huber H. 1969. Die Samenmekmale und Verwandtschaftsverhältnisse der Liliifloren. *Mitt Bot Staatssamml Muenchen* 8: 219-538.
- Hutchinson J. 1934. *The families of flowering plants. Vol. II. Monocotyledons*. London: The Macmillan Co.
- Hutchinson J. 1959. *The families of flowering plants. Vol. II. Monocotyledons*. 2a. ed. Oxford: Clarendon Press.
- Kimura M. 1981. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 78: 454-458.
- Krause K. 1930. Liliaceae. En: Engler A. (Ed). *Pflanzenreich*, 15a. 351-362. Leipzig: Engelmann.
- Martin PG, Dowd JM. 1991. Studies of angiosperm phylogenies using protein sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 78: 296-337.
- Mcvaugh R. 1989. *Flora Novo-Galiciana. A descriptive account of the vascular plants of Western Mexico. Vol. 15: Bromeliaceae to Dioscoreaceae*. Ann Arbor: The University of Michigan Herbarium. Ann Arbor.
- Moritz C, Dowling TE, Brown WD. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 269-292.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press.
- Pax F, Hoffman K. 1930. Amaryllidaceae. En: Engler A. ed. *Pflanzenreich*, 15a. 391-430. Leipzig: Engelmann.
- Reko BP. 1946. Los géneros fanerogámicos mexicanos. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 4: 19-40.
- Swofford DL. 1991. *PAUP 3.0s: Phylogenetic Analysis Using Parsimony. User's Manual*. Champaign, Illinois: Natural History Survey.
- Swofford DL, Olsen GJ. 1990. Phylogeny reconstruction. En: Hillis DM, Moritz C. (Eds.) *Molecular Systematics*. 411-501. Sunderland, Mass: Sinauer.
- Takhtajan AL. 1980. Outline of the classification of flowering plants (Magnoliophyta). *Botanical Review* 46: 225-359.
- Thorne RF. 1992. An updated classification of flowering plants. *Aliso* 13: 365-389.
- Wilson MA, Gaut B, Clegg MT. 1990. Chloroplast DNA evolves slowly in the palm family. *Molecular Biology and Evolution* 7: 303-314.
- Zurawski G, Clegg MT. 1987. Evolution of higher-plant chloroplast DNA-encoded genes: implications for structure-function and phylogenetic studies. *Annual Review of Plant Physiology* 38: 391-418.