

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
INSTITUTO DE ECOLOGIA**

**Evolución de estróbilos megaesporangiados y el origen
de la escama ovulífera en el orden Coniferales**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS
P R E S E N T A**

Alejandra Vázquez Lobo Yurén

Director de tesis: Dr. Daniel Piñero Dalmau



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Esta tesis fue realizada gracias a la beca de CONACYT (registro 124997) y a los apoyos del PAEP102369 y 202325, en el laboratorio de Genética y Evolución del Instituto de Ecología, bajo la dirección del Dr. Daniel Piñero y la asesoría de la Dra. Elena Alvarez-Buylla, el Dr. Sergio Cevallos y el Dr. Miguel Franco

Quiero agradecer a Daniel Piñero por sus enseñanzas en tantos aspectos de la ciencia y la vida. Por su generosidad y su sabiduría, que me permitieron acercarme al conocimiento de la evolución y a la pinos mexicanos, pero sobretodo por contagiarme su compromiso con la academia y con la universidad. Es un orgullo decir que todos estos años Daniel ha sido mi maestro, mi jefe, mi colaborador y un gran amigo.

Agradezco a Elena Alvarez-Buylla por sus consejos y su visión, que fueron esenciales para la elaboración de este proyecto. También por revisar esta tesis, por formar parte de mi comité tutorial y nuevamente, por introducirme a la investigación hace varios años.

A Miguel Franco y Sergio Cevallos, por sus comentarios y paciencia durante los tutoriales. Agradezco a Susana Magallón, Alicia Gamboa, Pablo Vinueza y Luis Eguiarte (con mucha admiración para todos), que se tomaron el tiempo para la revisión de esta tesis.

A Francisco Vergara, por su colaboración y apoyo en todos los aspectos de este proyecto. También por todas las ideas que discutimos y toda la bibliografía brindada, y por mostrarme que para realizar los proyectos, lo importante es el trabajo y lo de menos son la burocracia u otros obstáculos aparentes.

A Peter Engström, por abrirme las puertas de su país y de su laboratorio, donde se realizaron las hibridaciones *in situ*.

A Annelie Carlsbecker por compartir sus resultados, por enseñarme las hibridaciones *in situ* y otras técnicas de laboratorio, pero sobre todo por las coincidencias, su amistad y su hospitalidad.

A Oscar Rodríguez por su apoyo en el laboratorio.

A Lev Jardón, por los infructuosos -pero didácticos- *Northern blots*, por los viajes a conocer los pinos caribeños y por su amistad tan valiosa.

A Rodolfo Salas por ayudarme con las colectas, resolverme todas las dudas y por apoyarme siempre. Además por todos los kilómetros, comidas, música y cervezas que hemos compartido.

A René Cerritos por ayudarme con las fotos y por ser el DT más comprensivo y poco complaciente.

A León por sus respuestas ingeniosas a tantas preguntas (frecuentemente necias) y por sorprenderme siempre.

A mi queridísima hermana por formar la tesis y por su ayuda permanente para las imágenes y figuras. Claro que más que nada, por ser mi amiga de toda la vida.

A Cris por ayudarme con las traducciones con paciencia de santo y las largas pláticas.

A Patricia Delgado, por la confianza y todo lo que compartimos.

A Ana por el café, los viajes algodoneros y la compañía.

A todos mis compañeros del laboratorio por acompañarme en las múltiples colectas de *Taxus*, por su apoyo, las conversaciones, las porras y todo lo que me han enseñado: Paty, Sonia, Argelia, Ale M, Adán, Brian, Valeria, Mónica, Nadia, Ale O, Katia, Miros, Gretel, Mariana, Bertha y Romy. También a David, que siempre será parte de este laboratorio.

A mis amigas Erika, Laura y Rosalinda por la comprensión y los consejos.

A Alejandro por la comprensión, el apoyo y la ternura. Por estar a mi lado. Por las responsabilidades y más por las irresponsabilidades. Por aquel amanecer en Mazunte y el asalto fallido en Guatemala. Por Mr. Shining y el Dr. Caos. Por el frío en Suecia y el calor en Marruecos. Por la suerte de tenerlo a mi lado, por tantas, tantas cosas... pero sobre todo, porque compartimos lo mejor de la vida, nuestro hijo.

A Josefa, por oírme, por estar siempre de mi lado y por sus palabras para sacudir las angustias.

A Lobito, por ser tan él y por el orgullo de tener un hermano tan listo.

A Liliana, Marianna y Viridiana por seguir a mi lado, incluso desde lejos (las quiero mucho).

A Dino, Lucia (¡amiga!), Toño, Gaby, Gina, Lemus, Caldo, Mariana, Selene, Gina, Miguel, Nestor, Oscar y todos los *cepsis* por la subersión y las vivencias del 99.

A Gabo y Balo (ay! la tertulia) por el rock y la complicidad.

A Cami, Rogelio, Dodó, Jorge, Maricela, Andrea, René, Calo, Andrés, Ari, Javiera, Gege, Héctor, Laila, Abraham, Adolfo, Horacio, Romy, Figueroa (mil gracias) y a todos los amigos, por la música y las alegrías.

Índice

Resumen	3
<i>Abstract</i>	4
Prefacio	5
Capítulo 1. Origen y diversificación de las estructuras reproductivas femeninas de las coníferas	7
Introducción	7
Las estructuras reproductivas femeninas de las coníferas modernas	7
Interpretación del registro fósil y las hipótesis paleobotánicas del origen de la escama ovulífera	13
La aplicación del concepto de homología en estructuras reproductivas femeninas de las coníferas y el análisis de la evolución de caracteres morfológicos discretos	19
La filogenia de las gimnospermas	23
Inferencia del tiempo de divergencia	25
Materiales y métodos	27
Filogenia de las coníferas modernas	27
Reconstrucción de caracteres ancestrales y filogenia de taxa fósiles	27
Estimación del tiempo de divergencia de las coníferas vivientes	30
Resultados	
Filogenia de las coníferas	31
Identidad del último ancestro común de las coníferas modernas	32
Estimación del tiempo de divergencia entre Pinaceae y las otras familias Coniferales modernas	35
Discusión	37
Capítulo 2. La evolución del desarrollo y los genes <i>LEAFY/FLORICAULA</i> y <i>NEEDLY</i> en las plantas con semilla	41
La genética evolutiva del desarrollo en plantas	41
La genética del desarrollo en las coníferas	42
La participación de <i>LEAFY</i> en el inicio de la floración y la estructura de la inflorescencia	45

La evolución de los genes *LEAFY/FLORICULA* y *NEEDLY* en las plantas con semilla

47

Capítulo 3. Manuscrito: Characterization of the expression patterns of <i>LEAFY/FLORICAULA</i> and <i>NEEDLY</i> orthologues in female and male cones of the conifer genera <i>Picea</i> , <i>Podocarpus</i> and <i>Taxus</i> : implications for current evo-devo hypotheses for gymnosperms	53
Conclusiones	68
Bibliografía	70
Apéndice 1	83
Apéndice 2	85

Resumen

Las coníferas, el grupo más diversificado de las gimnospermas, se caracterizan por sus estructuras reproductivas denominadas conos. Mientras que los conos masculinos se encuentran conservados morfológicamente, los femeninos presentan numerosas modificaciones entre los diferentes linajes. Por un lado, el amplio registro fósil de este orden ha permitido el planteamiento de hipótesis relativas al origen de las estructuras reproductivas femeninas. Por otro lado, el número relativamente reducido de especies en este grupo (ca. 500) ha facilitado analizar a fondo su diversificación morfológica. Sin embargo, dichas hipótesis han sido planteadas fuera del marco filogenético y además, se desconocen las bases genéticas de la evolución y la diversificación morfológica. En esta tesis se aplican dos aproximaciones para el estudio de la evolución de estructuras reproductivas femeninas en las coníferas. Primero, las hipótesis concernientes a la identidad del linaje a partir del cual se derivaron las coníferas modernas, se ponen a prueba con herramientas de sistemática y evolución molecular. Una filogenia de parsimonia con base en una matriz combinada de cuatro genes (18S y 26S nrDNA, *rbcL* y *matK*) fue usada para el mapeo de caracteres y subsecuentemente para la reconstrucción de caracteres morfológicos ancestrales. Esta misma filogenia fungió como árbol de restricción para la inferencia de una filogenia morfológica que incluye taxa vivientes y fósiles. Además, mediante el método de verosimilitud penalizada (*PL*), se estimó el tiempo de divergencia de la familia Pinaceae y el resto de familias de Coniferales vivientes. Los resultados de los análisis morfológicos y moleculares indican que las coníferas vivientes se originaron durante el Pérmico Superior a partir de un ancestro tipo *Walchia*. Segundo, en la búsqueda de las bases genéticas del cambio morfológico de las estructuras reproductivas femeninas, se realizó un análisis comparativo de patrones de expresión de los genes reguladores del desarrollo *LFY/FLO* y *NLY* en tres géneros de coníferas –*Picea* (Pinaceae), *Podocarpus* (Podocarpaceae), y *Taxus* (Taxaceae). Los patrones comparativos de la expresión espaciotemporal de estos genes, sugieren divergencia funcional de los homólogos de *LFY/FLO* respecto a los homólogos de *NLY* en estas familias. Adicionalmente, estos estudios proveen evidencia acerca de las bases genéticas de los procesos heterocronicos que subyacen al al evolución de los conos femeninos de las coníferas.

Abstract

Conifers, the most diversified group of gymnosperms, are characterized by its reproductive structures known as cones. While the male cones are morphologically conserved, the female ones display numerous modifications between lineages. On one hand, the completeness of fossil record in this order has allowed the statement of evolutionary hypotheses on the origin of female reproductive structures. On the other hand, the relatively reduced number of species (ca. 500) has provided to analyze the morphological diversification. Although, these hypotheses has been stated out of the phylogenetic framework and little is known respect the genetic basis of morphological evolution and diversification. Two approaches are used in this thesis to study the evolution of female reproductive structures in conifers. First, hypotheses regarding the identity of the lineage from which modern conifers were derived are tested with molecular systematic and molecular evolutionary tools. A parsimony phylogeny based on combined matrix of four genes (18S and 26S nrDNA, rbcL and matK), was used to map characters for the reconstruction of morphological ancestral characters, also was used as constrain tree to infer a morphological-based tree including fossil and extant taxa. Additionally, the penalized likelihood method (PL) was used to estimate the divergence time of Pinaceae and the rest conifer extant families. Results from morphological and molecular analysis point towards an Upper Permian extant conifer origin from a Walchia-type ancestor. Second, looking for the genetic basis of morphological change in female reproductive structures, a comparative analysis of expression patterns of the developmental regulator genes LFY/FLO and NLY was conducted in three conifer genera –Picea (Pinaceae), Podocarpus (Podocarpaceae), and Taxus (Taxaceae). Comparative spatiotemporal patterns in the expression of these genes suggest a functional divergence for LFY/FLO with respect to NLY homologues in gymnosperms. In addition, these studies provide evidence about the genetic basis of heterochronic processes behind morphological evolution of female cones in conifers.

PREFACIO

El Orden taxonómico Coniferales, es uno de los cuatro que integran la División Pinophyta (las gimnospermas; Woodland 1991). Este Orden es el más diverso y abundante dentro de este grupo de plantas con semilla, y está conformado por nueve familias que incluyen aproximadamente 51 géneros y 550 especies (Stewart y Rothwell 1993). El registro paleobotánico de las coníferas está ampliamente documentado y se extiende desde el Carbonífero hasta el presente (Kenrick y Crane 1997), y de acuerdo con Miller (1977) todas las familias actuales de coníferas aparecieron durante el Mesozoico.

Las estructuras reproductivas femeninas -denominadas estróbilos megasporangios o conos ovulados- presentan una amplia diversificación morfológica al interior de las coníferas, lo cual ha dificultado el establecimiento de hipótesis de homología entre los órganos que componen los ejes reproductivos por un lado y por otro de relaciones táxicas entre coníferas actuales y fósiles. Las descripciones de la ontogenia, así como las de los estados adultos, dejan en claro que el cono ovulado de las coníferas es compuesto, sin embargo, el origen evolutivo de la escama ovulífera ha sido un problema no resuelto a lo largo de varias décadas. La escama ovulífera es similar a una megasporófila que lleva óvulos adaxialmente, pero su posición axilar con respecto a la bráctea y su vascularización han conducido a planteamientos de relaciones de homología con las estructuras que tradicionalmente se han empleado como la guía para proponer los estados ancestrales de los estróbilos contemporáneos: los fósiles con afinidades coniferales.

El problema del origen y la diversificación de los conos femeninos y en especial las secuencias de cambio de sus caracteres puede ser analizado en un contexto filogenético, y las hipótesis ya existentes pueden sustentarse con evidencias relativas a los patrones de expresión de algunos genes cuya participación en la ontogenia de estructuras reproductivas en plantas con semilla contemporáneas ha resultado ser crucial para la diferenciación correcta de las estructuras adultas.

Se ha postulado que las escamas ovulíferas derivaron de coníferas del Carbonífero-Superior-Pérmico Inferior cuyas estructuras reproductivas femeninas no presentan fusión de componentes, o bien que derivaron a partir de grupos del Pérmico Superior-Trisico Inferior, con estructuras femeninas muy similares a las escamas ovulíferas actuales. Debido a lo

anterior en el primer capítulo de esta tesis se pondrán a prueba las hipótesis paleobotánicas relativas al origen de la escama ovulífera, por un lado reconstruyendo una filogenia que incluye tanto los grupos vivientes como los fósiles que han sido postulados como ancestros de las coníferas modernas. Por otro lado, se inferirá el tiempo de divergencia de la familia Pinaceae y el resto de las coníferas modernas, para establecer el tiempo de origen del grupo corona de Coniferales y relacionar este evento con los fósiles presentes en dicho tiempo. En este primer capítulo también se revisaran las descripciones de las estructuras reproductivas femeninas y las hipótesis paleobotánicas relativas al origen de la escama ovulífera.

En el segundo capítulo se presenta una revisión de los trabajos relativos a la genética evolutiva del desarrollo de las coníferas y el papel de los genes *LEAFY/FLORICAULA* y *NEEDLY (LFY/FLO y NLY)* en el desarrollo y evolución de las plantas con semilla, con el objetivo de establecer un marco conceptual para el tercer capítulo de esta tesis. El tercer capítulo es un manuscrito en el que se presenta un estudio comparativo de la expresión de los genes *LFY/FLO* y *NLY* en especies de tres familias diferentes de coníferas (Pinaceae, Podocarpaceae y Taxaceae). El objetivo de este análisis es encontrar cambios en los patrones de expresión de estos genes del desarrollo que pudieran estar asociados con la evolución morfológica de las estructuras reproductivas femeninas.

El presente trabajo pretende ser una contribución al estudio de un problema específico en la historia de la botánica: la evolución de las estructuras femeninas de las coníferas. En este análisis de biología comparada, se integran las herramientas de la sistemática contemporánea, la evolución molecular y datos empíricos relativos a las bases moleculares de la morfogénesis de estructuras fenotípicas complejas

CAPÍTULO 1. ORIGEN Y DIVERSIFICACIÓN DE LAS ESTRUCTURAS REPRODUCTIVAS FEMENINAS DE LAS CONÍFERAS

Introducción

Las estructuras reproductivas femeninas de las coníferas modernas

La descripción del estróbilo megaesporangiado de la familia Pinaceae puede generalizarse para comprender la naturaleza del estróbilo femenino de todo el orden. El cono ovulado consiste de un eje central con crecimiento determinado, a lo largo del cual se disponen con filotaxia helicoidal estructuras portadoras de óvulos, denominadas escamas ovulíferas. El cono productor de polen es considerado un *estróbilo simple*, ya que presenta únicamente estructuras fértiles denominadas microesporófilas, unidas directamente a un eje de último orden, sin asociación con brácteas. En contraste, en una sección longitudinal de un estróbilo femenino, puede observarse que cada escama ovulífera porta adaxialmente uno o más óvulos con un solo tegumento y que están asociadas abaxialmente a una bráctea, por lo cual el cono ovulado es generalmente descrito como un *estróbilo compuesto* (Figura 1). Debido a la posición axilar de la escama ovulífera respecto a una bráctea, ésta podría considerarse homóloga a una rama, por lo tanto cada cono femenino estaría compuesto por múltiples ejes reproductivos a diferencia del cono masculino, conformado por un eje únicamente.

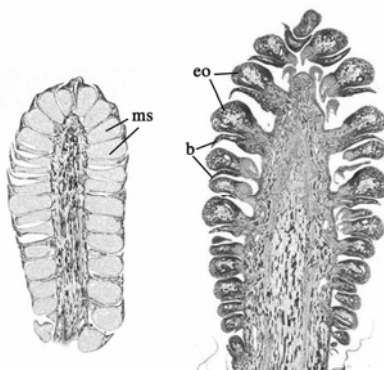


Figura 1. Cortes longitudinales de conos de un pino. En el cono masculino (izquierda) las microesporófilas (ms) se desarrollan directamente del eje. En el cono femenino (derecha) las escamas ovulíferas (eo) se desarrollan en las axilas de brácteas (b). Imagen tomada de: web.gccaz.edu

Mientras que el patrón morfológico de los conos ovulados en las coníferas es variable entre los diferentes linajes del grupo, el de los estróbilos masculinos se encuentra conservado

incluso en comparación con otras gimnospermas, por lo tanto, los caracteres de los estróbilos masculinos son poco informativos en términos de reconstrucción filogenética. Por ejemplo, a pesar de la apariencia floral de los conos masculinos de las taxáceas, el patrón de desarrollo es el mismo que en el resto de las coníferas, ya que el eje central del cono se encuentra muy reducido y las microesporófilas se desarrollan fusionándose desde la base.

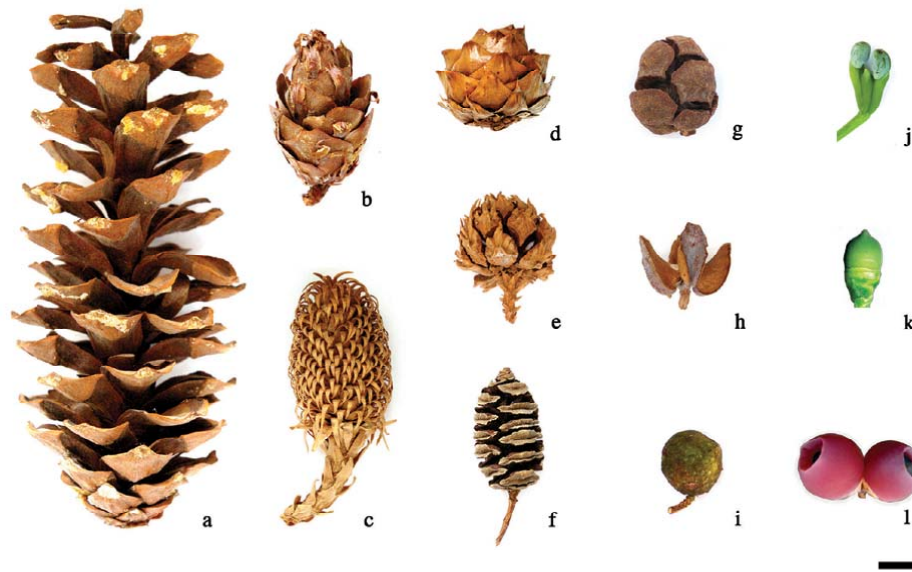


Figura 2. Diversidad de conos ovulados en Coniferales. Pinaceae: (a) *Pinus*, (b) *Pseudotsuga*; Araucariaceae: (c) *Araucaria*; Taxodiaceae: (d) *Cunninghamia*, (e) *Metasequoia*, (f) *Cryptomeria*; Podocarpaceae: (g) *Podocarpus*; Taxaceae: (h) *Taxus globosa*, (i) *Taxus baccata*; Cupressaceae: (j) *Cupressus*, (k) *Tetraclinis*, (l) *Juniperus*. La barra negra representa 1cm. Fotos René Cerritos.

En general, las familias **Pinaceae**, **Araucariaceae**, **Sciadopityaceae**, **Taxodiaceae** y **Cupressaceae**, presentan conos ovulados típicos, compuestos por múltiples escamas ovulíferas lignificadas, con dorsoventralidad pronunciada (Figura 2; Florin, 1951). Las principales variaciones en el patrón morfológico entre estas familias se encuentran en el grado de fusión de los componentes del complejo bráctea-escama ovulífera, por ejemplo, a diferencia de las familias Pinaceae y Sciadopityaceae, en la familia Araucariaceae la escama ovulífera se encuentra parcial a totalmente fusionada con la bráctea y en algunos géneros de Cupressaceae y Taxodiaceae (Cupressaceae *s.l.*), la bráctea y la escama ovulífera se encuentran fusionadas a tal grado, que es difícil distinguir la identidad de ambas estructuras (Tomlinson y Takaso 2002), sin embargo, los cortes transversales permiten distinguir los haces vasculares correspondientes a la bráctea (Figura 3; Aase 1915, Florin 1951). Algunas

cupresáceas presentan gran reducción en el número de escamas por cono, por ejemplo, en el género *Juniperus* todos los componentes del estróbilo femenino (las escamas ovulíferas y sus respectivas brácteas), se encuentran fusionados y reducidos a tal grado, que el cono completo tiene apariencia de drupa (Figura 2; Schulz et al. 2003).

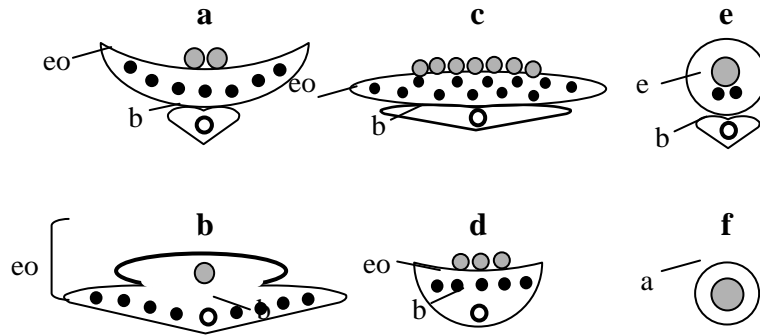


Figura 3. Esquematación de cortes transversales de estructuras portadoras de óvulos en coníferas. Los círculos grises representan la posición de los óvulos. Los círculos negros representan los haces vasculares de la escama ovulífera o el epimacio y los círculos blancos representan el haz vascular de la bráctea. Los ejes reproductivos pertenecen a (a) Pinaceae, (b) Araucariaceae, (c) Sciadopityaceae, (d) Cupressaceae, (e) Podocarpaceae y (f) Taxaceae. Eo, escama ovulífera; b, bráctea; e, epimacio; a, arilo. Modificado de Aase (1915) y Florin (1951).

La escama ovulífera de estas familias se encuentra alimentada por múltiples haces vasculares, que varían en número desde cinco hasta cerca de veinte haces por cada escama (Figura 3; Aase 1915, Florin 1951). La escama ovulífera (eo) de las familias Pinaceae, Sciadopityaceae y Araucariaceae es conspicua y de mayor tamaño que la bráctea, inclusive en las araucarias la escama ovulífera se recurva cubriendo al óvulo (Figura 4). En contraste, en Taxodiaceae y Cupressaceae algunos géneros presentan una pronunciada reducción del tamaño y del número de haces vasculares de la escama ovulífera, ejemplo de ello es el género *Cunninghamia*, donde la escama se encuentra reducida a tal grado que las brácteas son las estructuras más conspicuas del cono ovulado (Florin 1951, Farjon y Ortíz García 2003).

El número de óvulos por escama ovulífera es constante en las familias Pinaceae y Araucariaceae (dos y uno respectivamente) y estos se encuentran siempre invertidos -el micrópilo se encuentra dirigido hacia el extremo basal de la escama ovulífera-, mientras que el número de óvulos en Sciadopityaceae, Cupressaceae y Taxodiaceae varía de uno a nueve y algunos géneros de estas familias, por ejemplo *Taxodium*, presentan óvulos erectos (Figura 4; Tomlinson y Takaso 2002).

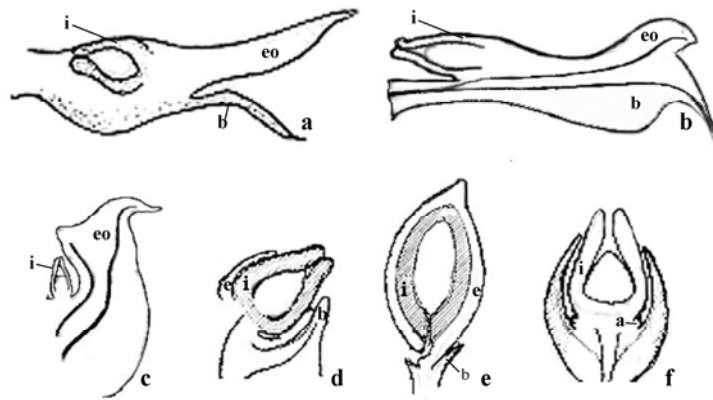


Figura 4. Representación de cortes longitudinales de ejes reproductivos de Coniferales. (a) *Pinus*, (b) *Araucaria*, (c) *Taxodium*, (d) *Phyllocladus*, (e) *Podocarpus*, (f) *Taxus*; i, integumento; eo, escama ovulífera; b, bráctea; e, epimacio; a, arilo. Tomadas de Florin (1951).

La familia **Podocarpaceae**, presenta estróbilos compuestos por uno o dos ejes reproductivos carnosos no lignificados y sin compresión dorsoventral, por lo tanto el estróbilo completo no tiene apariencia de cono (Figuras 2 y 4). Cada eje reproductivo porta sólo un óvulo invertido y la sección estéril está alimentada por dos haces vasculares únicamente (Figura 3; Florin 1951); al igual que en *Araucariaceae* dicha estructura carnosa estéril cubre al óvulo invertido y es denominada epimacio y probablemente es homóloga a la escama ovulífera (Tomlinson y Takaso 2002). La familia **Phyllocladaceae** presenta ejes reproductivos similares a los de los podocarpos, sin embargo en esta familia los óvulos son erectos y el epimacio no los cubre en su totalidad (Figura 4), además estos llegan a formar estróbilos con más de seis estructuras portadoras de óvulos (Wilde 1944; Tomlinson y Takaso 2002).

Finalmente, en las familias **Cephalotaxaceae** y **Taxaceae** las estructuras reproductivas femeninas son ejes de segundo orden que únicamente portan uno o dos óvulos terminales erectos, cubiertos por un arilo sin vasculatura (Figuras 3 y 4), que a diferencia de los arilos de las angiospermas se desarrolla a partir del eje principal de crecimiento y no es un crecimiento externo del óvulo (Figura 4; Florin 1954, Stützel y Røwemkamp 1999).

En resumen, caracteres como la dorsoventralización del eje y la dirección invertida de los óvulos, se encuentran ampliamente distribuidos en los grupos vivos de coníferas, mientras que otros caracteres son muy variables, como el número de óvulos por eje, el grado de fusión

de los componentes del eje y el número de haces vasculares por escama. Sin embargo, en ciertos linajes la forma y los patrones del desarrollo de los ejes reproductivos femeninos han cambiado resultando en formas que divergen radicalmente del patrón general. De estas modificaciones destacan el cambio en la polaridad y dorsoventralidad del eje –eventos implicados en el cambio de simetría-, la pérdida de partes estériles y la modificación de las estructuras asociadas al óvulo, como el epimacio de la familia Podocarpaceae y el arilo en Taxaceae y Cephalotaxaceae.

La diversificación morfológica y de patrones del desarrollo en el nivel del orden Coniferales, ha dificultado el planteamiento de hipótesis de homología de estructuras reproductivas, de relaciones táxicas y de secuencias de cambio morfológico al interior de este grupo. En el nivel de todas las plantas con semilla este fenómeno se acentúa, ya que los cinco grandes grupos de plantas con semilla modernos –angiospermas y los cuatro órdenes de gimnospermas- presentan ejes reproductivos con características morfológicas y patrones del desarrollo únicos, de tal manera que la escama ovulífera puede interpretarse como una novedad evolutiva, poco comparable con otros ejes femeninos en gimnospermas.

En el orden monotípico **Ginkgoales**, las estructuras reproductivas femeninas son simplemente un pedúnculo o tallo terminal –interpretado en ocasiones como megasporófila- con dos óvulos terminales erectos y sin asociación con apéndices estériles (Page 1990). Similarmente, en el orden **Cycadales** tampoco hay presencia de estructuras estériles en el eje reproductivo y en este grupo la estructura femenina es estrobilar, compuesta por un gran eje terminal a lo largo del cual se disponen en filotaxia helicoidal múltiples megasporófilas que portan adaxialmente dos óvulos unitegmentados, excepto en el género *Cycas*, donde cada megasporófila puede producir múltiples óvulos (Page 1990).

El grupo respecto al cual se han generado más diferencias interpretativas es el orden Gnetales, que está conformado por las familias Ephedraceae, Gnetaceae y Welwitschiaceae. Debido a que no hay acuerdo acerca de cuáles componentes vegetales forman parte del eje reproductivo, las estructuras femeninas de la familia **Ephedraceae** pueden ser interpretadas de dos maneras. Por un lado, se describen simplemente como una nucela cubierta por dos tegumentos asociados axilarmente a una bráctea (Page 1990) y por otro lado como un eje con aproximadamente seis apéndices estériles decusados y con dos óvulos axilares tegumentados (Endress 1996, Mundry y Stutzel 2004). La primera interpretación, implica que los ejes de las

efedráceas son simples -porque no tienen escamas estériles-, bilaterales y con una ligera dorsoventralización. La segunda interpretación implica que los ejes son compuestos, bilaterales y sin dorsoventralización. En la familia **Gnetaceae** las unidades reproductivas se desarrollan asociadas a una estructura verticilada denominada collar y están conformadas únicamente por una nucela cubierta por tres tegumentos, es radial y sin dorsoventralización (Price 1996). Finalmente, en la familia **Welwitschiaceae** la unidad reproductiva femenina está conformada por un par de brácteas asociadas a una nucela con dos tegumentos, de los cuales el más externo se desarrolla formando las alas de las semillas (Page 1990, Mundry y Stutzel 2004). Debido a que en Gnetaceae se observan tres tegumentos rodeando a la nucela, mientras que en Ephedraceae y Welwitschiaceae sólo hay dos y uno de ellos está alimentado por dos haces vasculares, se ha argumentado que en estas dos familias se han fusionado dos capas de tegumentos y el estado ancestral es la presencia de tres tegumentos (Endress 1996, Mundry y Stutzel 2004).

La posición axilar respecto a una bráctea de las escamas ovulíferas de las coníferas indicaría que estas estructuras son homólogas a los ejes axilares descritos en Gnetales o los óvulos terminales en *Ginkgo*, sin embargo, la posición lateralizada e invertida del óvulo dificulta esta interpretación, ya que la escama ovulífera podría ser homóloga a una megasporófila cuyos haces vasculares se han multiplicado. Intuitivamente, el análisis del registro fósil podría ser de utilidad para determinar el origen y las secuencias de cambio morfológico y efectivamente, las hipótesis relativas al origen de la escama ovulífera están basadas en comparaciones con taxa extintos que hipotéticamente corresponden a los ancestros de las coníferas modernas.

Interpretación del registro fósil y las hipótesis paleobotánicas del origen de la escama ovulífera

En la primera mitad del Siglo XX, el paleobotánico sueco Rudolf Florin realizó un análisis detallado de la morfología de coníferas modernas y de estructuras fósiles del Paleozoico y Mesozoico con afinidades coniferofíticas. Las observaciones y análisis de Florin (1951-1963) sustentaron la hipótesis de que las escamas ovulíferas de las coníferas modernas se derivaron de ejes reproductivos compuestos por apéndices libres estériles y fértiles, arreglados helicoidalmente a lo largo de una rama. A pesar de que las hipótesis de Florin siguen teniendo

vigencia, sobre todo en el marco de los patrones del desarrollo vegetal, algunos autores han diferido de las interpretaciones morfológicas (Schweitzer 1963), taxonómicas (Clement-Westerhof 1988) y en el tipo de estructuras que pudieron haber dado origen a los múltiples haces vasculares de las escamas ovulíferas contemporáneas (Meyen 1984).

Existen diferentes clasificaciones de coníferas fósiles, sin embargo, en general se reconocen los siguientes grupos principales. Las coníferas del Carbonífero Superior-Pérmico Inferior (CS-PI) que se distribuyen particularmente en el hemisferio norte y que poseen ejes reproductivos femeninos con simetría bilateral, con diferentes grados de compresión dorsoventral y múltiples escamas fértiles y estériles, son denominadas en general como walchias –Walchiaceae (Clement-Westerhof 1988), *cf.* Utrechtiaceae (Mapes y Rothwell 1991)-. Las coníferas dominantes del Pérmico Superior-Triásico Inferior (PS-TI), también del hemisferio norte, con ejes ovulíferos con marcada dorsoventralidad y diferentes grados de reducción en número y fusión de apéndices son agrupadas en las familias Majonicaceae (Clement-Westerhof 1988) y Voltziaceae (Florin 1951). La flora de Angara, descrita por Meyen (1984 y 1987), se distribuye en Europa Oriental durante el Pérmico, y es caracterizada por ejes reproductivos femeninos radiales, con apéndices libres o ligeramente connados y múltiples escamas fértiles. Finalmente, la flora de Gondwana, distribuida en el hemisferio sur durante el Pérmico y cuyos ejes reproductivos presentan un reducido número de apéndices fértiles y estériles, con diferentes grados de fusión (Clement-Westerhof 1988).

Además de los grupos con claras afinidades coniferofíticas, es importante mencionar al orden Cordaitales, que es el grupo con afinidades gimnospérmicas más antiguo (Beck y Wight 1988), cuyos primeros registros aparecen hace 325 millones de años y se extienden hasta principios del Carbonífero Superior (Beck 1966). Para Florin, los estudios anatómicos en las estructuras de este grupo, fueron la base para el planteamiento hipótesis relativas al origen de las escamas ovulíferas contemporáneas y de acuerdo con sus interpretaciones paleobotánicas, los ejes reproductivos femeninos modernos, se derivaron de este tipo de estructuras a través de eventos de cambio morfológico como dorsoventralización, polaridad, fusión y reducción en número de componentes de cada eje femenino (Florin 1951, Florin 1954).

Los ejes reproductivos de *Cordaianthus pseudofluitans* tienen simetría radial, están compuestos por escamas estériles arregladas helicoidalmente y un par de escamas fértiles que portan terminalmente un par de óvulos pedunculados ligeramente recurvados. Estos ejes se

encuentran asociados adaxialmente a una bráctea formando un complejo que se distribuye en un eje de crecimiento secundario (Figura 5). Florin establece que las coníferas del Carbonífero Superior –basándose principalmente en observaciones del género *Lebachia* (cf. *Walchia*, Clement-Westerhof 1988)- se derivaron de las cordaitales. Dichas coníferas del Carbonífero Superior-Pérmico Inferior, portan ejes reproductivos similares a los de las Cordaitales del Carbonífero Inferior, pero con cierto grado de compresión dorsoventral y polarización –por lo tanto, estos ejes son bilaterales- y uno más apéndices fértiles que portan un óvulo terminal lateralizado por recurvamiento (Figura 5).

Una modificación adicional en la transición a las escamas ovulíferas lignificadas, en el planteamiento de Florin, está representado en las estructuras tipo *Voltzia* (Voltziaceae) *Pseudovoltzia* (Majonicaceae; Clement-Westerhof 1988), del Pérmico Superior-Triásico Inferior. Las estructuras reproductivas femeninas correspondientes a estos periodos, presentan marcada dorsoventralidad y lateralización del óvulo –producto del recurvamiento de la megasporófila-, reducción en el número de apéndices estériles y mayor grado de fusión de las estructuras estériles del eje (Figura 5).

Este esquema de transformación morfológica permite establecer la identidad de la escama ovulífera como un eje reproductivo de crecimiento determinado, cuyos componentes estériles y fértiles se encuentran fusionados, lo cual es congruente con la presencia de una sección estéril en la escama alimentada por múltiples haces vasculares, con la posición axilar respecto a la bráctea y con la forma de las escamas ovulíferas de la especie moderna *Cryptomeria japonica*, que presenta escamas compuestas por cinco apéndices libres. Florin, es ambiguo respecto al destino de los apéndices estériles de las coníferas ancestrales, ya que por un lado sugiere que los haces vasculares de la sección estéril, observados en las familias modernas, son vestigios de las escamas estériles ancestrales (Florin 1951). Por otro lado, también sugiere que las escamas ovulíferas modernas son el resultado de la reducción en número de los apéndices estériles y por lo tanto son homólogas a una sola escama estéril cuyos haces vasculares se han multiplicado y ramificado (Florin 1951).

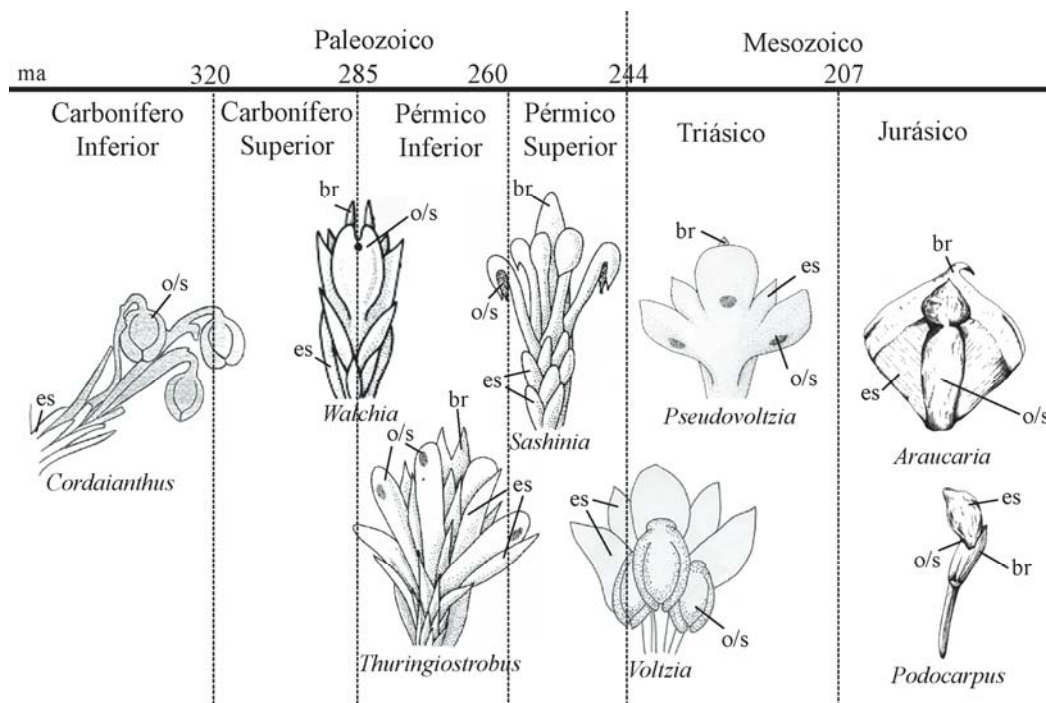


Figura 5. Distribución temporal de fósiles con afinidades coniferales. br, bráctea; es, componentes estériles del eje (apéndices o escamas); o/s, óvulo o semilla. Basado en Florin (1951) y Clement-Westerhof (1988).

A pesar de que Florin plantea una hipótesis de cambio morfológico que es en general transicional, también postula ciertas relaciones particulares que implican patrones de divergencia filogenética. Por ejemplo, plantea que los ejes de los podocarpos pudieron haber divergido a partir de estructuras tipo *Ernestiodendron* (Walchiaceae) durante el Pérmico Inferior (Florin 1951) y el resto de las coníferas se derivaron de estructuras tipo *Lebachia* (cf. *Walchia*). Sin embargo, algunos de estos planteamientos son incongruentes con las hipótesis de relaciones filogenéticas de los taxa modernos (ver sección: *La filogenia de las gimnospermas*).

La principal objeción a las observaciones de Florin tiene que ver con la interpretación de la posición del óvulo respecto a la megasporófila. Schweitzer (1963), basado en la documentación de la trayectoria de los haces vasculares en estructuras fósiles, plantea que los óvulos de *Pseudovoltzia*, se encuentran adnados abaxialmente (respecto al eje reproductivo individual) a una estructura foliar fértil, en lugar de ser óvulos recurvados pedunculados unidos terminalmente a una megasporófila. Las observaciones de Schweitzer dificultan el

planteamiento de relaciones de ancestría entre las walchias y las coníferas del PS-TI y ciertas familias modernas, debido a que tanto en Walchiaceae, como en Taxaceae y Phyllocladaceae, los ejes femeninos portan óvulos terminales. La interpretación de Schweitzer respecto a la posición de los óvulos es retomada por Clement-Westerhof (1988) para Walchiaceae, cuyas observaciones sugieren que también en este grupo los óvulos invertidos están unidos lateralmente a una escama fértil y son abaxiales respecto al eje reproductivo. En este caso, tales observaciones ponen en duda las relaciones entre Walchiaceae y Cordaitales.

Esta controversia introducida por Schweitzer lleva a Meyen (1984) a plantear una nueva versión de la hipótesis, basada en restos paleobotánicos de la flora de Angara, específicamente considerando al género *Sashinia*, del Pérmico Superior. Meyen, plantea que los ejes reproductivos femeninos tipo *Pseudovoltzia* se derivaron ejes tipo *Sashinia*, compuestos básicamente por una serie de apéndices múltiples pedunculados que portan óvulos abaxialmente y una serie de escamas estériles basales, arregladas radialmente (Figura 6b). De acuerdo a esta hipótesis, la transición entre estos dos tipos de ejes reproductivos (*Sashinia* y *Pseudovoltzia*) implica un estado hipotético en el cual se observa una polarización del eje de tercer orden, donde las megaesporófilas abaxiales (respecto al eje de segundo orden) pierden la fertilidad y una ocurre una dorsoventralización y fusión de órganos del eje (Figura 6c). Lo anterior implicaría que los haces vasculares de las escamas contemporáneas se derivaron de pedúnculos ancestrales fértiles y no necesariamente de estructuras originalmente estériles. Similarmente, Clement-Westerhof (1988) plantea un tipo de transición similar, sustituyendo a *Sashinia* por el género *Thuringiostrobus*.

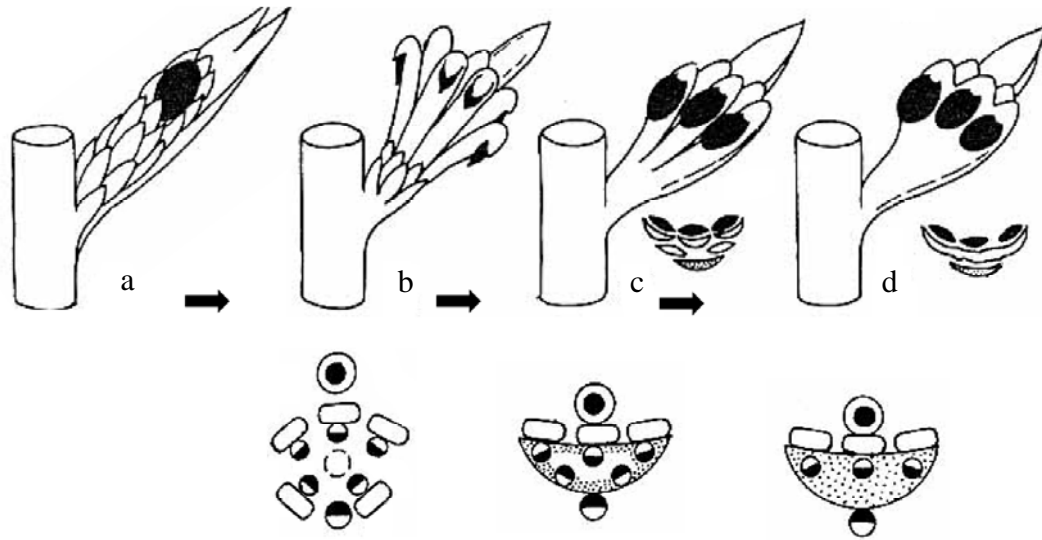


Figura 6. Serie de transformaciones propuesta por Meyen (1984) implicadas en el origen de la escama ovulífera moderna. (a) *Walchia*, (b) *Sashinia*, (c) estado hipotético, (d) *Pseudovoltzia*. Abajo de cada eje se observa un esquema de secciones transversales, donde los círculos con la mitad negra representan haces vasculares, los rectángulos blancos los óvulos y el círculo negro dentro del blanco el eje del cono. Modificado de Meyen (1984).

Los hallazgos paleobotánicos recientes muestran que la diversidad de las coníferas fósiles fue mucho mayor que la considerada por Florin, ejemplo claro de ello son los trabajos de Hernández-Castillo et al. (2001) y de Rothwell et al. (2005). Sin embargo, la distribución espacio-temporal y las formas de estos fósiles no generan incongruencias con las hipótesis de Florin, debido a que en general dichas formas son identificables con aquellas consideradas en su planteamiento. Por ejemplo, en el género fósil con estróbilos masculinos compuestos, *Thucydia*, distribuido en Norte América durante el Carbonífero Superior (Hernández-Castillo et al. 2001), al igual que en otros géneros del Paleozoico Superior, los ejes reproductivos femeninos se arreglan helicoidalmente a lo largo de un eje indeterminado, cuyo meristemo apical puede continuar desarrollándose como un eje vegetativo, es decir, no hay formación de conos determinados, sino que los ejes reproductivos se encuentran en zonas fértiles del árbol (Rothwell y Mapes 2001). En este caso, los ejes reproductivos individuales son similares a los de las walchias y la falta de determinación del cono no corresponde necesariamente a un estado ancestral, ya que se ha observado la pérdida de la determinación del cono en pináceas modernas como la variedad “Acrocona” *Picea abies*, bajo condiciones de estrés hídrico. Otros hallazgos paleobotánicos, como por ejemplo las estructuras reproductivas femeninas del

género del Triásico *Conewagia* (Axsmith et al. 1998), que están compuestas por ejes de tercer orden determinados y que portan múltiples órganos estériles sin fusión alguna, ponen en evidencia que los patrones de cambio evolutivo respecto a la fusión y pérdida de órganos no son lineales y que las reversiones y convergencias son comunes en la evolución morfológica de las coníferas.

Finalmente, se han planteado diferentes esquemas de transición morfológica relativos al origen de la escama ovulífera, que pueden resumirse en dos hipótesis alternativas: a) la propuesta de Florin, que implica que las familias modernas divergieron durante el CS-PI, a partir de estructuras reproductivas tipo Walchiaceae y cuyos estados intermedios se encuentran en los fósiles del PS-TI, y b) Las propuestas de Meyen (1984) y Clement-Westerhof (1988), que sugieren una divergencia durante el Pérmico Superior-Triásico Inferior, a partir de estructuras tipo *Pseudovoltzia*, con un paso previo tipo *Sashinia*,

El planteamiento de hipótesis de relaciones táxicas y de cambio morfológico entre las coníferas fósiles y las modernas ha sido abordado por diferentes autores, sin embargo, dichas hipótesis no han sido elaboradas en general en el marco de una filogenia (*v.gr.* Florin 1951, Clement-Westerhof 1988, Meyen 1984). En fechas más recientes, se han utilizado matrices de caracteres morfológicos para inferir, hipótesis de relaciones táxicas entre coníferas contemporáneas y fósiles (Crane 1985, Miller 1988, Miller 1999). En general, los resultados de estos análisis tienen congruencia con las hipótesis de Florin, sin embargo, las topologías resultantes, contrastan con las hipótesis de relaciones filogenéticas basadas en secuencias génicas, para las familias de coníferas modernas (ver siguientes secciones), probablemente debido a las incongruencias generadas por caracteres morfológicos homoplásicos.

Una aproximación práctica para determinar los patrones evolutivos del cambio morfológico de las plantas con semilla es la reconstrucción de filogenias basadas en caracteres independientes de la determinación de la homología de estructuras vegetales, es decir, en caracteres moleculares. A pesar de que este tipo de información ha generado hipótesis contradictorias y no permite incluir datos de los ancestros fósiles, mediante el mapeo de caracteres dicho contexto filogenético permite evaluar independientemente las secuencias de cambio de caracteres morfológicos en un marco de relaciones de ancestría común.

La aplicación del concepto de homología en estructuras reproductivas femeninas de las coníferas y el análisis de la evolución de caracteres morfológicos discretos.

Para obtener un panorama general de la evolución de caracteres morfológicos de las estructuras reproductivas femeninas de las coníferas a través del acoplamiento de las hipótesis de transformación de caracteres y los patrones filogenéticos, se requiere por un lado, contar con una filogenia bien resuelta y sólidamente apoyada, y por otro, un análisis detallado de los caracteres a evaluar. El análisis de caracteres morfológicos implica principalmente el reconocimiento de la homología de caracteres, la identificación de caracteres discretos y la determinación de estados de carácter (Wake 1994).

La homología siempre es postulada a través de la comparación, por lo tanto ésta es siempre relativa. Esto implica que ciertas estructuras pueden ser homólogas en cierto nivel y no en otro (Sattler 1988). Además, de acuerdo con Rieppel (1993), existen dos tipos de homología filogenética: la táxica y la transformacional. Los caracteres derivados sin modificación exclusivos de un grupo -sinapomorfías-, son caracteres con homología táxica. En el marco de las relaciones filogenéticas, se pueden hacer conjeturas de transformación de caracteres, a partir de las cuales se pueden plantear hipótesis de homología transformacional. Esto implica que una condición previa -plesiomorfía- se modifica en una condición posterior -apomorfía- y que ambas se heredaron de un ancestro común (DeLuna y Mishler 1996). Para ejemplificar, en el nivel de organización de órganos, se ha determinado que existe una homología entre el follaje y las brácteas, ya que ambas son estructuras foliares. En el nivel inferior, tomando en cuenta las subcategorías de filomas, es decir de estructuras foliares, las brácteas y el follaje no son consideradas estructuras homólogas (Sattler 1988) y desde el punto de vista de Rieppel, se considerarían homólogas transformacionalmente. Otro ejemplo, dentro de las coníferas, el epimacio asociado al óvulo de Podocarpaceae se considera homólogo transformacionalmente a la escama ovulífera, mientras que las escamas ovulíferas de Araucariaceae y Pinaceae se consideran homólogas táxicamente, por las relaciones entre las familias y las pocas modificaciones que se observan entre estas estructuras.

Hay un acuerdo general en cuanto a una división de categorías estructurales de la organización vegetal: tallo, hojas, raíz y estructuras reproductivas (Sattler 1988); pero esta división morfológica se vuelve un tanto obsoleta en el contexto ontogenético, principalmente porque esta división no toma en cuenta la evolución de los patrones del desarrollo vegetal.

Entonces, establecer hipótesis de homología fuera del marco de las relaciones filogenéticas se vuelve una tarea difícil debido a las particularidades de la evolución de la morfología vegetal. Existe evidencia de que durante la evolución de las plantas se han presentado distintas combinaciones de los patrones del desarrollo de las diferentes categorías estructurales (Sattler 1994). Sattler (1988) se refiere a estas combinaciones de patrones, como "hibridización del desarrollo", ya que permiten la aparición de estructuras híbridas, inclusive de categorías estructurales diferentes, como podría ser el caso de las escamas ovulíferas de las coníferas. Desde este punto de vista, la diversificación morfológica, se debe a una diversidad en las combinaciones de los procesos ontogenéticos, mientras que la evolución de patrones del desarrollo se debe a cambios en las combinaciones de dichos procesos durante la ontogenia y la filogenia (Sattler y Rutishauser 1997).

El patrón general de diferenciación del meristemo apical de las plantas con semillas permite determinar estructuras de referencia para el establecimiento de la homología transformacional. El meristemo apical, a partir del cual se forman todas las estructuras vegetales excepto la raíz, está conformado por un grupo de células indiferenciadas centrales, encargadas de mantener el meristemo y del crecimiento del tallo de primer orden, y por un grupo de células periféricas a partir de las cuales se forman los primordios de órganos -hojas y flores en angiospermas-, mientras que los ejes laterales se desarrollan generalmente en las axilas de un órgano foliar (Ma 1998). Bajo este principio, es posible establecer como órganos de referencia a las brácteas de los conos megasporangiados de las coníferas y por lo tanto las escamas ovulíferas que se desarrollan en sus axilas, son homólogas a ejes laterales de crecimiento determinado, sin embargo, son pocas las evidencias para establecer a qué tipo de órganos del eje son homólogos transformacionalmente las estructuras fusionadas presentes en las escamas ovulíferas.

Entonces, en el contexto de la filogenia, es posible determinar cuales estructuras tienen homología táxica, y la utilización de órganos de referencia permite plantear hipótesis de transformación. Una vez establecida la homología de caracteres, es posible regresar a la filogenia para probar hipótesis evolutivas mediante el establecimiento de secuencias de cambio (adquisición y pérdida de caracteres), la inferencia de caracteres ancestrales y la correlación de caracteres.

De acuerdo con Grande y Rieppel (1994), los patrones macroevolutivos se dividen en dos tipos. Por un lado, los patrones jerárquicos son aquellos que representan las relaciones filogenéticas. Por otro lado, los patrones de secuencia temporal describen secuencias de cambio lineal, como las secuencias de cambio de estados de carácter. Debido a que las filogenias no son sólo postulados acerca de las relaciones entre los taxa, sino que también implican hipótesis de evolución de caracteres, dichos postulados, a su vez, pueden sugerir hipótesis causales acerca de cómo ocurren los cambios de caracteres de una manera particular (Brooks y McLennan 1991). Es decir, mediante el mapeo de caracteres morfológicos, las filogenias moleculares pueden ser utilizadas como plantillas para reconstruir el patrón histórico de origen y diversificación de caracteres y para la inferencia de caracteres ancestrales.

La reconstrucción de caracteres ancestrales, que ha sido una técnica ampliamente usada para probar hipótesis adaptativas a nivel filogenético, mediante el uso del método comparativo (Harvey y Pagel 1991, Losos 1999), puede también usarse en la inferencia de caracteres genéticos (Chang 2003, Rossnes et al. 2005) ó morfológicos (Miller y Venable 2003, Sánchez-Baracaldo et al. 2005) de un último ancestro común de dos clados divergentes y subsecuentemente para probar hipótesis de ancestría mediante la comparación con grupos fósiles (Marshall y Schultze 1992). Generalmente, para la inferencia de caracteres morfológicos discretos se ha aplicado el método de máxima parsimonia, el cual se basa en el mapeo de caracteres sobre una filogenia y la comparación de los grupos externos con los descendientes del nodo a estimar, asumiendo probabilidades iguales para las ganancias y pérdidas de caracteres (Swofford y Maddison 1987, Maddison, 1992). Este método puede conducir a inferencias equívocas cuando las tasas de evolución son muy rápidas y cuando las probabilidades de pérdidas y ganancias de caracteres no son iguales (Cunningham et al. 1998), y no permite establecer el grado de incertidumbre en el estado ancestral para cada nodo. En contraste, los métodos de máxima verosimilitud (Cunningham 1999, Pagel 1994) y las inferencias Bayesianas (Pagel et al. 2004, Ronquist 2004) permiten establecer la incertidumbre de cada nodo, aunque requieren un modelo evolutivo que especifique la tasa de cambio entre estados de carácter. Una vez inferidos, el conjunto de estados de carácter ancestrales se puede considerar como un *ancestro hipotético*, sin embargo es probable que las características inferidas no coincidan perfectamente con ningún organismo, fósil o viviente.

En otro contexto, el estudio de los procesos subyacentes a los patrones de distribución filogenética de estructuras fenotípicas complejas en animales ha permitido, en fechas recientes, sustentar hipótesis de homología transformacional que antes únicamente se planteaban en términos especulativos. Lo anterior se ha conseguido mediante el análisis de las diferencias en los patrones de expresión de genes reguladores del desarrollo; ejemplo de ello son los trabajos de Averof y Cohen (1997) y Averof y Patel (1997) enfocados en el origen de los apéndices en artrópodos, y de Kramer e Irish (2000) Bharathan et al. (2002), los cuales buscan homología entre los pétalos y los estambres o en hojas. En general, estos métodos se basan en el supuesto de que la expresión de un gen regulador o de una red de regulación se conservará en estructuras nuevas y aunque la homología de estructuras divergentes no puede ser probada con toda certeza, ya que genes individuales pueden adquirir diferentes funciones en contextos filogenéticos y del desarrollo distintos, los resultados obtenidos mediante este tipo de estudios representan una evidencia sólida de los cambios genéticos que subyacen a las innovaciones morfológicas.

La filogenia de las gimnospermas

Para el planteamiento de hipótesis de cambio morfológico de las estructuras reproductivas de coníferas, es necesario tomar en cuenta las relaciones de ancestría común de acuerdo a una filogenia. La inferencia filogenética basada en caracteres nucleotídicos elimina la dificultad de establecer hipótesis de homología entre estructuras morfológicas divergentes y permite realizar análisis independientes de evolución de caracteres morfológicos, evitando la circularidad de los resultados. Además, el uso de caracteres moleculares permite, mediante la estimación de tasas de evolución molecular y datos del registro fósil, fechar el tiempo de divergencia de las especies.

En general, las hipótesis de relaciones táxicas de familias coniferales modernas basadas en secuencias génicas son congruentes entre sí, incluso utilizando diferentes métodos de inferencia filogenética y secuencias provenientes de diferentes organelos celulares (Chaw et al. 1997, Stefanovic et al. 1998, Bowe et al. 1999, Chaw et al. 2000, Rydin et al. 2002, Soltis et al. 2002). En contraste, el uso de diferentes genes y de diferentes métodos de reconstrucción conduce a incongruencias respecto a las relaciones entre los cinco linajes de plantas con semilla vivientes, es decir las relaciones de los cuatro órdenes de gimnospermas (Ginkgoales, Cycadales, Gnetales, Coniferales) y las angiospermas (Chaw et al. 1997,

Stefanovic et al. 1998, Bowe et al. 1999, Chaw et al. 2000, Magallón y Sanderson 2002, Rydin et al. 2002, Soltis et al. 2002, Burleigh y Mathews 2007a y 2007b).

En particular la posición de Gnetales es ambigua, ya que en diferentes reconstrucciones aparece como grupo hermano de las coníferas (Chaw et al. 1997, Bowe et al. 2000, Rydin et al. 2002, Rydin y Källersjö 2002) o como grupo hermano de Pinaceae –arreglo que es denominado *gne-pine hypothesis* (Bowe et al. 2000, Chaw et al. 2000, Sanderson et al. 2000, Gugerli et al. 2001, Magallón y Sanderson 2002, Burleigh y Mathews 2004). También se han reportado filogenias donde las gnetales aparecen como el grupo más tempranamente divergente entre las gimnospermas vivientes (Schmidt y Schneider-Poetsch 2002) y topologías donde se pone en duda la monofilia de las gimnospermas, con Gnetales como grupo hermano de las angiospermas –arreglo que es denominado “hipótesis antofita” (Stefanovic et al. 1998, Rydin et al. 2002) o como el grupo hermano de todas las plantas con semilla (Chaw et al. 2000, Magallón y Sanderson 2002, Rydin et al. 2002).

Para resolver inconsistencias entre diversas reconstrucciones, se ha planteado que los análisis simultáneos pueden representar una herramienta poderosa para lograr un consenso entre topologías incongruentes (Nixon y Carpenter 1996). Por lo tanto, mediante la combinación, puede obtenerse la información requerida para resolver relaciones profundas y superficiales de la filogenia de las coníferas, uniendo matrices nucleotídicas de evolución lenta y rápida, además de que el incremento en el número de caracteres informativos en la matriz aumenta la confiabilidad de las hipótesis de relaciones táxicas (Nixon y Carpenter 1996, Rydin et al. 2002, Soltis et al. 2002). Intuitivamente, la suma de datos podría aumentar la resolución de las ramas de la filogenia, sin embargo, puede ocurrir que la adición de matrices incongruentes entre sí -es decir matrices cuyos datos apoyen diferentes relaciones entre las ramas- conduzca a reconstrucciones erróneas (Burleighs y Mathews 2007a) .

Se ha argumentado que las incongruencias entre estas hipótesis de divergencia son atribuibles a la atracción de ramas largas o a la saturación de la señal de las terceras posiciones y de las transiciones (Bowe et al. 2000, Sanderson et al. 2000, Rydin et al. 2002, Soltis et al. 2002), a sesgos en el muestreo de taxa (Rydin y Källersjö 2002), a señales independientes determinadas por el organelo de origen del gen (Rydin et al. 2002, Soltis et al. 2002) o a diferencias en la metodología de reconstrucción empleada (Soltis et al. 2002, Burleigh y Mathews 2004 y 2007b). Los trabajos de Burleigh y Mathews (2004, 2007a y

2007b) muestran que la heterogeneidad en la señal filogenética entre loci no es atribuible a las diferencias en el organelo de origen de cada gen o al muestreo de taxa y que no existe evidencia de que la heterogeneidad en la tasa de evolución entre linajes o genes afecte los análisis filogenéticos de máxima verosimilitud. Las inferencias de máxima verosimilitud basadas en matrices concatenadas de 12 genes favorecen la hipótesis *gne-pine*, mientras que las reconstrucciones con máxima parsimonia o las que incluyen únicamente sitios rápidos favorecen la hipótesis de Gnetales como grupo hermano de todas las plantas con semilla (Burleigh y Mathews 2007a y 2007b). De acuerdo con los análisis de *bootstrap* paramétricos, la hipótesis *gne-pine* es la más corroborada por diferentes loci y la matriz de concatenada de 12 genes (Burleigh y Mathews 2007b). Sin embargo los caracteres morfológicos no sustentan plenamente la relación de hermandad entre Pinaceae y Gnetales, ya que este arreglo implicaría escenarios de evolución paralela o bien de pérdida de caracteres en Gnetales (Hart 1987, Burleigh y Mathews 2004)

Inferencia del tiempo de divergencia

Una vez establecida una hipótesis filogenética con base en caracteres nucleotídicos, es posible utilizar los mismos marcadores moleculares para establecer tiempos de divergencia entre linajes. Basándose en estudios comparativos de secuencias de aminoácidos, Zuckerkandl y Pauling (1965) propusieron la hipótesis del reloj molecular, la cual postula que la tasa de evolución de una proteína es aproximadamente constante a través del tiempo. Tal postulado implica la posibilidad de estimar tiempos de divergencia entre linajes, utilizando el número de diferencias de un gen entre dos ramas como un reloj molecular. Sin embargo los análisis comparativos de secuencias nucleotídicas han revelado que la constancia en la tasa de evolución de un gen entre linajes debe de ser probada, ya que las variaciones en la tasa de mutación, la selección natural, el tamaño efectivo de la poblacional y el efecto del tiempo generacional pueden afectar la constancia en la tasa de evolución e impiden establecer un reloj molecular (Ayala et al. 1996, Ayala 1999, Bromham y Penny 2003).

Entonces, para aplicar el reloj molecular, es necesario probar la constancia de tasas entre linajes. Cuando se encuentran linajes heterogeneos es posible eliminar dichas ramas para establecer el reloj, sin embargo esta solución implica pérdida de información. En años recientes se han propuesto diversas metodologías que permiten establecer relojes locales o

penalizar la heterogeneidad en determinadas ramas de una filogenia para calcular tiempos de divergencia sin asumir constancia en las tasas. De estos métodos, destaca el desarrollado por Sanderson (2002) llamado *Penalized Likelihood* (PL), el cual se basa en un modelo que constriñe las fluctuaciones de tasas de sustitución con una penalización para la “rugosidad”, es decir para la velocidad a la que varían las tasas entre ramas vecinas. La penalización se expresa como un parámetro de suavidad que es determinado a partir de una prueba de validación cruzada y que permite analizar linajes con cambios que pueden ser altamente penalizados (donde las tasas son casi constantes) y otros con heterogeneidad entre linajes. Entonces, para datos que se comportan de acuerdo al modelo de reloj molecular se obtienen valores de penalización altos (Sanderson 2002, Rutschmann 2006).

La determinación de tiempos de divergencia junto con las topologías filogenéticas nos brindan evidencia para probar hipótesis paleontológicas, ya que el tiempo calculado en el que existió el último ancestro común de dos linajes divergentes puede ser comparado con el tiempo durante el cual existieron los grupos involucrados en tales hipótesis. Por un lado, de acuerdo con Florin, pudo haber derivado a partir de un ancestro tipo *Walchia* durante el Carbonífero Superior-Pérmico Inferior y por otro lado de acuerdo con Meyen, el ancestro correspondería a un tipo *Voltzia* y la divergencia ocurriría durante el Pérmico Superior-Trásico Inferior. Debido a la incertidumbre relativa a las relaciones taxónicas dentro del clado de las gimnospermas, en este trabajo se presenta un análisis filogenético usando secuencias publicadas, correspondientes a cuatro genes nucleares y de cloroplasto, que son comúnmente utilizados en sistemática vegetal. Dicha filogenia se usó como templado para la validación de hipótesis paleobotánicas relativas al origen de la escama ovulífera, por un lado, estimando el tiempo de divergencia de las pináceas y el resto de las coníferas y por otro lado, mapeando sobre dicha filogenia, caracteres morfológicos de estructuras reproductivas de coníferas vivientes para reconstruir los caracteres del último ancestro común de las coníferas. La filogenia se usó también como restricción para la reconstrucción de una filogenia morfológica que incluye a los organismos fósiles para encontrar evidencias respecto a los eventos de divergencia entre los organismos propuestos como ancestros de las coníferas modernas.

Materiales y Métodos

Filogenia de las coníferas modernas

Para la inferencia filogenética, se obtuvo una matriz combinada de marcadores moleculares con secuencias obtenidas del Genbank, de dos genes nucleares y dos genes de cloroplasto -los genes ribosomales nucleares 18S (18S rDNA) y 26S (26S rDNA), y los genes de cloroplasto *ribulosa 1,5-bifosfato carboxilasa (rbcL)* y *maturasa K (matK)*- de 23 géneros representativos de las nueve familias de coníferas y de los restantes 3 órdenes de gimnospermas (Tabla 1). Las alineaciones se realizaron a mano en el programa Se-AL 1.0 (Rambaut 1996) y posteriormente se eliminaron las 3as posiciones del codón del gen *rbcL* y todos los sitios no informativos para parsimonia. Para la búsqueda del árbol más parsimonioso se realizó una búsqueda heurística con 100 réplicas de adición al azar y un intercambio de ramas TBR considerando los *gaps* como 5to estado de carácter, incluso cuando los *gaps* abarcaron más de un sitio, como está implementado en el programa PAUP* 4.0b (Swofford 2000). Para conocer el apoyo estadístico de las ramas se efectuó un análisis de *bootstrap* con 500 réplicas y los mismos parámetros de búsqueda usados para la reconstrucción.

Reconstrucción de caracteres ancestrales y reconstrucción filogenética con caracteres morfológicos.

Para inferir los caracteres morfológicos del último ancestro común de las coníferas se utilizó el programa MacClade 4.02 (Maddison y Maddison 2001), en el cual se construyó una matriz de caracteres morfológicos de los ejes reproductivos femeninos de las familias modernas de coníferas y representantes de los otros órdenes de gimnospermas como grupos externos, la reconstrucción se basó en las interpretaciones de Aase (1915), Florin (1954), Endress (1996), Nixon y Carpenter (1996), Stützel y Rößwemkamp (1999), Tomlinson y Takaso (2002), Mundry y Stützel (2004) y observaciones propias.

Los caracteres incluidos fueron (1) simetría del eje, (2) compresión dorsoventral, (3) número de apéndices estériles, (4) fusión de la bráctea y el eje reproductivo, (5) proporción

Tabla 1. Especies, secuencias y números de acceso al *Genbank*, usados en los análisis filogenéticos y de estimación del tiempo de divergencia.

Taxa	18S rDNA	26S rDNA	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>
------	----------	----------	-------------	-------------

grupo externo	<i>Equisetum hyemale</i>	U18500	U90713		
Angiospermas	<i>Oryza sativa</i>	AF069218	M19228	AF148650	D00207
	<i>Lycopersicon esculentum</i>	X51576	X13557		L14403
Ginkgoales	<i>Ginkgo biloba</i>	AB029355	U90672		AJ235804
Cycadales	<i>Cycas circinalis</i>				L12674
	<i>Cycas revoluta</i>	AB029356	U90673		
	<i>Cycas panzhihaensis</i>			AF143440	
	<i>Zamia furfuracea</i>		U90677		AF202959
	<i>Zamia pumila</i>	M20017			
Gnetales	<i>Gnetum gnemon</i>	U42416	U90710		L12680
	<i>Welwitschia mirabilis</i>	D85299	U90708		AJ235814
	<i>Ephedra nebrodensis</i>		U90709		
	<i>Ephedra sinica</i>	D38242			D10732
Pinaceae	<i>Abies grandis</i>		U90683 ²		
	<i>Abies lasiocarpa</i>	X79407		AB029664	
	<i>Abies veitchii</i>				AB015649
	<i>Pinus canariensis</i>				AB019823
	<i>Pinus cembra</i>		U90681	AB019832	AB019795
	<i>Pinus wallichiana</i>	X750802			
Phyllocladaceae	<i>Phyllocladus trichomanoides</i>	D38244			AF249654
Podocarpaceae	<i>Podocarpus costalis</i>	D38473			
	<i>Podocarpus gracilor</i>				X58135
	<i>Podocarpus macrophyllus</i>		U90685	AF228111	
	<i>Nageia nagi</i>	D16447			
Araucariaceae	<i>Araucaria agustifolia</i>		U90691		U96470
	<i>Araucaria excelsa</i>	D38240			
	<i>Agathis australis</i>		U90692		
	<i>Agathis borneensis</i>	D85302			AB027310
	<i>Agathis macrophylla</i>			AB023975	
Sciadopityaceae	<i>Sciadopitys verticillata</i>	D85292	U90698	AB023994	L25753
Taxaceae	<i>Taxus baccata</i>	X59453	U90695	AB023996	
	<i>Taxus mairei</i>	D16455			AB027316
	<i>Torreya grandis</i>		U90696		
	<i>Torreya nucifera</i>	D38249		AB030137	AB027317
Cephalotaxaceae	<i>Cephalotaxus harringtonia</i>		U90697	AB030138	
	<i>Cephalotaxus wilsoniana</i>	D38241			AB027312
Taxodiaceae	<i>Taiwania cryptomeroides</i>	D38250	U90700	AF152211	L25756
	<i>Cryptomeria japonica</i>	D85304	U90703	AF152184	L25751
Cupressaceae	<i>Juniperus communis</i>		U90705		
	<i>Juniperus conferta</i>			AF152197	L12573
	<i>Juniperus chinensis</i>	D38243			
	<i>Calocedrus decurrens</i>	D85293	U90707	AF152178	L12569

entre el eje y la bráctea, (6) proporción entre los apéndices estériles y el óvulo, (7) grado de fusión de los componentes del eje, (8) posición, (9) dirección y (10) número de óvulos (Apéndices 1 y 2). Los caracteres fueron mapeados en la filogenia para estimar los estados de carácter del último ancestro común, bajo el supuesto de máxima parsimonia. Aquellos nodos en los que el carácter ancestral resultó ambiguo, se resolvieron acelerando los cambios

(optimización ACCTRAN; Farris, 1970), lo cual implica que los cambios ocurrieron en los linajes basales y no en las ramas derivadas, lo cual es congruente con el registro fósil.

En el presente trabajo las estructuras portadoras de óvulos con crecimiento determinado, situadas en la axila de una bráctea fueron consideradas como homólogas a ejes reproductivos con crecimiento determinado. Los haces vasculares múltiples, característicos de las escamas ovulíferas de las coníferas modernas, fueron interpretado como remanentes de apéndices estériles, entonces, se consideró que el número aproximado de haces vasculares reflejaría el número de apéndices estériles en cada eje. La posición del óvulo fue codificada únicamente bajo un criterio topológico sin asumir que un evento evolutivo determinado causó el desplazamiento (polarización o recurvamiento). Debido a que la relación taxonómica de Gnetales con Coniferales es controversial, también se realizaron reconstrucciones de caracteres ancestrales considerando a Gnetales como grupo hermano de Pinaceae y como grupo hermano de todas las coníferas.

Con el objetivo de establecer la cercanía entre los taxa actuales y los fósiles, en la matriz se incluyeron coníferas fósiles (Apéndices 1 y 2) con base en las interpretaciones taxonómicas y morfológicas de Clement-Westerhorf (1988). Los taxa incluidos son (a) la familia Walchiaceae –Utrechtiaceae (Mapes y Rothwell 1991)- que incluye cuatro géneros del Carbonífero Superior-Pérmico Inferior, distribuidos en Europa, China y Norteamérica: *Walchia*, *Ernestiodendron*, *Otovicia* y *Ortiseia*. (b) La familia Majonicaceae, que incluye los géneros *Majonica*, *Dolomitia* y *Pseudovoltzia*, distribuidos en Europa durante el Pérmico Superior y los géneros (c) *Ullmania* (Pérmico Superior; Europa y China); (d) *Voltzia* (Pérmico Superior-Triásico Inferior; Europa) (e) *Sashinia* (Pérmico Superior; Europa Oriental) y (f) *Thuringiostrobus* (Carbonífero Superior-Pérmico Inferior; Europa). Para obtener la topología mas parsimoniosa se realizó una búsqueda de *branch and bound*, como esta implementada en PAUP*4.0b (Swofford 2000), restringiendo la búsqueda mediante la inclusión de la topología obtenida con caracteres moleculares como árbol *backbone* y considerando polimórficos los caracteres múltiples para cada taxa. Para evaluar el apoyo estadístico de las ramas se realizó una prueba de bootstrap de 100 réplicas mediante el algoritmo de búsqueda heurística con 10 réplicas de adición de taxa al azar

Estimación del tiempo de divergencia de las coníferas

Además de la matriz combinada para los cuatro genes, se generaron matrices de alineación independientes para cada uno de los genes. Usando el criterio de AIC, implementado en el programa Modeltest 3.06 (Posada y Crandall 1998), se seleccionó el modelo evolutivo que mejor se ajusta a cada una de las secuencias. Para obtener el modelo evolutivo más apropiado para la matriz combinada, se excluyeron los mismos caracteres que en el análisis filogenético (los sitios no informativos y las 3as posiciones de *rbcL*). Para esta parte del análisis, el gen *matK* fue excluido debido a la falta de secuencias representativas de todos los géneros (Tabla 1). Los parámetros de verosimilitud obtenidos en Modeltest se usaron para calcular la distancia de las ramas en PAUP*4.0 (Swofford 2000), usando el árbol de máxima parsimonia de caracteres nucleotídicos como restricción.

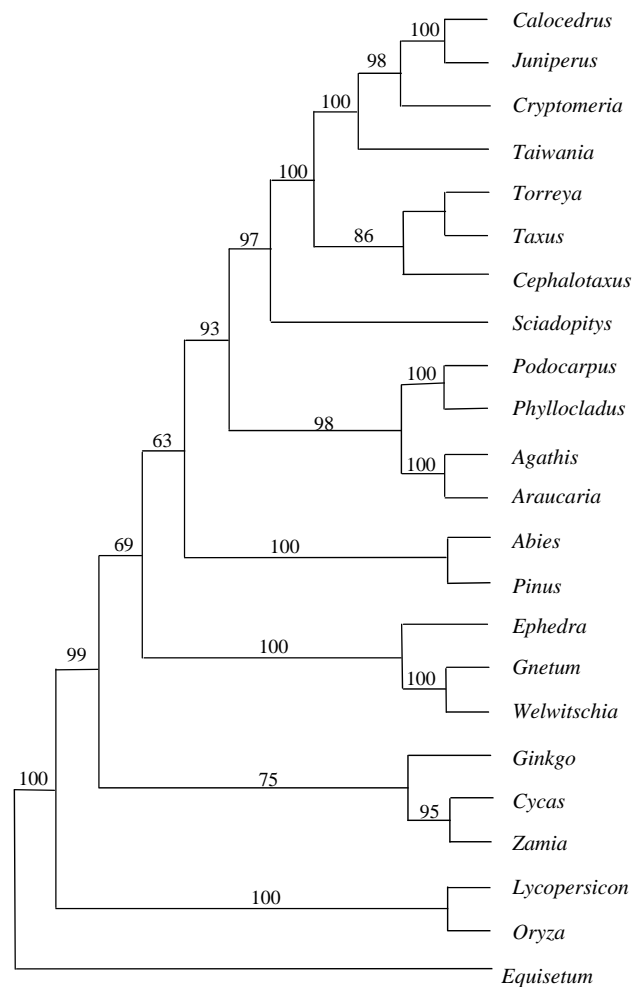
Para estimar el tiempo desde la divergencia entre Pinaceae y el resto de las coníferas, se aplicó el método de Verosimilitud Penalizada (*PL* por sus siglas en inglés; Sanderson 2002), implementado en el programa r8s 1.01 (Sanderson 2001). El parámetro de suavidad para cada secuencia fue obtenido usando un criterio de validación cruzada. Para fijar la edad de la divergencia entre angiospermas y gimnospermas, se usó la aparición de Cordaitanthaceae en el registro fósil -325 millones de años (ma; Beck 1966). Los primeros registros fósiles de *Pinus*, y Araucariaceae se usaron para establecer la edad de las divergencias *Abies-Pinus* y Araucariaceae-Podocarpaceae -140 ma y 200 ma, respectivamente (Alvin 1960, Stockey 1982).

Resultados

Filogenia de las coníferas

Se encontró un sólo árbol más parsimonioso, con base en los 688 sitios informativos de la matriz combinada. En general, todas las ramas que sostienen a las familias tienen un apoyo bootstrap mayor al 50%, sin embargo, la rama que sostiene a *Torreya* y *Taxus* no está bien soportada (Figura 7). La topología obtenida sugiere (a) la monofilia de las coníferas, (b) relación de grupos hermanos entre Gnetales y coníferas, (c) una relación de grupos hermanos entre Cycadales y *Ginkgo* y (d) monofilia de las gimnospermas.

Figura 7. Árbol más parsimonioso derivado de una matriz combinada de los genes 18S rDNA,



28S rDNA, *rbcL* y *matK*, encontrado con una búsqueda heurística y 100 réplicas de adición al azar. Los números arriba de las ramas corresponden a valores de bootstrap para 500 réplicas.

Identidad del último ancestro común de las coníferas modernas

La presencia de ejes reproductivos femeninos compuestos, bilaterales y dorsoventralmente comprimidos, compuestos por una sección estéril conspicua, es una condición plesiomórfica presente en Pinaceae, Araucariaceae, Sciadopityaceae, Taxodiaceae y Cupressaceae, con excepción de algunos miembros de Taxodiaceae, como *Cunninghamia lanceolata*, donde la parte estéril se encuentra extremadamente reducida. En contraste, la reducción de la porción estéril del eje, la pérdida de dorsoventralidad y la apariencia carnosa, son caracteres derivados que aparecen independientemente en las familias Phyllocladaceae-Podocarpaceae y en Cephalotaxaceae-Taxaceae (Figura 8).

El único carácter que resultó ambiguo para el nodo del último ancestro común de las coníferas modernas es el número de óvulos por eje reproductivo. Cuando este carácter es codificado binariamente con los estados de carácter presencia/ausencia (P/A), se tiene como resultado tres caracteres: (1) P/A de un óvulo, (2) P/A de dos óvulos y P/A de más de dos óvulos. Para los tres caracteres el estado ancestral resultó en ausencia. Cuando este carácter es codificado multiestado (0 = un óvulo, 1 = dos óvulos y 2 = más de dos óvulos), la reconstrucción resulta ambigua, pero si se utiliza la optimización ACCTRAN el estado ancestral resulta un óvulo (Figura 8).

Entonces el ancestro hipotético portaría ejes reproductivos bilaterales comprimidos dorsoventralmente, que se desarrollan libres de la bráctea. El eje está compuesto por más de cinco apéndices estériles fusionados que rebasan el ápice de la bráctea y un sólo ovulo invertido que no rebasa el ápice de los apéndices estériles. El único carácter afectado por la hipótesis *gne-pine* -donde Gnetales es un grupo hermano de Pinaceae- es el número de apéndices estériles por eje reproductivo, que resultaría menor a cinco.

A partir de la búsqueda de *branch and bound* con caracteres morfológicos para coníferas vivientes y fósiles -utilizando como árbol *back-bone* aquel que representa las relaciones familiares de la topología presentada en la figura 7- se encontró un árbol más parsimonioso de 44 pasos con bajo apoyo estadístico (Figura 9). De acuerdo con esta topología, las coníferas del Pérmico Superior-Triásico Inferior (Majonicaceae, *Voltzia* y *Ullmania*) representan ramas derivadas relacionadas con Taxodiaceae y Cupressaceae, que a

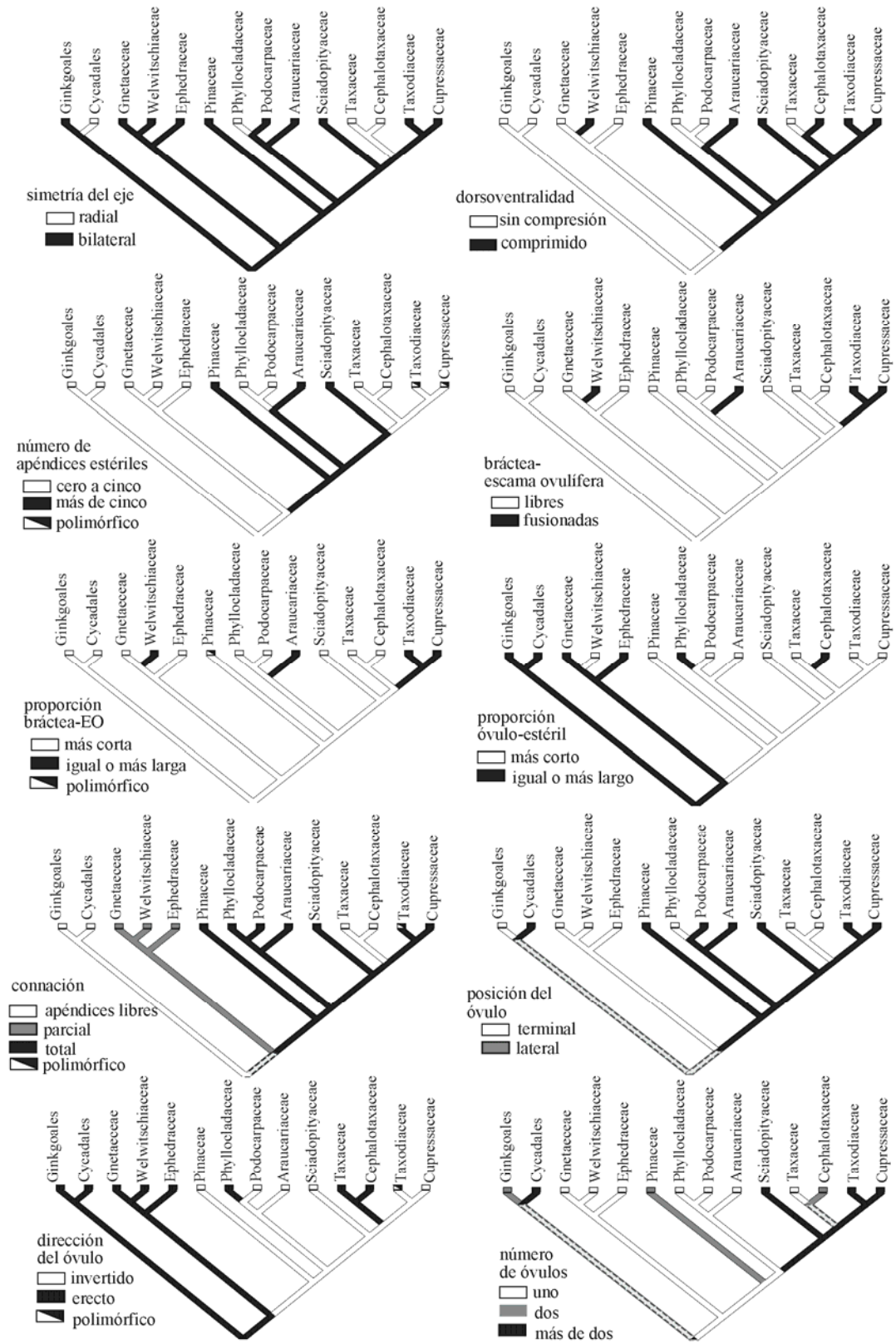


Figura 8. Reconstrucción de caracteres ancestrales por máxima parsimonia. En las ramas con líneas punteadas no se resolvió el estado de carácter correspondiente. su vez se agrupan monofiléticamente con todas las coníferas vivientes. Walchiaceae se agrupa parafiléticamente con Pinaceae, indicando que las coníferas más recientes comparten un último ancestro común con esta familia del Carbonífero Superior-Pérmico Inferior. En el árbol resultante los géneros con simetría radial -*Sashinia* y *Thuringiostrobus*- se encuentran monofiléticamente relacionados y representan a un grupo hermano de los grupos modernos de coníferas (Figura 9).

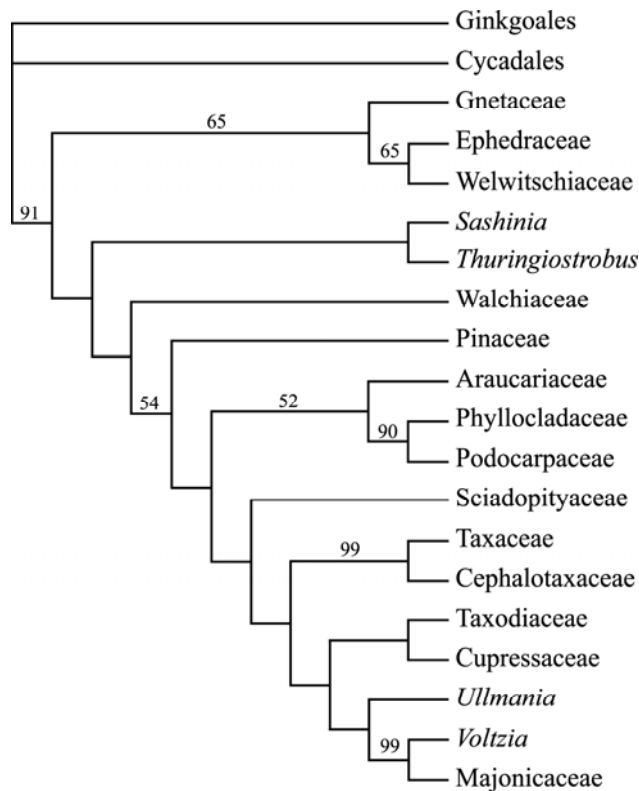


Figura 9. Relaciones filogenética de las coníferas vivientes y fósiles. Árbol más parsimonioso inferido a partir de caracteres morfológicos (apéndices 1 y 2). Los números arriba de las ramas muestran los índices de 100 réplicas de bootstrap.

Adicionalmente se hizo una inferencia restringiendo las búsqueda con un árbol *backbone* con la topología que representa la hipótesis *gne-pine*, a partir de la cual se obtuvieron 21 árboles más parsimoniosos de 48 pasos (datos no mostrados). El árbol de consenso estricto de los 21 árboles muestra un grupo monofilético en el que se incluyen las coníferas del Pérmico Superior-Triásico Inferior y el resto de las coníferas modernas excepto

Pinaceae. Este grupo monofilético forma una politomía junto con Pinaceae, Walchiaceae, Gnetales, *Sashinia* y *Thuringiostrobus*. En general las diferencias entre las 21 topologías se observan en las relaciones entre *Sashinia* y *Thuringiostrobus* y el grupo gne-pine, que en todas las topologías se encuentra cercanamente relacionado con Walchiaceae (datos no mostrados).

Estimación del tiempo de divergencia de Pinaceae y las otras familias de Coniferales modernas

De acuerdo con los resultados arrojados por Modeltest, se determinó que dos modelos de evolución molecular se ajustan mejor a las diferentes matrices de alineación: *general time reversible* (GTR; Rodríguez et al. 1990) para 18S rDNA y para la matriz combinada de tres genes y Tamura y Nei (TrN; Tamura y Nei 1993) para las secuencias 26S rDNA y *rbcL* (Tabla 2).

Tabla 2. Modelos de evolución usados para la estimación de longitud de ramas para estimar tiempos de divergencia, proporción empírica de sitios invariantes y el parámetro Gamma para cada matriz nucleotídica, obtenidos con Modeltest.

Secuencia	Modelo	Proporción de sitios invariantes	Parámetro Gamma
18S rDNA	TIM+I+G*	0.5712	0.5440
26S rDNA	TrN+I+G	0.2294	0.5487
<i>rbcL</i>	TrN+I+G	0.5561	1.4173
3 genes	GTR+I+G	0.4728	0.6287

*El modelo transicional (TIM) es una variación del modelo *General Time Reversible* (Posada, 1998)

El valor más bajo obtenido del análisis de validación cruzada para cada secuencia fue seleccionado como el parámetro de suavidad para penalizar el análisis de verosimilitud para calcular el tiempo de divergencia de la familia Pinaceae. Se obtuvieron diferentes estimados a partir de cada una de las matrices, con fechas que van desde el Pérmico Inferior hasta el Triásico Inferior (Tabla 3). La divergencia más temprana se obtuvo del gen 26S rDNA (272 ma, Pérmico Inferior), mientras que la más reciente se obtuvo del gen 18S rDNA (239 ma, Triásico Inferior). A partir de la matriz combinada, se estimó un tiempo de divergencia de 261

ma que corresponde al Pérmico Inferior. A pesar de que los estimados resultaron diferentes para cada matriz, la desviación estándar para el promedio es relativamente pequeña (± 13 ma).

Tabla 3. Estimados de tiempo de divergencia (ma) para los linajes de gimnospermas y coníferas, con 4 diferentes matrices y el promedio para cada nodo. Los números en negritas corresponden al estimado del grupo corona de Coniferales.

Evento de divergencia	18S rDNA	26S rDNA	<i>rbcL</i>	3 genes	promedio \pm DS
Angiospermas/Gimnospermas	325.00	325.00	325.00	325.00	325.00 \pm 00
Ginkgoales-Cycadales/Otras gimnospermas	314.89	***	276.14	291.75	294.26 \pm 19
Ginkgoales/Cycadales	***	257.94	***	254.01	255.97 \pm 03
Gnetales/Coniferales	275.86	275.04	***	284.39	278.43 \pm 05
Pinaceae/otras coníferas	238.69	271.65	254.93	260.90	256.54\pm13
Araucariaceae/Podocarpaceae	200.00	200.00	200.00	200.00	200.00 \pm 00
<i>Pinus/Abies</i>	140.00	140.00	140.00	140.00	140.00 \pm 00
Araucariaceae/Sciadopityaceae	222.59	***	206.03	229.94	219.52 \pm 12
Sciadopityaceae/Taxaceae	179.31	134.1	190.90	208.69	178.25 \pm 32
Cephalotaxaceae/Taxaceae	117.90	92.25	104.73	***	104.96 \pm 12
Taxaceae/Taxodiaceae	127.62	***	114.94	133.76	125.44 \pm 10

***No calculado debido a que la rama se colapso por tener una longitud de 0

Discusión

La utilización de una matriz combinada para la inferencia filogenética permitió obtener un árbol con valores de apoyo relativamente altos (Figura 7). Las hipótesis de relaciones táxicas entre las coníferas implícitas en este árbol son congruentes con algunos trabajos publicados (Chaw et al. 1997 y 2000, Bowe et al. 2000, Rydin et al. 2002, Soltis et al. 2002). Sin embargo, las relaciones entre los linajes de gimnospermas muestran una relación táxica dudosa entre *Ginkgo* y las dos cycadas incluidas –*Cycas* y *Zamia*. Este arreglo contradice las topologías basadas en múltiples genes obtenidas mediante reconstrucciones de máxima verosimilitud (ML) de Chaw et al. (2000), de Bowe et al. (2000) con ML, *neighbor-joining*, y Máxima Parsimonia (MP) y los análisis de Rydin et al. (2002). En estos casos, *Ginkgo* aparece como grupo hermanos del clado compuesto por Gnetales y Coniferales, o como grupo hermano del resto de las gimnospermas. Esta hipótesis de relación cercana entre *Ginkgo* y Cycadales ha sido obtenido también por Chaw et al. (1997) y Soltis et al. 2002 y está sustentada por un índice de bootstrap de 75%, sin embargo esta asociación podría resultar de un artefacto de atracción de ramas largas o un sesgo atribuible la falta de muestras de cycadas.

Hasebe (1997), resaltó el hecho de que, en contraste con los datos morfológicos, los datos moleculares apoyan el clado *Ginkgo*-Cycadales. Incluso, de acuerdo con Bowe et al (2000), cuando se usa únicamente el gen *nr18S* como marcador molecular, dicho agrupamiento es constante independientemente del método de reconstrucción. Por otro lado, Rydin et al. (2002), encontraron mediante análisis cladistas y Bayesianos de matrices multigénicas una tricotomía entre Ginkgoales, Cycadales y Gnetales-Coniferales. Mientras que los genes *LEAFY/NEEDLY (LFY/NLY)*, -los cuales participan en procesos del desarrollo de estructuras reproductivas de las plantas con semilla- también indican que Cycadales se encuentran más cercanamente relacionado con *Ginkgo*, que con cualquier otro taxa (Frohlich y Parker 2000). De acuerdo con el registro fósil, Ginkgoales muestra una mínima evolución morfológica desde su aparición (Zhou 1997), incluso conserva gametas masculinas móviles, carácter que comparte con cycadales y que no está presente en ningún otro grupo de plantas con semilla (Poort et al. 1996). Dado lo anterior es razonable apoyar las relaciones entre ambos clados, sin embargo es necesario desarrollar análisis más detallados respecto a las relaciones de *Ginkgo* con el resto de las gimnospermas.

La hipótesis de grupos hermanos entre Gnetales y Coniferales mostrada en este trabajo ha sido reportada en otros trabajos (Chaw et al. 1997, Bowe et al. 2000, Rydin et al. 2002, Rydin y Källersjö 2002), sin embargo existe mas evidencia molecular que apoya la hipótesis *gne-pine* (Burleigh y Mathews 2007b), por lo cual para las inferencias de caracteres ancestrales y la filogenia de coníferas vivientes y fósiles, también se consideró esta hipótesis. La topología obtenida aquí puede ser el resultado de un sesgo causado por el gen 18S, ya que los análisis de Burleigh y Mathews (2007a) muestra que con este gen es muy probable inferir la topología que soporta la monofilia de las coníferas, incluso cuando este no es el árbol verdadero. Actualmente la evidencia molecular apunta a que las Gnetales son más cercanas a las coníferas que a cualquier otro grupo, sin embargo permanece la incertidumbre acerca de la relación entre Pinaceae y Gnetales, ya que los caracteres morfológicos y características del genoma del cloroplasto no la sustentan plenamente (Hart 1987, Raubeson y Jansen 1992, Donoghue y Doyle 2000, Burleigh y Mathews 2004)

De acuerdo con el mapeo de caracteres sobre la filogenia molecular presentada en éste trabajo, el eje reproductivo ancestral es muy similar a una escama ovulífera de Pinaceae. Debido a que existen hipótesis alternativas relativas a las relaciones entre gnetofitas y coníferas, se evaluaron ambas hipótesis de relaciones táticas para la inferencia de caracteres ancestrales, obteniendo los mismos estados para el ancestro común más reciente, con excepción del número de apéndices estériles. En el contexto de las coníferas como grupo monofilético, este ancestro portaría más de cinco apéndices estériles por eje reproductivo, mientras que en el contexto de la hipótesis *gne-pine*, el ancestro portaría máximo cinco apéndices estériles.

Un punto crítico respecto a las hipótesis de ancestría de las coníferas es el grado de fusión de los componentes del eje, ya que el ancestro inferido presentaría fusión total, mientras que las coníferas del Paleozoico y Mesozoico presentan apéndices libres o parcialmente fusionados, carácter que también está presente en algunos géneros actuales (*v. gr. Cryptomeria*), por lo que se ha planteado que la fusión de componentes ocurrió en los linajes tempranamente divergentes. Otra posibilidad es que la fusión haya ocurrido en diferentes linajes paralelamente, por lo que el ancestro podría presentar estructuras sin fusionar y paralelamente ocurriría fusión en diferentes linajes lo cual es también congruente con la hipótesis *gne-pine*.

La reconstrucción filogenética con coníferas fósiles favorece el escenario de evolución paralela, ya que las coníferas modernas comparten un último ancestro común con Walchiaceae, familia en la cual no están fusionados los componentes del eje reproductivo femenino. Esta topología también es congruente con el planteamiento de Florin, ya que las coníferas del Pérmico Superior-Triásico Inferior representan formas intermedias asociadas con ramas derivadas de Coniferales. *Sashinia* y *Thuringiostrobus* divergieron antes y por lo tanto no representan a los estados ancestrales de las coníferas vivientes.

De acuerdo con las fechas obtenidas con base en diferentes matrices de alineación nucleotídica, la divergencia de Pinaceae pudo ocurrir desde el Pérmico Inferior hasta el Triásico Inferior en un intervalo de 32 ma. Sin embargo, con excepción de la fecha arrojada por el marcador *nr18S* el resto de las fechas caen en el intervalo de tiempo de la existencia de Walchiaceae (Pérmico Inferior, en el límite con el Pérmico Superior). Además de Florin, otros paleobotánicos han relacionado este grupo con el origen de las coníferas -principalmente con las pináceas (Lam 1954Crane 1985, Miller 1999,-), no sólo por su morfología, sino también porque su amplia distribución en toda Laurasia favorece la hipótesis de que a partir de este grupo de gimnospermas se diversificaron las coníferas que actualmente se encuentran en todos los continentes (Florin 1963). Finalmente, con este análisis no se encontró evidencia a favor de las hipótesis de Clement-Westerhof (1988) y Meyen (1984) que postulan respectivamente a *Thuringiostrobus* y *Sashinia* –coníferas con ejes reproductivos femeninos con simetría radial- como los ancestros directos de Majonicaceae.

Las evidencias obtenidas con herramientas de evolución y sistemática molecular, permiten poner a prueba hipótesis relativas a la historia evolutiva de las plantas. La resolución de polémicas paleobotánicas abre las puertas a nuevos cuestionamientos en el estudio de la biología, específicamente, a cuáles son los procesos evolutivos implicados en la evolución morfológica. Por ejemplo, Florin (1951) y Lam (1954) recurrieron a la teoría telómica de Zimmermann para explicar los patrones transicionales en la evolución de estructuras vegetales de las gimnospermas, argumentando una serie de transformaciones desde Walchiaceae hasta las coníferas modernas. Los adelantos del conocimiento relativo a los procesos genéticos del desarrollo detrás del cambio morfológico permitirían explicar tanto cambios graduales como cambios abruptos en la escala del tiempo geológico, lo cual es congruente con la diversidad de formas actuales y los patrones filogenéticos. Por ejemplo, los

eventos de fusión son atribuibles a procesos heterocrónicos como la aceleración, mientras que la pérdida o ganancia de órganos, las heterotopías y los cambios en la simetría de los ejes se asocian con cambios drásticos en la expresión de genes reguladores del desarrollo. De tal manera, que la investigación concerniente a las bases moleculares del desarrollo en las plantas con semilla, proporcionará las bases para establecer los procesos involucrados en la evolución morfológica de las coníferas.

CAPÍTULO 2. LA EVOLUCIÓN DEL DESARROLLO Y LOS GENES *LEAFY/FLORICAULA* Y *NEEDLY* EN LAS PLANTAS CON SEMILLA

La genética evolutiva del desarrollo en plantas

A partir de la última década del Siglo XX, el descubrimiento y caracterización de genes implicados en la morfogénesis de estructuras y órganos de angiospermas ha permitido el establecimiento de los mecanismos genético-moleculares involucrados en la evolución morfológica de las plantas con semilla (Carrol et al. 2001, Wilkins 2002). Los primeros genes del desarrollo caracterizados provenían de organismos vegetales “modelos” como *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) y *Antirrhinum majus* (Scrophulariaceae), sin embargo, el alto nivel de conservación nucleotídica de éstos permitió el descubrimiento de numerosos genes homólogos en diversos linajes de las plantas. El estudio comparativo de estos genes en el marco de la sistemática filogenética y de la evolución de caracteres morfológicos ha conformado un nuevo campo interdisciplinario de investigación denominado “genética evolutiva del desarrollo en plantas” –en inglés, *plant evolutionary developmental genetics* o *plant evodevo*.

La genética evolutiva del desarrollo parte de diferentes tipos de evidencias para determinar cuáles son los cambios genético-moleculares que subyacen a la evolución fenotípica. Por ejemplo, mediante los análisis de hibridización *in situ* es posible comparar patrones de expresión de genes entre especies distantes. Las similitudes en patrones de expresión de genes asociados a determinadas estructuras u órganos dan evidencia de conservación de funciones y homología de órganos, mientras que las diferencias de expresión asociadas a variaciones morfológicas, permiten plantear hipótesis relativas a los mecanismo causales de la variación fenotípica (Bharathan et al. 2002, Pruitt et al. 2003, Dong et al. 2005). Sin embargo, la similitud de patrones de expresión de determinados genes entre especies lejanas no siempre implica conservación de funciones, por lo que las pruebas de expresión heteróloga de genes en plantas transgénicas permiten inferir si genes de linajes divergentes son capaces de activar los mismos genes de una red regulatoria en un organismo modelo como *Arabidopsis*. Esto es generalmente posible ya que los genes reguladores se encuentran muy conservados a nivel de secuencias, de tal manera que la construcción de genes quiméricos y la aplicación de la técnica de microarreglos, ha revelado que parte de los

cambios asociados con la evolución fenotípica han ocurrido en regiones regulatorias de los mismos genes (regulación-*Cis*) o de los genes blanco. Finalmente, las pruebas de evolución molecular permiten el reconocimiento de sustituciones de reemplazo asociadas a cambios de función génica y la detección de eventos de selección natural (Martínez-Castilla y Alvarez-Buylla 2004), mientras que el análisis filogenético de las secuencias de los genes implicados en redes regulatorias permite reconstruir eventos de diversificación y duplicación génica, asociados a la evolución morfológica (Álvarez-Buylla et al. 2000, Becker y Theissen 2003, Irish 2003)

La genética del desarrollo en las coníferas

En contraste con las angiospermas, existen pocos trabajos relativos a la genética del desarrollo de las coníferas. Los tiempos generacionales de las coníferas son relativamente grandes, lo cual implica dificultades para la implementación de metodologías transgénicas, que permitan pruebas de expresión constitutiva y/o de expresión heteróloga, así como la generación de constructos con genes reporteros. Sin embargo la evidencia obtenida a través de la comparación de patrones de expresión de mensajeros y la reconstrucción de filogenias de estos genes posibilita el establecimiento de inferencias referentes a los cambios genéticos que subyacen a la evolución morfológica de las coníferas.

Los esfuerzos de investigación se han concentrado en la familia Pinaceae, particularmente en los géneros *Pinus* y *Picea*, para los cuales se han caracterizado diversos genes pertenecientes a la familia MADS, algunos con homología clara a las familias génicas propuestas para angiospermas y otros que podrían conformar nuevos linajes únicos para coníferas y/o gimnospermas (Tabla 4). La expresión de los genes MADS encontrados en coníferas se asocia con la formación de órganos foliares y de estructuras masculinas y/o femeninas (Tabla 4). De acuerdo con las relaciones filogenéticas de los genes y las pruebas de expresión heteróloga en *Arabidopsis*, se ha establecido que la función de los genes se encuentra ampliamente conservada en los linajes vivientes de las plantas con semilla.

Tabla 4. Genes reguladores estudiados en coníferas

gen	Ortólogo en <i>Arabidopsis</i>					Expresión en <i>Arabidopsis</i>	Referencia
		a	b	c	d		
		a1	a2				

MADS1	AGL2	<i>Pinus radiata</i>	DIG	no	Nb	no	no	no		Mouradov et al. 1998b
PrMADS2	AGL6	<i>Pinus radiata</i>	DIG	no	Nb	no	no	no		Mouradov et al. 1998b
PrMADS3	AGL6	<i>Pinus radiata</i>	DIG	no	DIG	DIG	Nb	no		Mouradov et al. 1998b
DAL 1	AGL6	<i>Picea abies</i>	R	R	R	R	R	adelanto en la floración		Tandre et al. 1995 Carlsbecker et al. 2004
PrDGL	AP3/PI	<i>Pinus radiata</i>	no	no	DIG	no	no	no		Mouradov et al. 1999
DAL 11/13	AP3/PI	<i>Picea abies</i>	no	no	DIG	no	no	no		Sundstrom et al. 1999
CjMADS1/2	AP3/PI	<i>Cryptomeria japonica</i>	no	no	Nb	no	no	no		Fukui et al. 2001
DAL 2	AG	<i>Picea abies</i>	R	no	Nb	no	no	flores similares a <i>ag</i>		Tandre et al. 1995 Tandre et al. 1998
SAG 1	AG	<i>Picea mariana</i>	DIG	no	DIG	no	no	flores similares a <i>ag</i>		Rutledge et al. 1998
DAL 3	TM3	<i>Picea abies</i>	Nb?		Nb	?	Nb	no		Tandre et al. 1995
DAL 10	nueva familia	<i>Picea abies</i>	R	R	no	no	no	adelanto en la floración		Carlsbecker et al. 2003
PaAP2L1	AP2	<i>Picea abies</i>	R	no	no	?	RT	no		Nilsson et al. 2007
PaAP2L2	AP2	<i>Picea abies</i>	RT?		RT	?	RT	afectada la roseta y las flores		Vahala et al. 2001 Nilsson et al. 2007
PaAP2L3	AP2	<i>Picea abies</i>	R	no	?	R	R			Nilsson et al. 2007
PtANTL1	ANT	<i>Pinus thunbergii</i>	DIG	DIG	RT	RT	?	no		Shigyo y Ito 2004
PtAP2L1	AP2	<i>Pinus thunbergii</i>	DIG	DIG	RT	RT	?	no		Shigyo y Ito 2005
PtAP2L2	AP2	<i>Pinus thunbergii</i>	DIG	DIG	RT	RT	?	no		Shigyo y Ito 2006
PRFLL	LFY	<i>Pinus radiata</i>	no	no	Nb	?	Nb	no		Mellerowicz et al. 1998
PcLFY	LFY	<i>Pinus caribaea</i>	DIG?		DIG	DIG	DIG	complementación en plantas <i>lfy</i>		Dornelas y Rodriguez 2005c
PaLFY	LFY	<i>Picea abies</i>	R	R	R	R	R	no		Vázquez-Lobo et al. 2007
PodLFY	LFY	<i>Podocarpus reichei</i>	R	R	R	R	R	no		Vázquez-Lobo et al. 2007
TgLFY	LFY	<i>Taxus globosa</i>	R	R	R	R	R	no		Vázquez-Lobo et al. 2007
NEEDLY	nueva familia (NLY)	<i>Pinus radiata</i>	DIG	DIG	DIG	DIG	DIG	Adelanto en la floración complementación en plantas <i>lfy</i>		Mouradov et al. 1998a
PaNLY	NLY	<i>Picea abies</i>	R	R	R	R	R	no		Vázquez-Lobo et al. 2007
PodNLY	NLY	<i>Podocarpus reichei</i>	R	R	R	R	R	no		Vázquez-Lobo et al. 2007
TgNLY	NLY	<i>Taxus globosa</i>	R	R	R	R	R	no		Vázquez-Lobo et al. 2007

a, expresión en estructuras femeninas; a1, expresión en escama ovulífera; a2 expresión en bráctea; b, expresión en conos masculinos; c, expresión en primordios foliares u hojas; d, expresión en meristemo apical.

Nb, expresión detectada por Northern blot

RT, expresión detectada por RT-PCR

DIG, expresión detectada por hibridización in situ con fluorescencia

R, expresión detectada por hibridización in situ con radiactividad

? el estudio no permite distinguir con precisión la ubicación de los mensajeros

Particularmente, la conservación de funciones ha sido probada en los genes de la función B, es decir los genes asociados con el desarrollo de los pétalos y los estambres en las angiospermas, que en coníferas se expresan específicamente en conos masculinos (Tabla 4). Además, los ortólogos de *AGAMOUS* (*AG*) *DAL2* y *SAG1*, encontrados en *Picea abies* y

Picea mariana, además de expresarse específicamente en las escamas ovulíferas, se expresan en conos masculinos, lo que indicaría que este gen como en las angiospermas, se expresa en ambos tipos de tejidos y puede estar involucrado tanto en la diferenciación de las escamas ovulíferas como en la diferenciación de las microesporófilas.

El desarrollo de estudios en familias diferentes de coniferales, resultaría fructífero ya que la morfología de las estructuras reproductivas femeninas ha divergido a tal grado entre las nueve familias del Orden, que los criterios embriológicos y topológicos no son suficientes para el establecimiento de hipótesis robustas de homología de órganos entre diferentes linajes. La diversificación de las estructuras reproductivas observada actualmente entre las familias de coníferas ocurrió presumiblemente en un tiempo relativamente corto. Entonces, la comparación de patrones de expresión de genes asociados específicamente con la diferenciación de determinados órganos, podría brindar evidencias relativas a la homología órganos entre estructuras divergentes, mientras que la comparación de patrones de genes con funciones relativas a la estructura, la bilateralidad y la dorsoventralización, podrían esclarecer el origen y la naturaleza de las estructuras asociadas a óvulos.

En contraste con los ejes de Pinaceae, Araucariaceae o Taxodiaceae, donde se observan múltiples estructuras portadoras de óvulos -escamas ovulíferas-, lignificadas y comprimidas dorsoventralmente, en las familias Podocarpaceae-Phyllocladaceae y Taxaceae-Cephalotaxaceae los conos están compuestos por una o dos estructuras asociadas a óvulos con apariencia carnosa. De acuerdo con las observaciones detalladas del desarrollo de estas estructuras, tales diferencias podrían estar relacionadas con cambios en los patrones de expresión y en las redes de regulación de genes del desarrollo, implicados en la transición de la fase vegetativa a la reproductiva, en el tiempo de determinación del meristemo apical y la dorsoventralización.

La participación de LEAFY en el inicio de la floración y la estructura de la inflorescencia

La identificación de muchos de los genes involucrados en la morfogénesis vegetal ha sido posible mediante el análisis de mutantes fenotípicas, lo cual ha facilitado asociar a cada gen con una función determinada en el desarrollo. En general, la interrupción de la expresión de los genes reguladores puede causar cambios en la arquitectura general de la planta o puede afectar directamente el desarrollo de determinados órganos o estructuras. Entre tales mutantes

fenotípicas destacan los fenotipos *leafy* de *Arabidopsis thaliana* y *floricaula* de *Antirrhinum majus*, en los cuales las flores son sustituidas por ramas laterales, y las flores que llegan a formarse son indeterminadas y sus órganos muestran anormalidades (Carpenter y Coen 1990, Shultz y Haughn 1991). El estudio de estas mutantes llevó al descubrimiento un gen del desarrollo implicado en la transición del crecimiento vegetativo al inicio de la floración – denominado por las mutantes: *LEAFY/FLORICAULA (LFY/FLO)*- y que codifica para un factor de transcripción único en las plantas (Coen et al. 1990, Weigel et al. 1992), el cual ha sido encontrado y caracterizado en múltiples linajes de las embriofitas (por ejemplo, Anthony et al. 1993, Hofer et al. 1997, Kyojuzuka et al. 1998, Souer et al. 1998, Molinero-Rosales et al. 1999, Shu et al. 2000, Gocal et al. 2001, Busch y Gleissberg 2003).

La expresión de *LFY* es detectable en bajos niveles en estadios vegetativos del desarrollo de plantas silvestres de *A. thaliana*, particularmente en los primordios foliares. Cuando se incrementa la expresión de este gen en las periferias del meristemo apical, los primordios que generalmente se diferencian en hojas, se convierten en meristemos florales, en los cuales continúa la expresión de *LFY* durante los primeros estadios del desarrollo de la flor, por lo que *LFY* es generalmente clasificado como un gen de identidad de meristemo (Levy y Dean 1998, Parcy 2005). La relación de *LFY* con la transición a la fase reproductiva es más clara en el contexto de la expresión constitutiva de este gen, ya que en las plantas transgénicas *35S::LFY*, las ramas secundarias son sustituidas por flores y puede desarrollarse tempranamente una flor terminal (Weigel y Nilsson 1995). En *A. thaliana* existen dos vías para el cambio de fase vegetativa a reproductiva; por un lado, existe una promoción asociada con el fotoperiodo, ya que en periodos de días largos se induce la floración y por otro lado, existe una promoción endógena o autónoma, que permite la formación de flores en fotoperiodos cortos y que está relacionada con la producción de giberelinas; en ambos casos existe un incremento de la expresión de *LFY*. Particularmente, se ha probado que existe una interacción directa entre las giberelinas y el promotor de la transcripción de *LFY* (Blázquez y Weigel 2000) y que en contextos de mutantes de producción de giberelinas, los mensajeros de este gen son prácticamente indetectables (Blázquez et al. 1998).

Se ha probado que la expresión de *LFY* no es suficiente para el inicio de la floración, ya que en las plantas *lfy* algunas flores anormales llegan a formarse debido a que existe otro factor de transcripción asociado a éste fenómeno denominado *APETALA 1 (API)*; Irish y

Sussex 1990, Bowman et al. 1993, Weigel y Meyerowitz 1993). Las mutantes *ap1* son similares al fenotipo *lfy*, ya que los meristemos florales son parcialmente transformados en meristemos de inflorescencia y los dos verticilos externos son sustituidos por estructuras foliares, además, ambos genes causan floración temprana cuando son expresados constitutivamente, lo cual implica que las funciones de ambos genes se sobrelapan (Bowman et al. 1993, Weigel y Meyerowitz 1993, Mandel y Yanofski 1995). Ambos genes se regulan positivamente, ya que en las mutantes *ap1* decrece la expresión de *LFY* y la expresión constitutiva de *LFY* adelanta la expresión de *API*. Sin embargo, existe una vía de activación de *API* independiente de *LFY*, que permite que este gen se active, compensando parcialmente la ausencia de *LFY* (Bowman et al. 1993, Percy et al. 1998, Wagner et al. 1999). Además de *LFY* y *API*, se han identificado otros genes requeridos para el cambio de fase, por ejemplo: *APETALA2 (AP2)*, *CAULIFLOWER (CAL)* y *FRUITFULL (FUL)* (Shannon y Meeks-Wagner 1993, Ferrándiz et al. 2000). Una vez establecido el meristemo floral, únicamente *LFY* es requerido para el mantenimiento de la identidad de éste meristemo, lo cual se atribuye por un lado a la regulación positiva de *LFY* sobre *AGAMOUS (AG)* y por otro lado, a la regulación negativa que ejerce sobre *TERMINAL FLOWER (TFL)*, gen encargado de regular el mantenimiento del meristemo de inflorescencia (Percy et al. 2002). Finalmente, una vez establecido el meristemo floral, *LFY* también interviene activando directa o indirectamente los genes de identidad de órganos florales (Percy et al. 1998, Lamb et al. 2002, Riechmann y Wellmer 2005). Este gen participa en dos eventos independientes: en la activación de la transición de la fase vegetativa a la reproductiva y en la morfogénesis floral, regulando positivamente los genes de las funciones ABC (Percy et al. 1998).

La evolución de los genes LEAFY/FLORICAULA y NEEDLY en las plantas con semilla

Mediante los estudios realizados en *LFY*, ha sido posible establecer con certidumbre la función de éste gen, incluyendo con cuáles proteínas interactúa, qué genes participan en su regulación y cuáles genes son regulados por éste. Dada la amplia diversidad de plantas del planeta y la antigüedad de los linajes de embriofitas, es difícil pensar que tales características están conservadas en especies filogenéticamente lejanas del sistema modelo que es *Arabidopsis*. Sin embargo, los estudios en otros linajes han revelado una amplia conservación de funciones y ciertas divergencias, que serán discutidas a continuación.

A diferencia de otros genes reguladores, los genes *LFY/FLO* suelen encontrarse en una sola copia en los genomas diploides de las angiospermas (Baum et al. 2005). Sin embargo se han encontrado obvias excepciones en linajes poliploides, donde copias con aparente equivalencia funcional han sido reportadas –por ejemplo, *Nicotiana* (Solanaceae), *Malus* (Rosaceae), *Triticum* y *Zea* (Poaceae) (Kelly et al. 1995, Wada et al. 2002, Bomblies et al. 2003, Shitsukawa et al. 2006)-, además, de la familia Brassicaceae donde se han encontrado duplicaciones de reciente origen sin evidencia de divergencia funcional (Baum et al. 2005). Por otro lado, en las gimnospermas existe un gen parálogo denominado *NEEDLY* (*NLY*), que de acuerdo con las evidencias filogenéticas se duplicó en el origen de las plantas con semilla y posteriormente se perdió en el linaje de las angiospermas (Frolich y Parker 2000). Aunque pruebas de expresión heteróloga muestran equivalencia funcional entre *LFY/FLO* y *NLY* (Mouradov et al. 1998a), existen diferencias en los patrones de expresión entre ambos genes, lo cual es interpretable como evidencia de diversificación de funciones (Vázquez-Lobo et al. 2007).

Reportes iniciales (Mellerowicz et al. 1998) indicaban que los genes *LFY/FLO* y *NLY* se expresan diferencialmente en tejidos masculinos femeninos, ya que hibridizaciones Northern blot, con genes ortólogos del gen *LFY/FLO* de *Pinus radiata* (*PRFLL*; Mellerowicz et al. 1998), sugieren expresión en estructuras vegetativas y masculinas, sin embargo, no se detectaron mensajeros en estructuras femeninas. En contraste, los patrones de expresión espacio-temporales del gen *NLY* en *Pinus radiata*, establecidos a través de hibridizaciones *in situ* (Mouradov et al. 1998a), indican que este gen se expresa en primordios del cono femenino, primordios de las brácteas y primordios de escamas ovulíferas, mientras que los transcritos de este gen fueron detectados en menor nivel en primordios de conos masculinos y de fascículos.

Esta supuesta diferencia en patrones de expresión llevó al planteamiento de la hipótesis denominada “*The mostly male theory on the evolutionary origin of flowers*” (Frolich y Parker 2000, Frolich 2002 y 2003), que plantea que la adquisición del hermafroditismo floral de las angiospermas se relaciona con la pérdida del parálogo *NLY* en este linaje. De acuerdo con los resultados de Mellerowicz et al. (1998), *LFY/FLO* sólo estaría involucrado en la determinación de estructuras masculinas, por lo tanto la función de activación de diferenciación de órganos femeninos fue adquirida por *LFY/FLO* en un ancestro hipotético

con afinidades gimnospermales, que portaría flores masculinas y desarrollaría ectópicamente óvulos. Sin embargo, la expresión diferencial entre genes *LFY/FLO* y *NLY*, no qha sido corroborada en experimentos independientes con diferentes especies de gimnospermas, por lo tanto la participación del gen *LFY/FLO* en la aparición de ejes reproductivos hermafroditas es dudosa.

Una prueba de que la función de los genes *LFY/FLO* se encuentra altamente conservada entre diferentes linajes es que en las especies en las que se han caracterizado mutantes fenotípicas, atribuibles a cambios en genes homólogos de *LFY/FLO*, se observan características similares a las de los fenotipos de líneas *leafy* y *floricaula*; por ejemplo también en *Pisum* (Fabaceae), *Zea* (Poaceae), *Lycopersicon* y *Petunia* (Solanaceae) se observa un retraso en la floración, las flores son parcialmente indeterminadas y portan órganos sepaloideos, carpeloideos y/o con similitud a órganos foliares (Hofer et al. 1997, Souer et al. 1998, Molinero-Rosales et al. 1999, Bomblies et al. 2002). Además, las comparaciones de secuencias de aminoácidos de las proteínas *LFY/FLO* y *NLY* evidencian dos regiones altamente conservadas, incluso entre briofitas y plantas con semilla: el dominio C -más cercano al final de la transcripción- contiene un dominio de unión a DNA de aproximadamente 180 aminoácidos, mientras que el dominio N no es esencial para la unión, sin embargo, podría regular la actividad del dominio C (Maizel et al. 2005).

Otra evidencia de la conservación de funciones, surge de las observaciones de los patrones de expresión del gen, ya que en general existe conservación del tiempo y el lugar donde se transcriben los mensajeros. En la mayoría de las especies estudiadas – por mencionar algunas, *Carica papaya* (Caricaceae), *Eucalyptus globulus* (Myrtaceae), *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae), *Jonopsidium acaule* (Brassicaceae), *Gnetum parvifolium* (Gnetaceae), *Nicotiana tabacum* (Solanaceae), *Vitis vinifera* (Vitaceae), y *Zea maiz* (Poaceae), (Kelly et al. 1995, Southerton et al. 1998, Shu et al. 2000, Shindo et al 2001, Bomblies et al. 2002, Carmona et al. 2002, Dornelas y Rodriguez 2005b, Yu et al. 2005)-, los transcritos de *LFY/FLO* se ubican en primordios de órganos florales y de flores antes de la diferenciación -en las gimnospermas en los primordios de órganos reproductivos. Las principales desviaciones respecto a este patrón las encontramos en ciertos pastos como *Oryza sativa*, *Lolium temulentum* y *Triticum aestivum* (Poaceae), en los cuales la función de los genes *LFY/FLO* se asocia con la formación de la inflorescencia, más que con la diferenciación

del meristemo floral, ya que en ninguno de esos casos se encontraron mensajeros en los primordios florales, en cambio, los transcritos se acumulan en los primordios del panículo o de la espiga. En estadios más avanzados de estas especies, la expresión vuelve a detectarse en primordios de órganos florales externos –lema, gluma y palea- pero no en los verticilos internos que componen los estambres y carpelos (Kyozyuka et al. 1998, Gocal et al. 2001, Shitsukawa et al. 2006), por lo que se puede inferir que en el linaje de pastos denominado clado-BEP, existe un cambio evolutivo en la regulación de estos genes, que se asocia con cambios en la estructura de la inflorescencia.

La asociación de la expresión de genes *LFY/FLO* con el desarrollo de las hojas no es clara, ya que en *Arabidopsis*, a pesar de que este gen se detecta en primordios foliares, no se observa ningún defecto ni en las líneas mutantes, ni en las líneas con expresión constitutiva o con expresión heteróloga de genes *LFY/FLO* provenientes de otras especies. Sin embargo, en líneas mutantes de *Pisum* y *Lotus* (Fabaceae), además de los cambios relacionados con el inicio de la floración, también la fase vegetativa es afectada, ya que estas plantas portan hojas compuestas y en las mutantes se observa pérdida de foliolos o transformación completa a hojas simples (Hofer et al. 1997, Dong et al. 2005), lo cual evidencia que en diferentes linajes la función de *LFY/FLO* se ha diversificado involucrando otros genes cascada abajo en la red de regulación, conservando la función clave en la determinación del meristemo floral. En monocotiledóneas no se ha detectado expresión asociada a primordios foliares, por lo que podría postularse que las evolución foliar en este linaje se relacionan con los cambios de expresión de éstos genes. Sin embargo, no existe un patrón claro para ciertas especies de eudicotiledóneas en las que no se ha detectado expresión en primordios foliares –por ejemplo: *Brassica oleraceae* (Brassicaceae), *Cedrela fissilis* (Meliaceae) y *Titanotrichum oldhamii* (Gesneriaceae) (Anthony et al. 1993, Wang et al. 2004, Dornelas y Rodriguez 2005a).

Aún en presencia de patrones de expresión similares entre diferentes especies es necesario determinar si los transcritos observados pueden traducirse en factores de transcripción funcionales, sobre todo en aquellos linajes para los cuales no se han desarrollado líneas transgénicas y/o mutantes, en las cuales se puede probar directamente la función del gen. Una evidencia indirecta de la función del gen puede obtenerse mediante pruebas de expresión constitutiva en líneas silvestres o *lfy* de *Arabidopsis*, lo cual es posible fusionando un promotor viral de la transcripción -usualmente el promotor viral 35S- con el

gen homólogo a *LFY/FLO* de la especie bajo estudio -debido a que los genes provienen de otras especies, se dice que es una expresión heteróloga- y transformando con este constructo a *Arabidopsis*. En el caso de la transformación de líneas mutantes *lfy*, la conservación de funciones se infiere cuando se recupera el fenotipo silvestre, mientras que en líneas silvestres se espera el mismo efecto que en la sobreexpresión 35S::*LFY*.

Se ha reportado que la expresión heteróloga en mutantes *lfy* con genes homólogos de *LFY/FLO* puede causar la recuperación total del fenotipo silvestre (Mouradov et al. 1998a, Dornelas y Rodriguez 2005a, 2005b y 2005c). Mientras que en las líneas silvestres de *Arabidopsis*, la sobreexpresión heteróloga causa un efecto similar a la de 35S::*LFY* (Southerton et al. 1998, Rottman et al. 2000, Shindo et al. 2001, Wada et al. 2002, Ordidge et al. 2005) Curiosamente, las transformaciones 35S::*NFL* y 35S::*RFL* -los genes *LFY/FLO* de *Nicotiana* y *Oryza*- en plantas *lfy*, solamente recuperan parcialmente el fenotipo silvestre, mientras que la transformación de plantas silvestres de *Nicotiana* y *Oryza* con el constructo 35S::*LFY* resultan en floración temprana. En contraste, en aquellas que son transformadas con 35S::*NFL* o 35S::*RFL*, el adelanto en la floración es mínimo o nulo (Ahearn et al. 2001, Chujo et al. 2003), lo cual sugiere por un lado, divergencia funcional de los genes *NFL* y *RFL* y por otro lado, conservación de las secuencias regulatorias de los genes blanco en estas especies.

Las pruebas de expresión heteróloga en plantas *lfy*, con genes homólogos a *LFY/FLO* clonados fuera del linaje de las angiospermas, deben interpretarse con cautela, ya que la imposibilidad de recuperación del fenotipo silvestre, no implica necesariamente divergencia funcional. La evidencia fósil indica que las angiospermas y las gimnospermas divergieron hace aproximadamente 325 millones de años, por lo tanto es muy posible que tanto los genes reguladores como sus genes blanco hayan evolucionado independientemente, conservando sus funciones de forma paralela. Aunque se ha reportado recuperación completa del fenotipo silvestre con genes de *Pinus radiata*, *Pinus caribaea* (*NLY* y *PcLFY*; Mouradov et al. 1998a, Dornelas y Rodriguez 2005c), también se ha reportado recuperación parcial, con los genes *LFY/FLO* de *P. radiata* (*PRFLL*) y *Gnetum parvifolium* (*GpLFY*), y *NLY* de *Welwitschia* (Shindo et al. 2001, Maizel et al. 2005), por lo que se podría inferir divergencia funcional, ya que además, estos genes sólo activan un gen corriente abajo en pruebas de microarreglos,

mientras que los de las angiospermas pueden activar 13 de los 16 que es capaz de activar *LFY* en plantas silvestres de *Arabidopsis* (Maizel et al. 2005).

Finalmente, los genes *LFY/FLO*, también están presentes en pteridofitas (Himi et al. 2001) y briofitas (Tanahashi et al. 2005) y sus patrones de expresión están asociados con el desarrollo de órganos reproductivos. Por lo tanto es posible asumir que los genes *LFY/FLO* conforman una función clave en el desarrollo de las estructuras reproductivas de todas las plantas con semilla, la cual se encuentra ampliamente conservada en diversos linajes, mientras que los cambios en secuencia, patrones de expresión y relación en redes regulatorias de estos genes pueden ser asociados con la evolución morfológica de estructuras en ciertos linajes como es el caso de los pastos. Dada la poca información relativa a la genética del desarrollo en coníferas, es interesante explorar los patrones de expresión de genes *LFY/FLO* y *NLY* en formas divergentes de coníferas, en búsqueda de los mecanismos genéticos y del desarrollo que subyacen a la evolución morfológica de este grupo.

CAPÍTULO 3.

Characterization of the expression patterns of *LEAFY/FLORICAULA* and *NEEDLY* orthologues in female and male cones of the conifer genera *Picea*, *Podocarpus* and *Taxus*: implications for current evo-devo hypotheses for gymnosperms

Conclusiones

Los análisis de la morfología y la evolución molecular en el contexto filogenético, presentados en la primera parte de esta tesis brindan evidencia sobre el origen del grupo corona de las coníferas. Los resultados indican que la divergencia de los linajes vivientes ocurrió durante el Pérmico Superior a partir de ancestros tipo *Walchia*, lo cual es congruente con la aparición independiente de ejes sin compresión dorsoventral, o con un reducido número de componentes estériles o sin fusión, como los presentes en Podocarpaceae, Taxaceae, Taxodiaceae y Cupressaceae. Los grupos del Triásico forman parte del grupo corona, relacionándose directamente como grupos hermanos de las familias modernas. Estos análisis se corroborarían mediante la inclusión de otros caracteres en el análisis, ya que se han descrito restos fósiles que incluyen ramas, hojas y conos masculinos, por lo tanto se podría aumentar el número de caracteres y por lo tanto se podrían obtener resultados más robustos.

De acuerdo con el mapeo de caracteres morfológicos sobre la filogenia molecular, la reducción del número de complejos portadores de óvulos en los conos y las modificaciones anatómicas que producen conos con apariencia carnosa ocurrieron en tres linajes independientemente y por modificaciones del desarrollo diferentes - Podocarpaceae, Taxaceae y Cupressaceae. Los procesos evolutivos subyacentes a estas modificaciones permanecen inciertos, ya que podría tratarse de adaptaciones a dispersión de semillas, sin embargo, la aparición de estas estructuras ocurrió muchos millones de años antes del origen de los dispersores actuales, por lo tanto es difícil probar hipótesis adaptativas. Sin embargo, los estudios de evolución del desarrollo permiten esclarecer cuáles fueron los cambios evolutivos de los procesos del desarrollo involucrados en la evolución de estas innovaciones.

El estudio comparativo de patrones de expresión de genes reguladores *LFY/FLO* en tres especies de Coniferales, presentado en la segunda parte de esta tesis, revela que existen diferencias en el lugar y el tiempo de expresión de estos genes en tres tipos de conos femeninos y por lo tanto, estos cambios podrían estar relacionados con la reducción en el número de complejos portadores de óvulo por cono. Dados estos resultados, es interesante incluir en la comparación al género *Juniperus*, ya que también presenta una aceleración en el tiempo de determinación del cono y por lo tanto el gen ortólogo de *LFY/FLO* podría estar también involucrado. Además, es necesario estudiar otros genes para descubrir las bases

genéticas del desarrollo que subyacen a las modificaciones morfológicas relacionadas con el cambio en número, forma y tiempo de desarrollo de estructuras estériles asociadas al óvulo. Particularmente, sería interesante estudiar en *Podocarpus*, *Taxus*, *Cryptomeria* y *Juniperus* aquellos genes que están asociados con la diferenciación de órganos, por ejemplo los ortólogos de *AGAMOUS*, como *DAL2* y *SAG1*, que en *Picea* se expresan exclusivamente en la escama ovulífera.

Dada la diversificación de patrones del desarrollo en las coníferas, no sólo es trascendente el estudio de sus estructuras reproductivas femeninas, sino también de la evolución de las hojas y las ramas, particularmente la aparición de los fascículos en Pinaceae y la ocurrencia de hojas primarias y secundarias en todo el orden. Las aproximaciones utilizadas en este trabajo pueden aplicarse en el estudio de dichos caracteres y en conjunto con el estudio de las estructuras reproductivas, podría dibujarse un panorama completo de la evolución de las coníferas desde el Pérmico Superior hasta nuestros días.

Bibliografía

- Aase H (1915) Vascular anatomy of the megasporophylls of conifers. *Bot Gaz* 60:277-311
- Ahearn KP, Johnson HA, Weigel D, Wagner DR (2001) *NFL1*, a *Nicotiana tabacum* *LEAFY*-Like gene, controls meristem initiation and floral structure. *Plant Cell Physiol* 42:1130-1139
- Albert VA, Oppenheimer DG, Lindqvist C (2002) Pleiotropy, redundancy and the evolution of flowers. *Trends Plant Sci* 7:297-301
- Alvarez-Buylla E, Pelaz S, Liljegren SJ, Gold SE, Burgeff C, Ditta GS, Ribas LP, Martínez-Castilla L, Yanofsky MF (2000) An ancestral *MADS*-box gene duplication occurred before the divergence of plants and animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:5328-5333
- Alvin K (1960) Further conifers of the Pinaceae from Wealden formation of Belgium. *Inst R Sci Nat Belg Mém* 146:1-39
- Anthony RG, James PE, Jordan BR (1993) Cloning and sequence analysis of a *FLO/LFY* homologue isolated from cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. botrytis). *Plant Mol Biol* 22:1163-1166
- Averof M, Cohen SM (1997) Evolutionary origin of insect wings from ancestral gills. *Nature* 385:627-630
- Averof M, Patel NH (1997) Crustacean appendage evolution associated with changes in *Hox* gene expression. *Nature* 388:682-686
- Avise CJ (1994) *Molecular markers, natural history and evolution*. Chapman and Hall, New York
- Axsmith BJ, Taylor TN, Taylor EL (1998) A new fossil conifer from the Triassic of North America: Implications for models of ovulate cone scale evolution. *Int J Plant Sci* 159:358-366
- Ayala FJ (1999) Molecular clock mirages. *Bioessays* 21:71-75
- Ayala FJ, Barrio E, Kwiatowski J (1996) Molecular clock or erratic evolution? A tale of two genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:11729-11734
- Baum DA, Yoon HS, Oldham RL (2005) Molecular evolution of the transcription factor *LEAFY* in Brassicaceae. *Mol Phylogen Evol* 37:1-14
- Beck CB (1966) On the origin of Gymnosperms. *Taxon* 15:337-339
- Beck CB, Wight DC (1988) Progymnosperms. En: Beck CB (ed) *Origin and evolution of gymnosperms*. Columbia University Press, New York, p 1-84

- Becker A, Theissen G (2003) The major clades of *MADS*-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Mol Phylogen Evol* 29:464-489
- Benton MJ (1993) *The fossil record 2.0*. Chapman-Hall, London
- Bharathan G, Goliber TE, Moore C, Kessler S, Pham T, Sinha NR (2002) Homologies in leaf form inferred from *KNOXI* gene expression during development. *Science* 296:1858-1860
- Blazquez MA, Green R, Nilsson O, R. SM, Weigel D (1998) Gibberellins promote flowering of *Arabidopsis* by activating the *LEAFY* promoter. *Plant Cell* 10:791-800
- Blazquez MA, Weigel D (2000) Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature* 404:889-892
- Bomblies K, Wang RL, Ambrose BA, Schmidt RJ, Meeley RB, Doebley J (2003) Duplicate *FLORICAULA/LEAFY* homologs *zfl1* and *zfl2* control inflorescence architecture and flower patterning in maize. *Development* 130:2385-2395
- Bowe L, Coat G, dePamphilis C (2000) Phylogeny of seed plants based on all three genomic compartments: Extant gymnosperms are monophyletic and Gnetales closest relatives are conifers. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:4092-4097
- Bowman JL, Alvarez J, Weigel D, Meyerowitz EM, Smyth DR (1993) Control of flower development in *Arabidopsis thaliana* by *APETALA1* and interacting genes. *Development* 119:721-743
- Bromham L, Penny D (2003) The modern molecular clock. *Nat Rev Gen* 4:216-224
- Brooks DR, McLennan D (1994) Historical ecology as a research programme: scope, limitations and the future. En: Eggleton P, Vane-Wright RI (eds) *Phylogenetics and Ecology*. Academic Press, USA
- Burleigh JG, Mathews S (2004) Phylogenetic signal in nucleotide data from seed plants: implications for resolving the seed plant tree of life. *Am J Bot* 91:1599-1613
- Burleigh JG, Mathews S (2007a) Assessing among-locus variation in the inference of seed plant phylogeny. *Int J Plant Sci* 168:111-124
- Burleigh JG, Mathews S (2007b) Assessing systematic error in the inference of seed plant phylogeny. *Int J Plant Sci* 168:125-135
- Busch A, Gleissberg S (2003) EcFLO, a *FLORICAULA*-like gene from *Eschscholzia californica* is expressed during organogenesis at the vegetative shoot apex. *Planta* 217:841-848

- Carlsbecker A, Sundstrom J, Tandre K, Englund M, Kvarnheden A, Johanson U, Engstrom P (2003) The *DAL10* gene from Norway spruce (*Picea abies*) belongs to a potentially gymnosperm-specific subclass of *MADS*-box genes and is specifically active in seed cones and pollen cones. *Evol Dev* 5:551-561
- Carlsbecker A, Tandre K, Johanson U, Englund M, Engstrom P (2004) The *MADS*-box gene *DALI* is a potential mediator of the juvenile-to-adult transition in Norway spruce (*Picea abies*). *Plant J* 40:546-557
- Carmona MJ, Cubas P, Martinez-Zapater JM (2002) *VFL*, the grapevine *FLORICAULA/LEAFY* ortholog, is expressed in meristematic regions independently of their fate. *Plant Physiol* 130:68-77
- Carpenter R, Coen ES (1990) Floral homeotic mutations produced by transposon-mutagenesis in *Antirrhinum majus*. *Genes Dev* 4:1483-1493
- Carroll SB, Grenier JK, Weatherbee SD (2001) *From DNA to diversity: molecular genetics and the evolution of animal design*. Blackwell Science, Malden, MA.
- Chaw S-M, Parkinson C, Cheng Y, Vincent T, Palmer J (2000) Seed plant phylogeny inferred from all three plant genomes: Monophyly of extant gymnosperms and origin of Gnetales from conifers. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:4086-4091
- Chaw SM, Zharkikh A, Sung HM, Lau TC, Li WH (1997) Molecular phylogeny of extant gymnosperms and seed plant evolution: Analysis of nuclear 18s rRNA sequences. *Mol Biol Evol* 14:56-68
- Chang BSW (2003) Ancestral gene reconstruction and synthesis of ancient Rhodopsin in the laboratory. *Integr Comp Biol* 43:500-507
- Cheng Y, Nicolson R, Tripp K, Chaw S-M (2000) Phylogeny of Taxaceae and Cephalotaxaceae genera inferred from chloroplast *matK* gene and nuclear rDNA *ITS* region. *Mol Phylogenet Evol* 14:353-365
- Chujo A, Zhang Z, Kishino H, Shimamoto K, Kyojuka J (2003) Partial conservation of *LFY* function between rice and *Arabidopsis*. *Plant Cell Phys* 44:1311-9
- Clement-Westerhof JA (1988) Morphology and phylogeny of Paleozoic conifers. En: Beck CB (ed) *Origin and evolution of gymnosperms*. Columbia University Press, New York, p 299-337
- Coen ES, Romero JM, Doyle S, Elliot R, Murphy G, Carpenter R (1990) *Floricaula*: a homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*. *Cell* 63:1311-1322

- Crane PR (1985) Phylogenetic analysis of seed plants and the origin of angiosperms. *Ann Missouri Bot Gard* 72:716-793
- Cunningham CW, Omland KE, Oakley TH (1998) Reconstructing ancestral character states: a critical reappraisal. *Trends Ecol Evol* 13:361-366
- Cunningham CW (1999) Some limitations of ancestral character-state reconstruction when testing evolutionary hypotheses. *Syst Biol* 48:665-674
- DeLuna E, Mishler B (1996) El concepto de homología filogenética y la selección de caracteres taxonómicos. *Bol Soc Bot Mex* 59:131-146
- Dong ZC, Zhao Z, Liu CW, Luo JH, Yang J, Huang WH, Hu XH, Wang TL, Luo D (2005) Floral patterning in *Lotus japonicus*. *Plant Physiol* 137:1272-1282
- Donoghue MJ, Doyle JA (2000) Seed plant phylogeny: Demise of the anthophyte hypothesis? *Curr Biol* 10:R106-R109
- Dornelas MC, Rodriguez APM (2005a) The tropical cedar tree (*Cedrela fissilis* Vell., Meliaceae) homolog of the *Arabidopsis* *LEAFY* gene is expressed in reproductive tissues and can complement *Arabidopsis* leafy mutants. *Planta* 25:1-9
- Dornelas MC, Rodriguez APM (2005b) The rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.) homologue of the *LEAFY/FLORICAULA* gene is preferentially expressed in both male and female floral meristems. *J Exp Bot* 56:1965-1974
- Dornelas MC, Rodriguez APM (2005c) A *FLORICAULA/LEAFY* gene homolog is preferentially expressed in developing female cones of the tropical pine *Pinus caribaea* var. *caribaea*. *Gen Mol Biol* 28:299-307
- Endress PK (1996) Structure and function of female and bisexual organ complexes in Gnetales. *Int J Plant Sci* 157:S113-S125
- Farjon A, Ortiz-García S (2003) Cone and ovule development in *Cunninghamia* and *Taiwania* (Cupressaceae *sensu lato*) and its significance for conifer evolution. *Am J Bot* 90:8-16
- Farris JS (1970) Methods for computing Wagner trees. *Syst Zool* 19:83-92
- Ferrandiz C, Gu Q, Martienssen R, Yanofsky MF (2000) Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by *FRUITFULL*, *APETALA1* and *CAULIFLOWER*. *Development* 127:725-734
- Florin R (1951) Evolution of cordaites and conifers. *Acta Hort Berg* 15:285-388
- Florin R (1954) The female reproductive organs of conifers and taxads. *Biol Rev* 29:367-388

- Florin R (1963) The distribution of conifer and taxad genera in time and space. *Acta Hort Berg* 20:1-285
- Frohlich MW (2002) The mostly male theory of flower origins: summary and update regarding the Jurassic pteridosperm *Pteroma*. En: Cronk QCB, Bateman RM, Hawkins JA (eds) *Developmental genetics and plant evolution*. Taylor & Francis, London, p 85-108
- Frohlich MW (2003) An evolutionary scenario for the origin of flowers. *Nat Rev Genet* 4:559-566
- Frohlich MW, Parker DS (2000) The mostly male theory of flower evolutionary origins: From genes to fossils. *Syst Bot* 25:155-170
- Gocal GFW, King RW, Blundell CA, Schwartz OM, Andersen CH, Weigel D (2001) Evolution of floral meristem identity genes. Analysis of *Lolium temulentum* genes related to *APETALA1* and *LEAFY* of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 125:1788-1801
- Grande L, Rieppel O (1994) Introduction to pattern and process perspectives. En: Grande L, Rieppel O (eds) *Interpreting the Hierarchy of Nature*. Academic Press, USA
- Hart JA (1987) A cladistic analysis of conifers: preliminary results. *J Arn Arb Harv Univ* 68:269-307
- Harvey PH, Pagel MD (1991) *The comparative method in evolutionary biology*. Oxford University Press, USA
- Hasegawa M, Kishino K, T Y (1985) Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol* 22:160-174
- Hernández-Castillo GR, Rothwell GW, Mapes G (2001) Thucydiaceae Fam. Nov. With a review and reevaluation of Paleozoic walchian conifers. *Int J Plant Sci* 162:1355-1385.
- Himi S, Sano R, Nishiyama T, Tanahashi T, Kato M, Ueda K, Hasebe M (2001) Evolution of *MADS*-Box gene induction by *FLO/LFY* genes. *J Mol Evol* 53:387-393
- Hofer J, Turner L, Hellens R, Ambrose M, Matthews P, Michael A, Ellis N (1997) *UNIFOLIATA* regulates leaf and flower morphogenesis in pea. *Curr Biol* 7:R581-R587
- Irish VF (2003) The evolution of floral homeotic gene function. *BioEssays* 25:637-646
- Irish VF, Sussex IM (1990) Function of the *apetala-1* gene during *Arabidopsis* floral development. *Plant Cell* 2:741-753
- Kelly AJ, Bonnländer MB, Meeks-Wagner DR (1995) *NFL*, the tobacco homolog of *FLORICAULA* and *LEAFY*, is transcriptionally expressed in both vegetative and floral meristems. *Plant Cell* 7:225-234

- Kenrick P, Crane P (1997) The origin and early evolution of plants on land. *Nature* 389:33-39
- Kramer EM, Irish VF (2000) Evolution of the petal and stamen developmental programs: Evidence from comparative studies of the lower eudicots and basal angiosperms. *Int J Plant Sci* 161:S29-S40
- Kyozuka J, Konishi S, Nemotos K, Izawa T, Shimamoto K (1998) Down-regulation of *RFL*, the *FLO/LFY* homolog of rice, accompanied with panicle branch initiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:1979-1982
- Lam HJ (1954) Again: the new morphology – elucidated by the most likely phylogeny of the female coniferous cone. *Svensk Bot Tidskrift* 48:347-360
- Lamb RS, Hill TA, Tan QK-G, Irish VF (2002) Regulation of *APETALA3* floral homeotic gene expression by meristem identity genes. *Development* 129:2079-2086
- Levy YY, Dean C (1988) The transition to flowering. *Plant Cell* 10:1973-1989
- Losos JB (1999) Uncertainty in the reconstruction of ancestral character states and limitations on the use of phylogenetic comparative methods. *Anim Behav* 58:1319-1324
- Ma H (1998) To be, or not to be, a flower-control of floral meristem identity. *Trends Gen* 14:26-32
- Maddison DR, P. MW (2001) MacClade 4: Analysis of phylogeny and character evolution. Version 4.02. Sinauer Associates
- Maddison WP, Maddison DR (1992) MacClade 3.0. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Maizel A, Busch MA, Tanahashi T, Perkovic J, Kato M, Hasebe M, Weigel D (2005) The floral regulator *LEAFY* evolves by substitutions in the DNA binding domain. *Science* 308:260-263
- Magallón S, Sanderson MJ (2002) Relationships among seed plants inferred from highly conserved genes: sorting conflicting phylogenies signals among ancient lineages. *An J Bot* 89:1991-2006
- Mandel MA, Yanofsky MF (1995) A gene triggering flower formation in *Arabidopsis*. *Nature* 377:522-524
- Mapes G, Rothwell GW (1991) Structure and relationships of primitive conifers. *N Jb Geol Paläont Abh* 183:269-287.
- Marshall C, Schultze HP (1992) Relative importance of molecular, neontological, and paleontological data in understanding the biology of the vertebrate invasion on land. *J Mol Evol* 35:93-101

- Martínez-Castilla LP, Alvarez-Buylla ER (2003) Adaptive evolution in the *Arabidopsis* MADS-box gene family inferred from its complete resolved phylogeny. *Proc Natl Acad Sci* 100:13407-13412
- Mellerowicz EJ, Horgan K, Walden A, Coker A, Walter C (1998) *PRFLL* -a *Pinus radiata* homologue of *FLORICAULA* and *LEAFY* is expressed in buds containing vegetative shoot and undifferentiated male cone primordia. *Planta* 206:619-629
- Meyen SV (1984) Basic features of gymnosperm systematics and phylogeny as evidenced by the fossil record. *Bot Rev* 50:1-111
- Meyen SV (1987) Evolution of Ginkgoopsida: from Peltaspermales to Ginkgoales, Leptostrobales and Caytoniales. *Bull Soc Bot France* 134:67-76
- Miller CN (1977) Mesozoic conifers. *Bot Rev* 43:217-280
- Miller CN (1988) The origin of modern conifer families. En: Beck CB (ed) *Origin and evolution of gymnosperms*. Columbia University Press, New York
- Miller CN (1999) Implications of fossil conifers for the phylogenetic relationships of living families. *Bot Rev* 65:239-277
- Miller JS, Venable DL (2003) Floral morphometrics and the evolution of sexual dimorphism in *Lycium* (Solanaceae). *Evolution* 57:74-86
- Molinero-Rosales N, Jamilena M, Zurita S, Gomez P, Capel J, Lozano R (1999) *FALSIFLORA*, the tomato orthologue of *FLORICAULA* and *LEAFY*, controls flowering time and floral meristem identity. *Plant J* 20:685-693
- Mouradov A, Glassick T, Hamdorf B, Murphy L, Fowler B, Marla S, Teasdale RD (1998) *NEEDLY*, a *Pinus radiata* ortholog of *FLORICAULA/LEAFY* genes, expressed in both reproductive and vegetative meristems. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6537-6542
- Mouradov A, Glassick TV, Hamdorf B, Murphy L, Marla S, Yang Y, Teasdale RD (1998) Family of MADS -Box genes expressed early in male and female reproductive structures of monterey pine. *Plant Phys* 117:55-61
- Mouradov A, Hamdorf B, Teasdale RD, Kim JT, Winter KU, Theissen G (1999) A DEF/GLO-like MADS-box gene from a gymnosperm: *Pinus radiata* contains an ortholog of angiosperm B class floral homeotic genes. *Dev Gen* 25:245-52
- Mundry M, Stutzel T (2004) Morphogenesis of the reproductive shoots of *Welwitschia mirabilis* and *Ephedra distachya* (Gnetales), and its evolutionary implications. *Org Div Evol* 4: 91-108

- Nilsson L, Carlsbecker A, Sundas-Larsson A, Vahala T (2007) *APETALA2* like genes from *Picea abies* show functional similarities to their *Arabidopsis* homologues. *Planta* 225:589-602
- Nixon C, Carpenter JM (1996) On simultaneous analysis. *Cladistics* 12:221-241
- Ordidge M, Chiurugwi T, Tooke F, Battey NH (2005) *LEAFY*, *TERMINAL FLOWER1* and *AGAMOUS* are functionally conserved but do not regulate terminal flowering and floral determinacy in *Impatiens balsamina*. *Plant J* 44:985-1000
- Page CN (1990) Coniferophytina. En: Kramer KU, Green PS (eds) *Pteridophytes and gymnosperms*. Springer-Verlag, p 281-361
- Pagel M (1994) Detecting correlated evolution on phylogenies: a general method for the comparative analysis of discrete characters. *Proc R Soc London Ser B* 255:37-45
- Pagel M, Meade A, Barker D (2004) Bayesian estimation of ancestral character states on phylogenies. *Syst Biol* 53:673-684
- Parcy F (2005) Flowering: a time for integration. *Int J Dev Biol* 49:585-593
- Parcy F, Bomblies K, Weigel D (2002) Interaction of *LEAFY*, *AGAMOUS* and *TERMINAL FLOWER1* in maintaining floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Development* 129:2519-2527
- Parcy F, Nilsson O, Busch MA, Lee I, Weigel D (1998) A genetic framework for floral patterning. *Nature* 395:561-566
- Poort RJ, Visscher H, Dilcher DL (1996) Zoidogamy in fossil gymnosperms: The centenary of a concept with special reference to prepollen of late Paleozoic conifers. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:11713-11717
- Posada D, Crandall KA (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817-818
- Price RA (1996) Systematics of the Gnetales: A review of morphological and molecular evidence. *Int J Plant Sci* 157:S40-S49
- Pruitt RE, Bowman JL, Grossniklaus U (2003) Plant genetics: a decade of integration. *Nat Genet* 33:S294-S304
- Rambaut A (1996) Se-AL v1: Sequence Alignment Editor. v1. Available at <http://evolve.zoo.ox.ac.uk/>
- Raubeson LA, Jansen RK (1992) A rare chloroplast-DNA structural mutation is shared by all Conifers. *Biochem Sys Ecol* 20:17-24

- Riechmann JL, Wellmer F (2005) Gene network analysis in plant development by genomic technologies. *Int J Dev Biol* 49:745-759
- Rieppel O (1993) The conceptual relationship of ontogeny, phylogeny and classification. The taxic approach. En: Hecht M, Macintyre R, Clegg MT (eds) *Evolutionary Biology*. Plenum Press, New York
- Rodríguez F, Oliver JF, Marín A, Medina JR (1990) The general stochastic model of nucleotide substitution. *J Theor Biol* 142:485-501
- Ronquist F (2004) Bayesian inference of character evolution. *Trends Ecol Evol* 19:475-481
- Rossnes R, Eidhammer I, Liberles DA (2005) Phylogenetic reconstruction of ancestral character states for gene expression and mRNA splicing data. *BMC Bioinformatics* 6:127
- Rothwell GW, Mapes G, Hernández-Castilo, GR (2005) *Hanskerpia* Gen. Nov. And relationships among the most ancient conifers. *Taxon* 54:733-750
- Rottmann WH, Meilan R, Sheppard LA, Brunner AM, Skinner JS, Ma C, Cheng S, Jouanin L, Pilate G, Strauss SH (2000) Diverse effects of overexpression of *LEAFY* and *PTLF*, a poplar (*Populus*) homolog of *LEAFY/FLORICAULA*, in transgenic poplar and *Arabidopsis*. *Plant J* 22:235-245
- Rutledge R, Regan S, Nicolas O, Forbert P, Cote C, Bosnich W, Kauffeldt C, Sunohara G, Seguin A, Stewart D (1998) Characterization of an *AGAMOUS* homologue from the conifer black spruce (*Picea mariana*) that produces floral homeotic conversions when expressed in *Arabidopsis*. *Plant J* 15:625--634
- Rydin C, Källersjö M, Friis EM (2002) Seed plant relationships and the systematic position of Gnetales based on nuclear and chloroplast DNA: Conflicting data, rooting problems, and the monophyly of conifers. *Int J Plant Sci* 163:197-214
- Sánchez-Baracaldo P, Hayes PK, Blank CE (2005) Morphological and habitat evolution in the Cyanobacteria using a compartmentalization approach. *Geobiology* 3:145-165.
- Sanderson MJ (2001) r8s. 1.01b. University of California, Davis, USA.
- Sanderson MJ (2002) Estimating absolute rates of molecular evolution and divergence times: a penalized likelihood approach. *Mol Biol Evol* 19:101-109
- Sattler R (1988) Homology: A continuing challenge. *Syst Bot* 9: 382-394
- Sattler R (1994) Homology, homeosis and process morphology in plants. En: Hall BK (ed) *Homology: The hierarchical basis of comparative biology*. Academic Press, New York

- Sattler R, Rutishauser R (1997) The fundamental relevance of morphology and morphogenesis to plant research. *Ann Bot* 80:571-582
- Schultz EA, Haughn GW (1991) *LEAFY*, a homeotic gene that regulates inflorescence development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 3:771-781
- Schulz C, Jagel A, Stutzel T (2003) Cone morphology in *Juniperus* in the light of cone evolution in Cupressaceae *s.l.* *Flora* 198:161-177
- Schweitzer HJ (1963) Der weibliche Zapfen von *Pseudovoltzia libeana* und seine Bedeutung für die phylogenie der Koniferen. *Paleontographica* 113B:1-29
- Shannon S, Meeks-Wagner DR (1993) Genetic interactions that regulate inflorescence development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 5:639-655
- Shigyo M, Ito M (2004) Analysis of gymnosperm two-AP2-domain-containing genes. *Dev Gen Evol* 214:105-114
- Shindo S, Sakakibara K, Sano R, Ueda K, Hasebe M (2001) Characterization of a *FLORICAULA/LEAFY* homologue of *Gnetum parvifolium* and its implications for the evolution of reproductive organs in seed plants. *Int J Plant Sci* 162:1199-1209
- Shitsukawa N, Takagishi A, Ikari C, Takumi S, Murai K (2006) *WFL*, a wheat *FLORICAULA/LEAFY* ortholog, is associated with spikelet formation as lateral branch of the inflorescence meristem. *Genes Genet Syst* 81:13-20
- Shu G, Amaral W, Hileman LC, Baum DA (2000) *LEAFY* and the evolution of rosette flowering in violet cress (*Jonopsidium acaule*, Brassicaceae). *Am J Bot* 87:634-641
- Soltis DE, Soltis PS, Zanis MJ (2002) Phylogeny of seed plants based on evidence from eight genes. *Am J Bot* 89:1670-1681
- Souer E, van der Krol A, Kloos D, Spelt C, Bliet M, Mol J (1998) Genetic control of branching pattern and floral identity during *Petunia* inflorescence development. *Development* 125:733-742
- Southerton SG, Strauss SH, Olive MR, Harcourt RL, Decroocq V, Zhu X, Llewellyn DJ, Peacock WJ, Dennis ES (1998) *Eucalyptus* has a functional equivalent of the *Arabidopsis* floral meristem identity gene *LEAFY*. *Plant Mol Biol* 37:897-910
- Stefanovic S, Jager M, Deutsch J, Broutin J, Masselot M (1988) Phylogenetic relationships of conifers inferred from partial 28S rRNA gene sequences. *Am J Bot* 85:688-697

- Stockey RA (1982) The Araucariaceae: an evolutionary perspective. *Rev Paleobot Palynol* 37:133-154
- Stützel T, Röwekamp I (1999) Female reproductive structures in Taxales. *Flora* 194:145–157
- Sundstrom J, Carlsbecker A, Svensson ME, Svenson M, Johanson U, Theissen G, Engstrom P (1999) *MADS*-box genes active in developing pollen cones of Norway spruce (*Picea abies*) are homologous to the B-class floral homeotic genes in angiosperms. *Dev Genet* 25:253-266
- Swofford DL (2000) PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and other methods). 4.0b. Sinauer associates
- Swofford DL y Maddison WP (1987) Reconstructing ancestral character states under Wagner parsimony. *Math Biosci* 87:199-229
- Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 10:512-526
- Tanahashi T, Sumikawa N, Kato M, Hasebe M (2005) Diversification of gene function: homologs of the floral regulator *FLO/LFY* control the first zygotic cell division in the moss *Physcomitrella patens*. *Development* 132:1727-1736
- Tandre K, Albert VA, Sundas A, Engstrom P (1995) Conifer homologues to genes that control floral development in angiosperms. *Plant Mol Biol* 27:69-78
- Tandre K, Svenson M, Svensson ME, Engstrom P (1998) Conservation of gene structure and activity in the regulation of reproductive organ development of conifers and angiosperms. *Plant J* 15:615-623
- Tomlinson PB, Takaso T (2002) Seed cone structure in conifers in relation to development and pollination: a biological approach. *Can J Bot* 80:1250-1273
- Vahala T, Oxelman B, Arnold S (2001) Two *APETALA2*-like genes of *Picea abies* are differentially expressed during development. *J Exp Bot* 52:1111-1115
- Wada M, Cao QF, Kotoda N, Soejima J, Masuda T (2002) Apple has two orthologues of *FLORICAULA/LEAFY* involved in flowering. *Plant Mol Biol* 49:567-577
- Wagner D, Sablowski RWM, Meyerowitz EM (1999) Transcriptional activation of *APETALA1* by *LEAFY*. *Science* 285:582-584
- Wake MH (1994) The use of unconventional morphological characters in analysis of systematic patterns and evolutionary processes. En: Grande L, Rieppel O (eds) *Interpreting the Hierarchy of Nature*. Academic Press, USA

- Wang C-N, Moller M, Cronk QB (2004) Altered expression of *GFLO*, the Gesneriaceae homologue of *FLORICAULA/LEAFY* is associated with the transition to bulbil formation in *Titanotrichum oldhamii*. *Dev Genes Evol* 214:122-127
- Weigel D, Alvarez J, Smyth DR, Yanofsky MF, Meyerowitz EM (1992) *LEAFY* controls floral meristem identity in *Arabidopsis*. *Cell* 69:843-859
- Weigel D, Meyerowitz EM (1993) Activation of floral homeotic genes in *Arabidopsis*. *Science* 261:1723-1726
- Weigel D, Nilsson O (1995) A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants. *Nature* 377:495
- Wilde M (1944) A new interpretation of Coniferous cones I. Podocarpaceae (*Podocarpus*). *Ann Bot* 8: 1-45
- Wilkins AS (2002) *The evolution of developmental pathways*. Sinauer, Sunderland, MA
- Woodland DW (1991) *Contemporary plant systematics*. Prentice Hall, USA
- Yu Q, Moore PH, Albert HH, Roder AH, Ming R (2005) Cloning and characterization of a *FLORICAULA/LEAFY* ortholog, *PFL*, in polygamous papaya. *Cell Res* 15:576-584
- Zuckerkindl E, Pauling L (1965) Evolutionary divergence and convergence in proteins. En: Bryson V, Vogel HJ (eds) *Evolving genes and proteins*. Academic Press, New York, p 97-166

Apéndice 1

Codificación de caracteres

1. Simetría del eje (0) radial, (1) bilateral. Este carácter no es aplicable a *Ginkgo*, donde el eje reproductivo esta compuesto por dos óvulos pedunculados. Los ejes bisimétricos de Ephedraceae y Welwitschiaceae son considerados bilaterales y Gnetaceae, cuyos ejes reproductivos estan conformados únicamente por el óvulo incluyendo sus tres tegumentos es codificado como radial.
2. Dorsoventralidad (0) eje sin compresión dorsoventral, eje comprimido dorsoventralmente (1). Se consideran con compresión dorsoventral a aquellos ejes con una marcada dorsoventralidad. Tanto Gnetaceae como Ephedraceae son codificados con (0) ya que la dorsoventralidad en estos grupos es incipiente. De acuerdo con el registro fósil en la condición ancestral no existía dorsoventralidad, carácter que fue acentuándose a través del tiempo.
3. Número de apéndices estériles (0) cero a cinco, (1) más de cinco. Se consideran apéndices estériles aquellos componentes del eje no asociados con el óvulo, como las brácteas en Gnetales y los haces vasculares de las escamas ovulíferas en Coniferales, de acuerdo con las interpretaciones de Florin.
4. Asociación escama ovulífera-bráctea (0) el eje o la escama ovulífera crece libre de la bráctea, (1) ambas estructuras se encuentran fusionadas. En Araucariaceae la bráctea se encuentra casi fusionada a la escama ovulífera casi en su totalidad, excepto en el ápice y es codificada con (1). En Taxodiaceae encontramos géneros como *Cunninghamia*, donde el carácter no es aplicable, ya que no existe escama ovulífera o como *Cryptomeria*, donde la bráctea y la escama ovulífera se fusionan sólo en la base del complejo, así que esta familia se codificó como polimórfica.
5. Longitud de la bráctea respecto a la escama ovulífera o al eje reproductivo (0) el ápice de la bráctea no alcanza el ápice de la escama ovulífera o del eje (1) la bráctea rebasa el ápice de la escama ovulífera o del eje o es del mismo largo. De acuerdo con el registro fósil la condición ancestral es la de ejes asociados a brácteas que no alcanzan el ápice del eje. En la familia Pinaceae este carácter no es constante y es codificado como polimórfico (01). *Abies bracteata* y *Pseudotsuga* presentan complejos donde la bráctea rebasa el ápice de la escama ovulífera.

Para Taxodiaceae y Cupressaceae existe evidencia de que la bráctea es el componente más conspicuo del complejo portador de óvulos.

6. Longitud de las estructuras estériles respecto al óvulo (0) el ápice del óvulo no es rebasado por los apéndices estériles del eje (1) el ápice de los apéndices estériles rebasan al óvulo.

Dentro de Coniferales únicamente en Taxaceae y Phyllocladaceae encontramos ejes reproductivos donde el ápice del óvulo no es cubierto por el arilo.

7. Grado de fusión de los apéndices del eje (0) apéndices libres, (1) apéndices parcialmente fusionados, (2) apéndices totalmente fusionados. En los ordenes basales de gimnospermas no existe fusión de los componentes del eje, excepto en Welwitschiaceae, donde las bracteolas se encuentran fusionadas en la base junto con el óvulo. En Coniferales la condición más común es la presencia de apéndices completamente fusionados, con excepción de *Cryptomeria* que presenta apéndices parcialmente fusionados en la base, y las familias Phyllocladaceae, Taxaceae y Cephalotaxaceae, donde el apéndice estéril está representado por un arilo que se desarrolla independientemente del óvulo y que no muestra evidencia de ser producto de una fusión de apéndices.

8. Posición del óvulo (0) ejes femeninos con óvulos terminales, (1) óvulos laterales. Florin (1951) plantea que la lateralización del óvulo es consecuencia del recurvamamiento de la megasporófila mientras que Clement-Westerhof (1988) y Schweitzer (1963) plantean que el óvulo se desplazo a una posición lateral. En este caso se codificó como lateral dependiendo de la posición respecto a la escama ovulífera o a la megasporófila (Cycadales), independientemente de la causa de la lateralización.

9. Dirección del óvulo (0) invertido, (1) erecto. Se codificaron como invertidos aquellos óvulos cuyos micrópilos están claramente dirigidos a la axila del eje reproductivo.

10. Número de óvulos por eje reproductivo (0) uno, (1) dos (2) más de dos. En la mayor parte de las familias el número de óvulos por eje permanece constante. En los únicos linajes donde varía el número de óvulos encontramos regularmente más de dos óvulos por eje.

Apéndice 2

Matriz de datos morfológicos. Se presentan los estados de carácter para cada taxon y los 10 caracteres definidos en el apéndice 1.

Taxon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ginkgoales	?	0	0	0	0	?	0	0	0	1

Cycadales	0	0	0	0	0	?	0	1	0	2
Gnetaceae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ephedraceae	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Welwitschiaceae	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0
Pinaceae	1	1	1	0	01	1	2	1	1	1
Phyllocladaceae	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
Podocarpaceae	1	0	0	0	0	1	2	1	1	0
Araucariaceae	1	1	1	1	1	1	2	1	1	0
Sciadopityaceae	1	1	1	0	0	1	2	1	1	2
Taxaceae	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cephalotaxaceae	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1
Taxodiaceae	1	1	01	01	1	1	12	1	01	2
Cupressaceae	1	1	01	1	1	1	2	1	1	2
Walchiaceae	1	1	1	0	01	0	01	1	1	1
Majonicaceae	1	1	01	1	1	01	1	1	1	0
<i>Ullmania</i>	1	1	0	1	1	0	2	1	1	0
<i>Thuringiostrobus</i>	01	0	1	0	1	0	0	1	1	0
<i>Sashinia</i>	0	0	1	0	1	0	0	1	1	2
<i>Voltzia</i>	1	1	0	1	1	0	1	1	1	2