



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**Alternativas de fechamiento para grupos con poca representación en el  
registro fósil: el caso de la familia Bromeliaceae**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**BIÓLOGA**

**Presenta: CLAUDIA ANGÉLICA MONTES AZCUÉ**

**Directora de tesis: Dra. Carolina Granados Mendoza**

**Asesor interno: Dr. Carlos Castillejos Cruz**

Ciudad de México, 2020



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.

## CONTENIDO

ÍNDICE .....	2
AGRADECIMIENTOS .....	5
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS .....	7
RESUMEN .....	8
INTRODUCCIÓN .....	9
Generalidades de la familia Bromeliaceae y el género <i>Tillandsia</i> .....	10
Fechamiento de linajes de plantas con flores .....	12
Fuentes de datos moleculares para la generación de contextos filogenéticos en plantas .....	16
Fósiles atribuidos a la familia Bromeliaceae .....	20
Estudios previos sobre la morfología del polen en Bromeliaceae .....	23
Fechamientos previos en la familia Bromeliaceae .....	28
Trabajos enfocados en grupos distintos a Bromeliaceae .....	28

Trabajos enfocados en la familia Bromeliaceae .....	31
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN .....	34
HIPOTESIS .....	34
OBJETIVOS .....	35
MÉTODOS .....	36
Revisión bibliográfica .....	36
Revisión de la asignación taxonómica del polen fósil de Graham (1985) .....	36
Muestreo taxonómico.....	37
Métodos bioinformáticos.....	37
Selección de marcadores moleculares.....	37
Alineamiento de secuencias y concatenación de matrices .....	39
Análisis filogenético y de fechamiento.....	40
RESULTADOS .....	43
Revisión de la descripción y asignación taxonómica del polen fósil de .....	43
Evaluación de la estrategia de fechamiento más adecuada.....	44

Edades troncales y corona de Bromeliaceae, Tillandsioideae y <i>Tillandsia</i> .....	44
Comparaciones con estimados de fechamiento previos .....	45
DISCUSIÓN .....	49
Descripción y revisión de la asignación taxonómica del polen fósil de Graham (1985) .....	49
Evaluación de la estrategia de fechamiento más adecuada .....	51
Edades troncales y corona de Bromeliaceae, Tillandsioideae y <i>Tillandsia</i> .....	52
Comparaciones con estimados de fechamiento previos .....	53
CONSIDERACIONES FINALES .....	54
LITERATURA CITADA .....	56
ANEXO .....	64

## **AGRADECIMIENTOS**

La presente investigación recibió financiamiento de los proyectos SEP-CONACYT, Investigación Científica Básica, No. 286249 y Proyecto PAPIIT-DGAPA-UNAM, No. IA202319 (responsable técnico: Carolina Granados Mendoza) y CONACYT, Fronteras de la Ciencia, No. 2016-01-1867 (responsable técnico: Susana A. Magallón Puebla).

A la Universidad Nacional Autónoma de México mi alma mater que, además de darme una formación académica increíble, me permitió rodearme de personas maravillosas.

A la Facultad de estudios Superiores Zaragoza, que me permitió cursar la carrera de Biología y pasar los mejores años de mi vida.

Al instituto de Biología que hizo enamorarme aún más de mi carrera y conocer de viva voz el quehacer científico.

A la Dra. Carolina Granados Mendoza quien formo parte integral de este trabajo, compartió siempre con mucha amabilidad sus conocimientos y revisó meticulosamente este texto.

Al Dr. Carlos Castillejos Cruz, quien me asesoró siempre con excelencia y con la mayor disponibilidad, siendo una mano amiga en toda mi formación académica.

Al Dr. Santiago Ramírez Barahona, quien hizo grandes aportaciones a este trabajo y por su abierta colaboración.

Agradezco a la Dra. Susana A. Magallón Puebla por sus contribuciones al presente trabajo y amables enseñanzas.

Al personal de la biblioteca del Instituto de Biología, quienes me apoyaron en la obtención del material necesario para mi investigación.

A mi madre Angélica Azcué, quien siempre sostuvo mi mano en los momentos más difíciles. Esto va especialmente para ti.

A mis tías Susana, Concepción y Alicia, por escuchar y aconsejarme sabiamente.

A mis amigas Eyra, Monse, Martha, Anabel, Kalid, Madison, Tania por su apoyo incondicional en todos los aspectos de mi vida. A Francisco, Jovani, Eduardo, Gerardo, Maximiliano y Clarisa, con quienes tuve el honor de coincidir en la universidad y pasar momentos increíbles. A mis amigos del Instituto de Biología Oscar, Gabriela, Sandra, Daniel, Rebeca y Emmanuel por compartir amablemente todos sus conocimientos.

A mi hermana que a su manera tan única siempre me ha motivado y a mi sobrina Miranda, la luz de mi vida. A mi Alfonsito, mi fiel compañero, mi buen augurio, que me acompañó alegremente en mis noches de desvelo. Te extraño siempre.

## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

Figuras	Página
1. Posición de la región matK-trnK el gen ycf1 en el genoma completo del cloroplasto de <i>Tillandsia usneoides</i>	18
2. Fotografía modificada de los granos de polen tipo 1 y 2 asignados por Graham 1985	22
3. Disposición de los granos de polen en la tétrada. Y formas heteropolares e isopolares	23
4. Representación del alineamiento del gen funcional ycf1, el pseudogen ycf1	37
5. Representación del alineamiento de la región matK-trnK	38
6. Árbol calibrado de Bromeliaceae en BEAST.	45
7. Comparación de las medias de edades troncales para Bromeliaceae de estudios anteriores y este trabajo.	46
8. Comparación de las medias de edades corona para Bromeliaceae de estudios previos con este trabajo.	46
9. Edades troncales de la subfamilia Tillandsioide obtenidas en este trabajo y en estudios previos	47
10. Se comparan las edades corona de la subfamilia Tillandsioide estimadas en este trabajo y estudios previos.	48
Tablas	
1. Clasificación y ejemplos de los tipos de granos de polen propuestos por Halbritter (1992).	26
2. Estudios de fechamiento que estimaron edades troncales y/o corona para Bromeliaceae	32



## RESUMEN

Se realizaron análisis de fechamiento con dos regiones del cloroplasto (i.e. región *matK-trnK* y gen *ycf1*) y un muestreo representativo de los principales linajes de familia Bromeliaceae, la subfamilia Tillandsioideae y el género *Tillandsia*. Se encontró que las características observables del polen fósil no son suficientes para confirmar o refutar su asignación a la familia Bromeliaceae, por lo que no es posible asignar inequívocamente dicho polen fósil a la familia Bromeliaceae. En consecuencia al nulo material fósil para la familia, la alternativa de fechamiento más confiable es la calibración secundaria. Las edades medias estimadas para Bromeliaceae fueron 102.94 m.a. (troncal; intervalo de 120.92-91.25 m.a.) y 63.23 m.a. (corona; intervalo de 96.7-32.43 m.a.); para Tillandsioideae 43.19 m.a. (troncal; intervalo de 71.44-22.59 m.a.) y 37.77 m.a. (corona; intervalo de 59.94-19.31 m.a.); y para *Tillandsia* 19.65 m.a. (troncal; intervalo de 31.2-9.84 m.a.) y 18.99 m.a. (corona; 29.88-9.25 m.a.). El estimado de la edad troncal y corona de Bromeliaceae se encuentra dentro del rango obtenido en estudios previos, mientras que las edades troncales y corona de la subfamilia Tillandsioideae resultaron más antiguas que los trabajos previos. El presente estudio es el primero en proponer edades troncal y corona para *Tillandsia* y sus linajes internos.

## INTRODUCCIÓN

La vida en la Tierra está íntimamente vinculada a las plantas con flores (angiospermas). Las angiospermas son productoras primarias y representan la base energética, ecológica y estructural de los ecosistemas terrestres modernos (Magallón et al., 2015). Hoy en día, las plantas con flores son excepcionalmente diversas con aproximadamente 290.000 especies descritas (Ramírez-Barahona et al., 2020); de ese total un aproximado de 22% de especies está representado por monocotiledóneas (Iles et al., 2015). Muchos linajes biológicos han florecido en mutualidad con las monocotiledóneas dependiendo de ellos para comida, refugio o asociación simbiótica (Magallón et al., 2015).

A pesar del incremento en la disponibilidad de herramientas para conocer las edades de origen y diversificación en monocotiledóneas los estudios sobre algunas familias sigue siendo insuficiente para esclarecer dichas edades, tal es el caso de Bromeliaceae. Por ello proponemos en este trabajo incluir un muestreo más amplio para la familia, además de añadir una región de cloroplasto no utilizada para estudios de fechamiento (*ycf1*). con respecto al registro fósil, aquí compilamos los fósiles atribuidos para la familia y las razones por las que fueron descartados. Incluimos una evaluación morfológica de un fósil que no ha sido revisado por estudio alguno, además de que comparamos nuestras estimaciones con las de estudios previos.

## ANTECEDENTES

### Generalidades de la familia Bromeliaceae y el género *Tillandsia*

Bromeliaceae (Poales) constituye una de las familias de monocotiledóneas más distintivas de los bosques Neotropicales debido a su diversidad morfológica, su riqueza de especies (3,601 spp. clasificadas en 76 géneros (<http://bromeliad.nl/encyclopedia/> accedido 21/01/2020) y capacidad de establecerse en una amplia variedad de ambientes. Se distribuyen casi exclusivamente en el continente Americano, con excepción de *Pitcarnia feliciana* que se distribuye en África Occidental (McVaugh, 1989; Benzing, 2000; Givnish et al., 2004).

Anteriormente eran reconocidas tres subfamilias: Pitcairnioideae, Tillandsioideae y Bromeloideae (Smith y Downs, 1977). Sin embargo, un estudio molecular que analizó el gen del cloroplasto *ndhF* (Givnish et al., 2007) encontró que la subfamilia Pitcairnioideae, en su delimitación tradicional, no es monofilética. Con la finalidad de reconocer solo grupos naturales, los autores de dicho estudio propusieron una nueva delimitación de Pitcairnioideae y la segregación de otras cinco subfamilias (Brocchinioideae, Hechtioideae, Lindmanioideae, Puyoideae y Navioideae) dando un total de ocho subfamilias. Dicha clasificación fue confirmada por estudios moleculares posteriores (Crayn et al., 2000; Givnish et al., 2011; Schütz et al., 2016).

La subfamilia Tillandsioideae actualmente comprende cerca de 1,487 especies y fue dividida en cuatro tribus (Catopsideae, Glomeropitcairnieae, Tillandsieae y Vrieseae) con base en un análisis filogenético de las regiones del cloroplasto *rpoB-trnC-petN*, *matK-trnK* y el gen *ycf1*, así como el gen nuclear *PHYC* (Barfuss et al., 2016). La tribu Tillandsieae incluye al género *Tillandsia* L. así como a los géneros .; *Barfussia* Manzan. & W. Till, *Gregbrownia* W. Till & Barfuss, *Guzmania* Ruiz & Pav., *Lemeltonia* Barfuss & W. Till, *Pseudalcantarea* (Mez) Pinzón & Barfuss *Racinaea* M.A. Spencer & L.B. Sm, *Wallisia* E. Morren, y Al interior del género *Tillandsia* se reconocieron los subgéneros *Aerobia*, *Anoplophytum*, *Diaphoranthema*, *Phytarrhiza*, *Pseudovriesea*, *Viridantha* y *Tillandsia*, siendo este último el más diverso (casi 270 spp.). Estudios previos han recuperado consistentemente un linaje al interior del subgénero *Tillandsia* identificado inicialmente por Barfuss et al., (2005) como clado K, y confirmado más tarde por Granados Mendoza et al., (2017).

Las especies del género *Tillandsia* poseen características únicas resultado de su remarcable adaptabilidad a una gran variedad de ambientes. Sus hojas dispuestas en rosetas forman, en algunas especies, tanques que almacenan agua, hojarasca y materia orgánica. Dichos tanques son conocidos como fitotelmatas que permiten el desarrollo de microambientes con condiciones estables de humedad, temperatura y disponibilidad de nutrientes. Estos microambientes proporcionan refugio a diversos organismos asociados como artrópodos, aves, reptiles, anfibios, protoctistas, platelmintos, anélidos, hongos, algas e incluso otras plantas. Las

interacciones ecológicas de los fitotelmatas son de vital importancia para el ecosistema en general, particularmente en la dispersión, polinización e interacción entre especies (Liria, 2007; Isaza, 2009). A diferencia de la mayoría de las plantas vasculares, en donde la función de absorción de agua y nutrientes es desarrollada por las raíces, las tillandsias presentan tricomas peltados distribuidos sobre la superficie de hojas, brácteas y otras estructuras principalmente foliáceas que desempeñan dicha función de absorción. Otra característica remarcable en el género es la presencia de las vías fotosintéticas  $C_3$  y CAM en sus especies, atributos que posiblemente estén asociados con su capacidad de colonizar una amplia gama de ambientes (McVaugh, 1989; Benzing, 2000; Givnish et al., 2011;).

### **Fechamiento de linajes de plantas con flores**

Las edades de origen y diversificación de los diferentes linajes de plantas han sido de gran interés para la biología evolutiva, permiten insertar estudios de patrones evolutivos y biogeográficos en un contexto temporal (Magallón et al., 2015). La estimación de dichas edades puede estar basada tanto en el registro fósil y/o eventos geológicos, como en información de estudios previos. Los fósiles proveen un marco de referencia sobre el surgimiento, diversificación y extinción de linajes, además de ser evidencia física de los eventos biológicos pasados. Sin embargo, ciertos linajes carecen o tienen una representación pobre en el registro fósil debido a sesgos de preservación asociados, por ejemplo, a hábitos predominantemente herbáceos o a las condiciones ambientales donde se desarrollan como humedad y

temperatura elevada que promueven la descomposición. Para poder ser usado en un análisis de fechamiento, la asignación taxonómica y estrato al que pertenece el fósil deben ser confirmados con un nivel de certeza aceptable (Iles et al., 2015; Bromham et al., 2018). La incertidumbre en la determinación taxonómica de algunos fósiles puede deberse a que en muchos casos las estructuras conservadas son vegetativas, frecuentemente no diagnósticas, impidiendo realizar una asignación precisa a un grupo taxonómico determinado (Gómez, 1972; Smith y Till, 1998; Iles et al., 2015). Adicionalmente, existen casos en los que, aunque la asignación taxonómica de un fósil sea certera, su fechamiento no lo es, derivando en la imposibilidad de tomar dichos fósiles como referencia para el fechamiento de filogenias.

Una alternativa al uso exclusivo de fósiles es la integración de referencias a eventos geológicos de edad conocida, añadiendo una fuente adicional de validación e incorporando elementos para la interpretación biogeográfica. Sin embargo, no es recomendable utilizar dichos eventos geográficos de manera individual porque pueden asumir que la divergencia surgió como consecuencia directa de estos fenómenos en lugar de probar la coincidencia temporal (Renner, 2005).

Durante los últimos 60 años y gracias al progreso en diferentes métodos de análisis, se ha incrementado el conocimiento sobre la evolución de las plantas, así como del marco temporal en el cual se han dado eventos evolutivos clave (Ho, 2015; Lee y

Ho, 2016). Entre los avances analíticos, se encuentran aquellos asociados a la técnica del "reloj molecular", la cual fue propuesta en la década de 1960 con el objetivo de hipotetizar árboles evolutivos que no solo mostraran las relaciones entre especies, sino además las edades de origen y diversificación de los linajes. Dicha técnica actualmente combina el uso de filogenias moleculares con elementos de referencia de edad mínima conocida, asignados a los nodos (restricciones) los cuales pueden ser calibraciones "primarias" que integran edades conocidas de fósiles o eventos biogeográficos o calibraciones secundarias, que incorporan fechamientos provenientes de estudios previos. Su utilización ha tenido un impacto mayor en la biología filogenética y varios han sido los esfuerzos en la generación de métodos que permitan la obtención de edades más confiables (Bromham y Penny, 2003; Magallón, 2014; Lee y Ho, 2016; Schenk, 2016).

Inicialmente las hipótesis del reloj molecular asumían que las tasas de evolución molecular, que se definen como los cambios en secuencias de ADN o de proteínas a través del tiempo, eran constantes entre linajes, pero no a través de diferentes regiones del genoma (Ho, 2015). De manera que la distancia genética entre dos organismos, se refleja linealmente en el tiempo transcurrido desde la divergencia de su ancestro común más reciente asumiendo un reloj molecular estricto (Fourment y Darling, 2018). Sin embargo, las tasas de evolución en muchos organismos, especialmente en linajes altamente diversos, cambian con el tiempo a consecuencia de diferencias en las tasas de mutación, el tamaño poblacional y las presiones de

selección actuantes, algo que los métodos de reloj molecular estricto no reflejan. Puesto que la precisión en la estimación de las tasas de cambio juega un papel importante en las hipótesis sobre el tiempo de origen y diversificación de los linajes fue necesario desarrollar modelos más realistas como los relojes locales y el reloj molecular relajado (Fourment y Darling, 2018).

Los métodos de reloj molecular estricto, local y relajado se diferencian entre sí de acuerdo con el número de tasas de sustitución ( $k$ ) asumidas respecto al número de ramas ( $n$ ) a lo largo de un árbol filogenético. En el reloj molecular estricto el valor es de  $k=1$ , ya que la tasa de sustitución es la misma en todo el árbol; en los relojes locales, existen más de una tasa de sustitución en el árbol, pero menos que el número de ramas, es decir  $1 < k < n$ ; mientras que en los relojes relajados el número de tasas es igual al número de ramas  $k=n$ , es decir, cada rama tiene su propia tasa (Ho y Duchêne, 2014).

Los métodos de reloj relajado pueden dividirse en aquellos con “tersura” de tasas y los paramétricos. Los métodos con “tersura” de tasas asumen que la tasa de sustitución de cada linaje está correlacionada con la del linaje original, con cambios graduales de la tasa entre linajes vecinos ( Yang & Yoder 2000, Yoder & Yang, 2000;, 2000). Los relojes relajados estiman estadísticamente las tasas de sustitución entre sus ramas mediante probabilidad penalizada (semiparamétrico) o métodos Bayesianos (paramétricos). La probabilidad penalizada asume que las



tasas de sustitución de linajes ancestrales y descendientes (sobre un nodo) se correlacionan automáticamente en el tiempo, e introduce una penalización por los cambios bruscos de velocidad entre ellos. Los enfoques Bayesianos han permitido implementar modelos de evolución complejos y ricos en parámetros, incluidos los modelos de variación de tasas de sustitución entre linajes. Debido a la velocidad del cálculo de probabilidades de la cadena de Markov Monte Carlo, es posible utilizar simultáneamente longitudes de rama obtenidas de diferentes genes o particiones de datos (por ejemplo primera, segunda y tercera posición de los codones), cada una con su propio modelo evolutivo molecular ajustado (Bromham et al., 2018)

### **Fuentes de datos moleculares para la generación de contextos filogenéticos en plantas**

Los estudios filogenéticos de plantas con flores han utilizado cuatro fuentes principales de marcadores moleculares: 1) loci del genoma del cloroplasto, 2) loci ribosomal-nucleares, 3) genes nucleares de una o bajas copias, y 4) loci mitocondriales. Por su naturaleza generalmente de copia única y facilidad de amplificación, los marcadores del cloroplasto han sido los más frecuentemente usados en filogenética de plantas con flores (Soltis y Soltis, 1998; Granados-Mendoza et al., 2020).

En angiospermas una región ampliamente utilizada para la reconstrucción filogenética es la región del cloroplasto de *matK-trnK* (Soltis y Soltis, 1998). Dicho

marcador se localiza en la porción grande de una sola copia del cloroplasto (Figura 1) e incluye al gen *matK*, que codifica para una proteína madurasa, el cual se encuentra embebido en el intrón del gen *trnK*, que codifica para el RNA de transferencia de la lisina (*trnK*; Figura 1). Esta región tiene una longitud promedio de 1,550 pares de bases (pb) en las angiospermas (Soltis y Soltis, 1998). El gen *matK* se encuentra en la mayoría de las plantas terrestres con un amplio rango de sustitución molecular y es considerado un gen apropiado para resolver relaciones intergéricas o interespecíficas en plantas con semilla (Soltis y Soltis, 1998 Hilu et al., 2003).

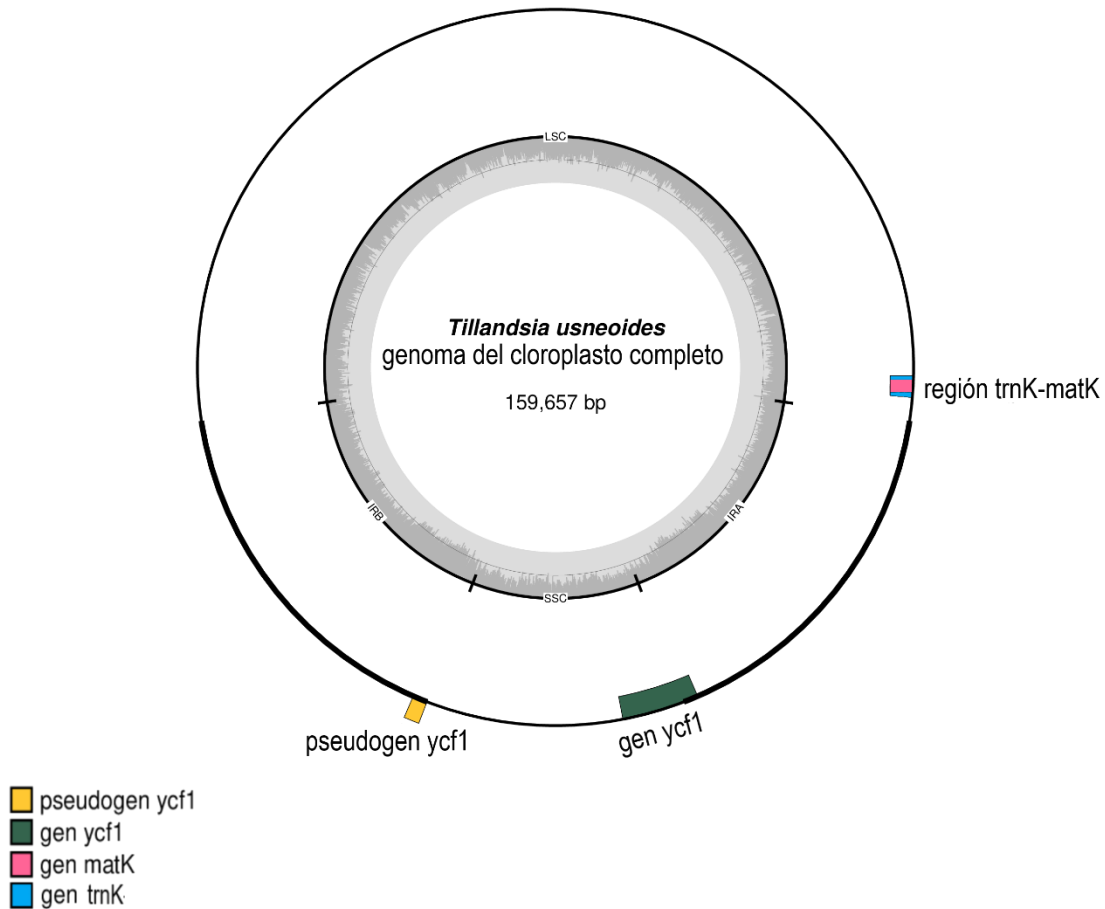


Figura 2. Posición de la región *matK-trnK* (rosa y azul), el gen *ycf1* (amarillo) y el pseudogen *ycf1* (verde) en el genoma completo del cloroplasto de *Tillandsia usneoides* (Número de acceso a GenBank KY293680.1).

Un gen menos frecuentemente usado, pero que se ha reconocido como la región codificante del cloroplasto más variable en diversos grupos de diferentes familias de plantas vasculares (Orchidaceae: Arévalo, 2015; Chase et al., 2009; Granados-

Mendoza et al., 2020; Neubig et al., 2012; Lamiaceae: Drew y Sytsma, 2011, 2013, 2012; Rosaceae: Shi et al., 2013; Pinaceae: Gernandt et al., 2009 y Bromeliaceae: Barfuss et al., 2016; Castello et al., 2016) es el gen del cloroplasto *ycf1*, presentando variaciones tanto en forma de sustituciones como de indels (Neubig et al., 2009). El gen *ycf1* se ha reportado en algunas algas verdes y está presente en la mayoría de las plantas con flores, pero se ha perdido en representantes de los órdenes Acorales y Malpigiales (Wicke et al., 2011), la familia Poaceae (de Vries et al., 2015), algunas eudicotiledóneas holoparásitas (*Orobanche purpurea*, Orobanchaceae) y fotosintéticas como *Vaccinium macrocarpon* y otras especies de las familias Ericaceae, Rodium y Geraniaceae (de Vries et al., 2015)). Este gen se ubica entre la copia única pequeña (SSC, por sus siglas en inglés) y la región invertida repetida "B" (IRB, por sus siglas en inglés). Tiene una longitud de 5593 pb en *Tillandsia usneoides* (KY293680.1) y en Bromeliaceae presenta un pseudogen de ca. 1,088 pb localizado en la región invertida repetida "A" (Poczai y Hyvönen (2017; Figura 1). Aunque sus funciones biológicas aún no son del todo claras, se cree que el gen *ycf1* codifica una proteína de aproximadamente 1,800 aminoácidos la cual es parte de un complejo de proteínas asociadas con la traslocación de polipéptidos a través de la membrana interna del cloroplasto (de Vries et al., 2015; Neubig et al., 2009). En la mayoría de los linajes de plantas terrestres, *ycf1* tiene tasas de sustitución elevadas y, en algunos casos, ha sufrido pseudogenización (Wicke et al., 2011). Su

nivel de variabilidad se ha comparado con la del espaciador transcrito interno (ITS, por sus siglas en inglés), pero sin estar duplicado (Neubig et al., 2009).

### **Fósiles atribuidos a la familia Bromeliaceae**

Con el propósito de conocer todos los fósiles previamente atribuidos a la familia los enlistamos a continuación, además de describir brevemente sus características morfológicas y su edad. Con la intención de reconocer si pueden utilizarse en estudios de fechamiento de manera confiable.

Smith y Till (1998) revisaron y descartaron una serie de registros fósiles atribuidos a la familia Bromeliaceae en publicaciones previas. En dicha revisión incluyeron: 1) *Bromelia tenuifolia* Lesquereux del Cretácico, consistente en un segmento corto de hoja casi oblongo, con margen finamente aserrado y nervadura paralela en toda su extensión, como sucede en muchas cicadáceas, y no así en las bromeliáceas en las que las venas convergen en los extremos (Gómez, 1972; Smith y Downs, 1974); 2) *Bromeliantus heuflerianus* Massalongo del Eoceno, consistente en una flor cuatro veces lobada, carácter que no es propio de Bromeliaceae donde las flores presentan sus partes en múltiplos de tres (Gómez, 1972); 3) *Bromelites dolinskii* Schmalhausen del Eoceno, que incluye fragmentos de raíces, tallos y bases de hojas con alargamientos epidérmicos (Schmalhausen, 1883), cuyas características no son lo suficientemente precisas para confirmar o descartar su pertenencia a Bromeliaceae (Gómez, 1972); 4) *Bromeliaceophyllum rhenanthum* Weyland y

*Bromelia oligovaenicum* Weyland, Herрман y Kilpper del Oligoceno superior consisten de impresiones en carbón marrón de células epidérmicas las cuales no están distribuidas en líneas regulares y tampoco presenta ningún indicio de los tricomas peltados distintivos de Bromeliaceae; y 5) *Bromelia gaudinii* Heer del Mioceno, que corresponde a fragmentos de hojas y tallos más bien largos que podrían corresponder a varias familias de monocotiledóneas. Dichos registros fueron también descartados por Gómez (1972) ya que no presentan caracteres diagnósticos que los relacionaran inequívocamente a Bromeliaceae.

Posteriormente, se reportó de Costa Rica *Karatophyllum bromelioides* (Gómez,1972), consiste en un molde de un fragmento de hoja con margen aserrado. Aunque Baresch et al., (2011) pudo corroborar su asignación taxonómica a la familia Bromeliaceae, incluso asociarla al género *Aechmea*, no pudo corroborar su edad, ya que la publicación original no precisó el área donde se encontró el fósil, mencionando únicamente el área San Ramón. Baresch et al., (2011) no localizó el sedimento descrito por Gómez (1979) registrado para la zona y asumió la edad de este registro como no confiable, imposibilitando su uso en estudios de fechamiento.

En 1985 Graham publicó de la Formación Gatuncillo del Eoceno medio al tardío dos granos de polen (tipos 1 y 2) a los que le asumió afinidades morfológicas con el género *Tillandsia* (Figura 2). Sin embargo, en un enfoque más conservador decidió atribuirlos a la familia Bromeliaceae. El polen tipo 1 de *Tillandsia* fue descrito por

Graham (1985) como prolado; monocolpado, con el colpus recto, estrecho, margen interno entero, de 45  $\mu\text{m}$  de largo, extendiéndose casi a todo lo largo del grano de polen; tectado-perforado, pared delgada (ca. 1.5-2  $\mu\text{m}$ ), finamente reticulado, lumen ligeramente irregular en el contorno, ca. 1-1.5  $\mu\text{m}$  en su superficie distal, disminuyendo hacia el colpus y especialmente hacia los polos, muri de casi 1-1.5  $\mu\text{m}$  de ancho, liso, con margen entero; 50-55  $\mu\text{m}$  por 25-30  $\mu\text{m}$ . El polen tipo 2 de *Tillandsia* comparte la mayoría de las características del tipo 1 difiriendo únicamente en tener un retículo mucho más grueso y un diámetro del lumen más grande ( 3-4  $\mu\text{m}$  vs. 1.5-2,  $\mu\text{m}$ ). La asignación estratigráfica del sedimento donde se localizaron los granos de polen fósil fue corroborada en el mismo estudio con análisis geológicos, la historia tectónica del yacimiento y la evaluación de otros microfósiles presentes en dichos sedimentos, específicamente invertebrados marinos.

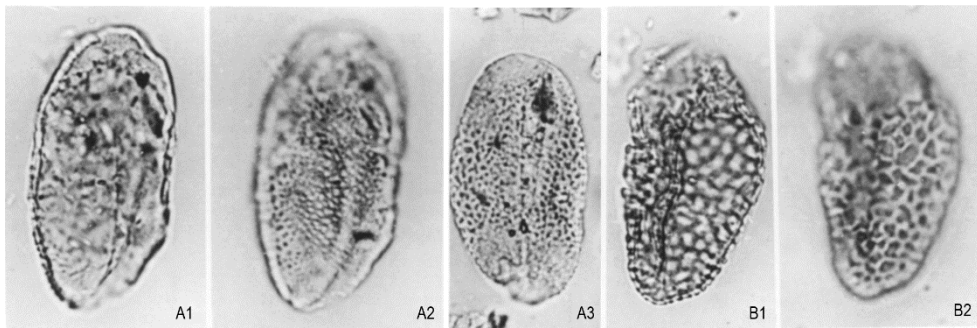


Figura 3. Fotografía modificada de los granos de polen tipo 1 (A1-A3) y 2 (B1-B2) asignados por Graham 1985 a Bromeliaceae y posiblemente a *Tillandsia*.

Posterior a la publicación de Graham (1985) no se ha realizado una revisión más exhaustiva para confirmar o refutar la asignación taxonómica de dichos granos de polen fósil a la familia Bromeliaceae.

### Estudios previos sobre la morfología del polen en Bromeliaceae

La forma de los granos de polen se describen con base en los ejes ecuatorial y polar que se conocen al analizar la posición de las microesporas en la tétrada meiótica (Figura 3), es decir en la etapa previa a la unidad de dispersión del grano de polen. El eje polar va desde el polo proximal localizado hacia el centro de la tetrada hasta el polo distal ubicado en el sitio más alejado del centro de la tétrada. Mientras que el eje ecuatorial es perpendicular al eje polar y se encuentra al centro de la microespora (Halbritter et al., 2018).

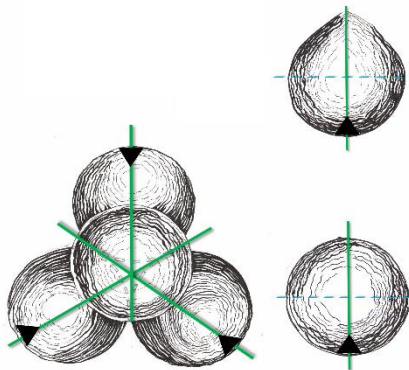


Figura 4. Del lado izquierdo se muestra la disposición de los granos de polen (círculos grises) en la tétrada. La región proximal es aquella que se encuentra más cercana al sitio de unión entre los cuatro granos de polen, opuesto al eje distal (triángulo negro). En el lado derecho se muestran granos de polen individuales (mónada) el eje polar (línea continua),

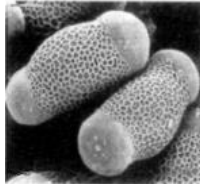
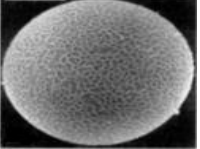
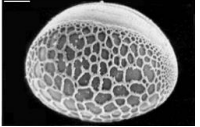



eje ecuatorial (línea punteada) y polo distal (triángulo negro). En la parte superior uno grano de polen heteropolar donde las caras proximal y distal son desiguales. En la parte inferior grano de polen isopolar con caras proximal y distal iguales.

Erdtman y Praglowski en (1974) analizaron 125 especies pertenecientes a 40 géneros y compilaron una diagnosis para los granos de polen de la familia Bromeliaceae. Dichos autores propusieron la división de la familia en dos grupos principales según el tipo de grano de polen que presentaran. En el grupo A clasificaron a los miembros con granos de polen con un solo sulco o poro, mientras que en el grupo B clasificaron a los miembros que poseen granos de polen con más de una apertura. Su estudio hasta la actualidad incluye el muestreo taxonómico más amplio para Bromeliaceae.

Uno de los estudios más completos y detallados para la familia es el de Halbritter (1992) quien describió y clasificó los granos de polen con base en la presencia o ausencia de sulcos y poros, así como los elementos de exina que los acompañan. Utilizó 338 especies distribuidas en 31 géneros y compiló un abundante material fotográfico. Describió a los granos de polen de la familia como mayoritariamente reticulados, pero también foveolados o raramente lisos y de acuerdo a su apertura se clasifican en tres tipos: 1) porado (restringido a la subfamilia Bromelioideae); 2) inaperturado; y 3) predominantemente sulcado. El tipo de polen sulcado a su vez se subdivide en seis subtipos: 1) *Puya* (subtipo a); 2) *Catopsis* (subtipo b); 3) sulco difuso (subtipo c); 4) insular (subtipo d); 5) opérculo (subtipo e); y 6) *Vriesea* (actualmente *Alcantarea*) *imperialis* (subtipo f; Tabla 1). Halbritter (1992) clasificó

los subtipos a-b como de sulco simple y los subtipos c-f como de sulco con área de germinación distal (sulco “complejo”).

Tipo	Subtipo	Descripción	Ejemplo
<b>Porado</b>		1, 2, 3 (-4) poros, con elementos de exina variables	 <p data-bbox="1255 565 1507 618"><i>Nidularium innocentii</i> vista ecuatorial</p>
<b>Inaperturado</b>		No aperturado (sulco) no visible; exina reticulada	 <p data-bbox="1255 786 1545 839"><i>Guzmania monostachya</i> vista distal</p>
<b>Sulcado, tipo simple (Tipo A)</b>  Sulco con márgenes graduales más o menos claros; sin elementos de exina cubriendo la apertura; exina reticulada	<i>Puya</i> (a)	Sulcos con apertura de márgenes gradual	 <p data-bbox="1255 984 1507 1037"><i>Puya ferruginea</i> vista distal-ecuatorial</p>
	<i>Catopsis</i> (b)	Sulcos con márgenes de apertura más o menos claros	 <p data-bbox="1255 1232 1507 1286"><i>Catopsis</i> sp. vista distal-ecuatorial</p>

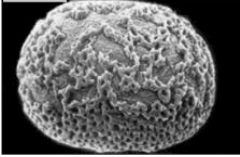
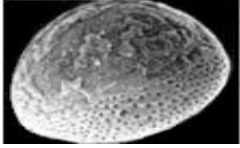
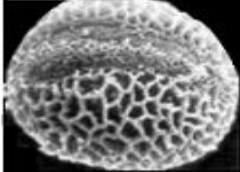

<b>Sulcado, complejo</b>  Sulcos con márgenes de apertura más o menos distintos e indistintos; elementos de exina cubriendo la apertura más o menos aislados; exina reticulada o raramente no reticulada	difuso (c)	Sulcos con márgenes indistintos ; más o menos coherentes, exina perdida (difusa), elementos cubriendo la apertura	 <i>Tillandsia glauca</i> vista distal
	insular (d)	Sulco con márgenes de apertura más o menos distintos ; insular tipo (parecido a una isla) elementos de exina compacta cubriendo la apertura	 <i>Tillandsia penladii</i> vista distal
	Opérculo (e)	Sulco con márgenes de apertura más o menos distintos; más o menos coherentes, elementos de exina compactos en el centro de la apertura (opérculo)	 <i>Tillandsia caerulea</i> vista distal
	<i>Alcantarea</i> (f) <i>Vriesea imperialis</i>	Sulco con márgenes de apertura más o menos distintos; más o menos coherentes, elementos de exina compacta en la apertura de los bordes	 <i>Tillandsia geminiflora</i> vista distal

Tabla 3. Clasificación y ejemplos de los tipos de granos de polen propuestos por Halbritter (1992). Microfotografías tomadas de Halbritter(1992).

Silva et al., (2016) analizó 16 especies de Bromelias distribuidas en 8 géneros presentes en el sureste de Brasil y las clasificó en tres categorías: a) tipo 1, granos de polen pantoporados; 2) tipo 2, granos de polen 2-porados; y 3) tipo 3, granos de polen 1-colpados.

### **Fechaamientos previos en la familia Bromeliaceae**

Los trabajos previos que han estimado la edad de origen y diversificación de la familia Bromeliaceae son escasos. La mayoría de los estudios de fechamiento que han incluido representantes de la familia Bromeliaceae se han enfocado en estimar las edades de los principales linajes de angiospermas o monocotiledóneas, donde los taxa utilizados para representar a la familia son limitados (Tabla 2). A continuación se describen dichos estudios.

#### *Trabajos enfocados en grupos distintos a Bromeliaceae*

A partir de una filogenia inferida con secuencias de *rbcL* mediante probabilidad penalizada Janssen y Bremer en el (2004) estimaron las edades de los principales linajes de monocotiledóneas. En el caso de la familia Bromeliaceae, incluyeron siete especies de los géneros *Aechmea*, *Ananas*, *Catopsis*, *Glomeropitcairnia*, *Hetchia*, *Puya* y *Tillandsia*, obteniendo una edad troncal de 112 m.a. y corona de 96 m.a. para la familia Bromeliaceae.

Con el propósito de obtener las edades corona y troncal para miembros del género *Sparganium*, perteneciente a la familia hermana de Bromeliaceae (Typhaceae). Sulman et al., (2013) analizaron con métodos bayesianos las regiones del cloroplasto *trnL-trnF*, *psbJ-petA*, la región ribosomal-nuclear ITS y el gen nuclear *phyC*, y calibraron el nodo raíz con un intervalo obtenido de Givnish et al., (2014). Para Bromeliaceae muestrearon tres especies correspondientes a dos géneros (*Brocchinia* y *Puya*) y determinaron su edad troncal en 100 m.a.

Bouchenak-Khelladi et al., (2014) utilizaron secuencias de los genes de cloroplasto *rbcL* y *ndhF* para estimar las edades de diferentes linajes dentro de Poales mediante métodos bayesianos. Dichos autores incluyeron un muestreo de 38 especies de Bromeliaceae, distribuidas en 34 géneros y calcularon la edad corona de la familia en 19.5 m.a.

Tank et al., (2015) estimaron las edades troncales para un amplio muestreo de familias de Angiospermas, incluyendo Bromeliaceae. Restringieron el nodo raíz con una edad obtenida por Zanne et al., (2014) quienes realizaron sus análisis de fechamiento sobre una filogenia previa obtenida por Soltis et al., (2011) que incluyó 17 marcadores (*18S*, *26S*, *matK*, *rbcL*, *ndhF*, *atpB*, *rps16*, *matK*, *rpoC2*, *rps3*, *rps4*, *atp1*, *nad5*, *psbB*, *psbT*, *psbN* y *psbH*) y como representantes de la familia Bromeliaceae cuatro especies del género *Vriesea*. El estimado de la edad troncal para la familia Bromeliaceae del estudio de Tank et al., (2015) fue de 85.9 m.a.

Magallón et al., (2015) estimaron el origen y diversificación de las angiospermas incluyendo sus clados mayores. Utilizaron un amplio muestreo de familias de angiospermas y secuencias de tres genes de plastídicos (*atpB*, *rbcl* y *matK*), así como dos marcadores ribosomal-nucleares (18S y 26S). En su estudio realizaron dos estimaciones, la primera mediante probabilidad penalizada y la segunda con el método bayesiano lognormal no correlacionado (UCNL, por sus siglas en inglés). De este último método, presentaron las edades de los diferentes clados. Incluyeron cuatro especies de Bromeliaceae correspondientes a los géneros *Vriesea* y *Puya* y propusieron una edad troncal de 75.9 m.a. para la familia.

Utilizando las regiones *atpB-rbcl*, *psbA-trnH*, *rpl32-trnL*, *rps16 intron* y *trnL-trnF* y métodos Bayesianos Zhou et al., en el (2018) investigaron las edades de origen y diversificación de miembros de los géneros *Typha* y *Saparganiium* (Typhaceae), donde incluyeron un muestreo de cinco especies, correspondientes a cinco subfamilias de Bromeliaceae, estimaron una edad troncal para la familia de 98.63 m.a.

Ramírez-Barahona et al., (2020) realizaron un análisis de fechamiento con el propósito de obtener las edades de origen y diversificación para las familias de angiospermas utilizando una filogenia genes nucleares ribosomales (18S, 26S, 5.8S) y genes plastidicos codificantes (*rbcl*, *atpB*, *matK*, *ndhF*) cuyo muestreo para la familia Bromeliaceae incluyó 17 especies correspondientes a 13 géneros.

Mediante métodos bayesianos realizaron dos análisis, el primero con la intención de reconocer la diferencias entre los supuestos de la edad corona de las angiospermas que a su vez incluyó tres análisis con distintos ajustes de calibración y el segundo con el propósito de evaluar el efecto de la variación de la confianza en las calibraciones utilizando dos diferentes conjuntos de fósiles basados en su asignación filogenética: 1) un conjunto completo que incluyó 238 fósiles utilizados para calibrar 203 nodos distintos y 2) un conjunto de 45 fósiles, cuyas relaciones fueron corroboradas meticulosamente mediante análisis filogenéticos, para calibrar 40 nodos. Lo que representa uno de los estudios más completos. Obtuvieron para la edad troncal de Bromeliaceae un estimado de 110.1 m.a.

#### *Trabajos enfocados en la familia Bromeliaceae*

Givnish et al., (2004) utilizaron la región *ndhF* y probabilidad penalizada para estimar las edades de divergencia entre la familia Rapataceae y Bromeliaceae. Incluyeron 35 especies pertenecientes a la familia Bromeliaceae correspondientes a 26 géneros, y obtuvieron una edad de 84 m.a. para el nodo troncal de Bromeliaceae y de 24 m.a. para el nodo corona.

Givnish et al., en el 2011 se enfocaron en estimar las edades de origen y diversificación de Bromeliaceae y sus subfamilias, incluyendo un muestreo más amplio de 90 especies de 46 géneros diferentes. Su estudio se realizó en dos etapas. En la primera calibraron una filogenia que incluyó un muestreo



representativo (333 taxa) de los principales linajes de las monocotiledóneas, incluyendo Bromeliaceae (71 taxa), y secuencias de la región *ndhF* analizadas con probabilidad penalizada y seis calibraciones fósiles. La segunda etapa consistió en un análisis que incluyó ocho marcadores (*atpB-rbcL*, *matK*, *ndhF*, *psbA-trnH*, *rpl32-trnL*, *rps16*, *trnL intron*, *trnL-trnF* y *ndhF*) y un muestreo representativo de las ocho subfamilias actualmente reconocidas para Bromeliaceae. Sin embargo, con una limitada representación de los géneros actualmente reconocidos para la subfamilia Tillandsioideae, así como de los diferentes subgéneros de *Tillandsia*. En esta filogenia se incluyó una calibración secundaria con edades obtenidas del primer análisis,  $100 \pm 5.2$  m.a. para el nodo troncal y  $19.1 \pm 3.4$  m.a. para el nodo corona de Bromeliaceae, mientras que las edades obtenidas para Tillandsioideae fueron 15.4 (troncal) y 11.8 m.a. (corona) y para del clado “core” Tillandsioideae 14.2 m.a. (troncal) y 8.7 m.a. (corona). Estos autores reportaron las edades troncal y corona para las subfamilias, tanto para la filogenia de *ndhF* como para la de ocho marcadores.

Tabla 2. Estudios de fechamiento que estimaron edades troncales y/o corona para Bromeliaceae.

<b>Autor y año</b>	<b>Grupo de interés</b>	<b>Regiones</b>	<b>Muestreo para Bromeliaceae</b>	<b>Troncal Bromeliaceae en m.a.</b>	<b>Corona Bromeliaceae en m.a</b>
Givnish et al., 2004	Rapataceae	<i>ndhF</i>	35 especies, 26 géneros	84	24
Janssen y Bremer., 2004	Monocotiledoneas	<i>rbcL</i>	7 especies, 7 géneros	112	96
Givnish et al., 2011	Bromeliaceae	<i>atpB-rbcL, matK, ndhF, psbA-trnH, rpl32-trnL, rps16, trnL intron, trnL-trnF</i>	90 especies, 46 generos	100	19.1
Sulman et al., 2013	Sparganium (Typhaceae)	<i>trnL-trnF, psbJ-petA, ITS y phyC</i>	3 especies, 2 géneros	100	NA
Bouchenak-Khelladi et al., 2014	Poales	<i>rbcL y ndhF</i>	38 especies, 34 géneros	100	19.5
Magallón et al., 2015	Angiospermae	<i>atpB, rbcL, matK, 18S rDNA y 26S rDNA</i>	1 especie, 1 género	75.9	NA
Tank et al., 2015	Angiospermae	18S rDNA, 26S rDNA, ITS, <i>matK, rbcL, atpB, and trnL-F</i>	1 taxa perteneciente a un género	85.59	NA
Zhou et al., 2018	Typhaceae	<i>atpB-rbcL, psbA-trnH, rpl32- trnL, rps16 intron y trnL- trnF</i>	5 especies, 5 géneros	98.63	20.73
Ramírez-Barahona et al., 2020	Angiospermas	18S, 26S, 5.8S; <i>rbcL, atpB, matK, ndhF</i>	17 especies, 13 géneros	110.1	26

## PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

Las preguntas de investigación que abordó el presente estudio fueron: 1) ¿El polen fósil de Graham (1985) podría ser asignado inequívocamente a la familia Bromeliaceae?; 2) ¿Cuál es la alternativa de fechamiento (calibración primaria vs. secundaria) más confiable para Bromeliaceae?. De acuerdo con la alternativa de fechamiento identificada como más confiable en el presente trabajo, 3) ¿Cuáles son las edades troncales y corona de Bromeliaceae, Tillandsioideae y *Tillandsia*?; y 4) ¿Cómo se comparan los fechamientos de estudios previos con los obtenidos en el presente trabajo?.

## HIPOTESIS

1. Dadas las escasas características observables en las microfotografías de los granos de polen fósil de Graham (1985), no será posible atribuirlos inequívocamente a la familia Bromeliaceae.
2. La alternativa de fechamiento con calibración secundaria será la opción factible para Bromeliaceae.
3. Las edades estimadas para la Bromeliaceae se encontrarán entre los 100 y 75 m.a. (troncal) y 32 a 19 m.a. (corona) mientras que, para Tillandsioideae entre los 16 a 14 m.a. (troncal) y 14 a 11 m.a (corona) y *Tillandsia* en un rango de 6 a 5 m.a. (troncal) 4 a 2 m.a. (corona).

4. Las edades estimadas en este estudio resultarán más antiguas que aquellas obtenidas en trabajos previos.

## **OBJETIVOS**

1. Evaluar si la asignación taxonómica del polen fósil de Graham (1985) a la familia Bromeliaceae es correcta.

2. Evaluar cuál es la estrategia de fechamiento más adecuada para la familia Bromeliaceae (calibración primaria o secundaria).

3. Determinar las edades troncales y corona de Bromeliaceae, Tillandsioideae y *Tillandsia* con la estrategia de fechamiento seleccionada.

4. Comparar las edades troncal y corona de Bromeliaceae, Tillandsioideae y *Tillandsia* de fechamientos de estudios previos con los obtenidos en el presente trabajo.

## **MÉTODOS**

### **Revisión bibliográfica**

Se consultó literatura sobre los fundamentos del reloj molecular y los diferentes métodos de fechamiento disponibles actualmente. Se revisaron estudios de fechamiento filogenético para el orden Poales, con interés particular en aquellos que incluyeron representantes de la familia Bromeliaceae. También se realizó una búsqueda exhaustiva sobre el registro fósil asignado a la familia Bromeliaceae, y en la medida de lo posible, se consultaron las fuentes originales. Si disponibles, también se consultaron revisiones de la asignación taxonómica y fechamiento de los fósiles candidatos.

### **Revisión de la asignación taxonómica del polen fósil de Graham (1985)**

Se compararon las descripciones morfológicas y microfotografías de los tipos 1 y 2 del polen fósil de Graham (1985) con las revisiones de la morfología y microfotografías del polen en la familia Bromeliaceae en Erdtman y Praglowski (1974) y Halbritter (1992). Adicionalmente, se consultó la base de datos palinológica PalDat (<https://www.paldat.org/>; \_accedido 15/05/2020).\_ Dicha base de datos concentra el mayor acervo fotográfico y compilación de la descripción morfológica de granos de polen para Bromeliaceae, así como otras familias de plantas vasculares.

Graham (1985) citó la pertenencia de los granos de polen fósiles al Eoceno medio o tardío. De acuerdo con la tabla cronoestratigráfica internacional V2019 desarrollada por la por la Comisión Internacional de Estratigrafía (ICS, por sus siglas

en inglés) el intervalo de edad de dichos pisos es de 47.8-33.9 m.a. (edad intermedia de 41.2 m.a.).

### **Muestreo taxonómico**

El muestreo taxonómico se realizó usando como guía las filogenias publicadas en los trabajos de Barfuss et al.,(2016), Givnish et al., (2011) y Granados-Mendoza et al., (2017). Al interior de Bromeliaceae se muestrearon representantes de las ocho subfamilias actualmente reconocidas. En el caso de la subfamilia Tillandsioideae y el género *Tillandsia* se realizó un muestreo más denso que tuvo por objeto representar los grupos corona de los principales linajes reconocidos en estudios recientes (Barfuss et al., 2016; Granados-Mendoza, et al., 2017). Se incluyeron un total de 58 secuencias correspondientes a 57 especies de la familia Bromeliaceae. Como grupo externo funcional se incluyó a *Typha latifolia* (Typhaceae) que es la familia hermana de Bromeliaceae (APG III et al., 2016;)( Anexo 1).

### **Métodos bioinformáticos**

#### *Selección de marcadores moleculares*

Los marcadores del cloroplasto gen *ycf1* y región *matK-trnK* fueron seleccionados de acuerdo a su utilidad conocida para resolver relaciones filogenéticas en Bromeliaceae (Barfuss et al., 2016; Castello et al., 2016), así como su disponibilidad para los linajes de interés en GenBank. Cuando más de una secuencia estuvo disponible para la misma especie y marcador se seleccionaron aquellas de mejor calidad, por ejemplo, las que presentaron un menor número de bases ambiguas o que estaban más completas. Como se mencionó anteriormente, en Bromeliaceae

se identificó el pseudogen *ycf1*, el cual comparte 1113 pb altamente similares a una porción del extremo 3' del gen *ycf1* funcional. Con la finalidad de descartar la posibilidad de incluir secuencias del pseudogen en nuestros alineamientos del gen *ycf1*, alineamos el gen funcional *ycf1*, el pseudogen *ycf1* de *Tillandsia usneoides* (KY293680.1) y la porción amplificada en estudios previos obtenida de GenBank (Figura 4). Con ello se corroboró que la región amplificada en estudios previos corresponde en gran parte a una porción no compartida con el pseudogen *ycf1* y a una porción altamente disimilar entre el gen funcional y pseudogen en el extremo 3'.

Con el mismo procedimiento se corroboró que las secuencias de GenBank correspondientes al marcador *matK-trnK* incluyen al gen *matK* completo y porciones parciales de los extremos 5' y 3' flanqueantes del intrón del gen *trnK* (Figura 5).

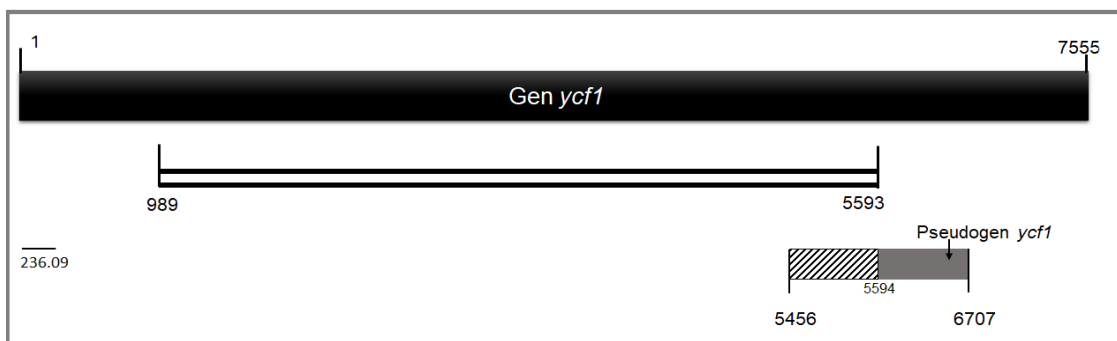


Figura 4. Representación del alineamiento del gen funcional *ycf1* (caja sólida de color negro) y el pseudogen *ycf1* (caja con líneas diagonales y caja gris) de *Tillandsia usneoides* (KY293680.1) con longitudes indicadas en pares de bases (pb). La caja con líneas diagonales indica que las secuencias del gen funcional y el pseudo gen *ycf1* son altamente disimilares, en contraste con el resto del pseudogen representado por la caja gris, cuya secuencia es altamente similar al gen funcional *ycf1*. El segmento utilizado en el presente trabajo (barra inferior blanca) corresponde a porción del gen funcional *ycf1* no compartida con el pseudogen y a la porción altamente disímil entre gen funcional y el pseudogen *ycf1*.

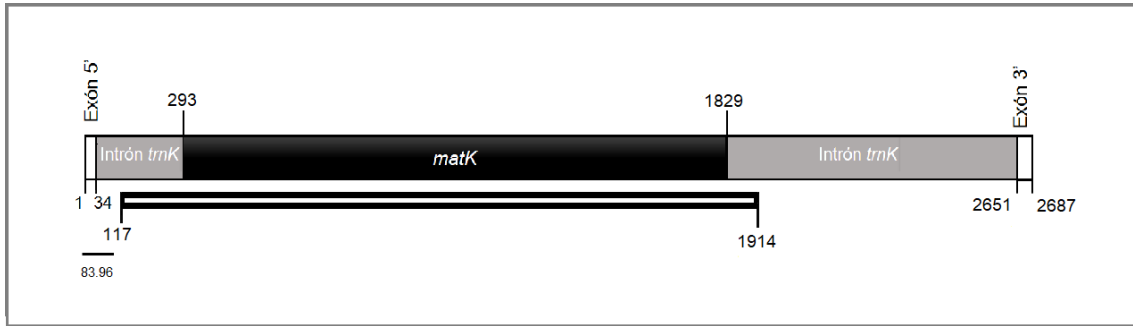


Figura 5. Representación del alineamiento de la región *matK-trnK* completa de *Tillandsia usneoides* (acceso a GenBank KY293680.1) con longitudes indicadas en pares de bases (pb); cajas blancas, negra y grises) y la porción amplificada en estudios previos disponible en GenBank (barra inferior blanca). Las cajas blancas localizadas a los extremos representan los exones del gen *trnK* 5' y 3'. la caja negra en el centro corresponde al gen *matK*, que está flanqueado por los intrones del gen *trnK* denotados con cajas grises.

#### *Alineamiento de secuencias y concatenación de matrices*

Las secuencias de cada marcador fueron inicialmente alineadas con la versión en línea del programa MAFFT (Kato et al., 2017; <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>), usando las opciones por defecto. Los alineamientos resultantes fueron posteriormente revisados y editados manualmente con ayuda del programa PhyDe (Müller et al., 2005). Los alineamientos ya editados de la región *matK-trnK* y el gen *ycf1* fueron concatenados en el programa Geneious v.10 (<https://www.geneious.com>).

El programa PartitionFinder (Lanfear et al., 2012) se utilizó para obtener el mejor esquema de partición de los datos. Para ello se usó la matriz concatenada de los dos marcadores, se estableció el largo de ramas como vinculado, seleccionando todos los modelos evolutivos, los cuales fueron seleccionados con el criterio de información Bayesiano (BIC, por sus siglas en inglés), definiendo cuatro particiones “a priori” que incluyen la porción 5' del intrón del gen *trnK*, el gen *matK*, la porción 3'



del intrón del gen *trnK* y el gen *ycf1*, y seleccionamos *greedy* como el algoritmo de análisis.

### *Análisis filogenético y de fechamiento*

El análisis de fechamiento se realizó en BEAST v.2.6.1 (Bouckaert et al., 2019) con la matriz concatenada usando particiones resultantes de un análisis de PartitionFinder (Lanfear et al., 2012).

El modelo para el esquema de partición propuesto por PartitionFinder fueron estimados independientemente en el caso de los sitios, pero de manera ligada en el caso del reloj molecular y el árbol. En ambas particiones se aplicó el modelo de sustitución molecular GTR para los sitios, con tasas de sustitución nucleotídica estimadas y las frecuencias empíricas. Se aplicó el modelo Gamma con cuatro categorías para la variación entre las tasas de los sitios con la tasa de sustitución y forma de la distribución estimadas y cero como proporción de sitios invariables. Como “priors” del modelo de sustitución nucleotídica se aplicó para la distribución Gamma  $\alpha = 2$  y  $\beta = 0.5$ . Para cada parámetro de la forma Gamma se aplicó una distribución exponencial con media = 1 y “offset” = 0.

Se aplicó un modelo de reloj relajado Log Normal como modelo de heterogeneidad de la tasa molecular entre linajes, estimando la tasa del modelo de reloj.

Los “priors” del modelo de reloj relajado Log Normal consistieron en una media con distribución exponencial, valor de 10.0 y “offset” de 0; y una desviación estándar con distribución Gamma,  $\alpha = 0.5396$  y  $\beta = 0.381$ .

En los “priors” del proceso de generación de árboles, se utilizó el modelo nacimiento-muerte- (Birth-Death Model) ( Kendall, 1948; Thompson, 1975; Rannala & Yang, 1996; Yang & Rannala, 1997; Popovic, 2004; Aldous and Popovic, 2005). En la tasa de “nacimiento” se aplicó una distribución uniforme con un límite inferior de 0, un límite superior de 1.0, y “offset” de 0.0. En el caso de la tasa de “muerte” relativa ( $\mu/l$ ) se aplicó una distribución uniforme con un límite inferior de 0, un límite superior de 1.0, “offset” de 0.0 y valor de inicio de 0.5.

Basado en las relaciones filogenéticas recuperadas por Barfuss et al., (2016, 2005) y Givnish et al., (2011) se forzaron como monofiléticos los grupos correspondientes al clado “core” Tillandsioideae y a los géneros *Racinaea*, *Barfussia* y *Tillandsia*. Se aplicó un esquema de fechamiento con una calibración secundaria para constreñir la edad de la raíz con valores de intervalo de confianza de 90.89 a 123.45 m.a. obtenidos de Ramírez-Barahona et al., (2020) implementados como límites mínimos y máximos de una distribución uniforme. se eligió el trabajo de Ramírez-Barahona et al., (2020) ya que: 1) incluye un muestreo representativo para la familia Bromeliceae, a pesar de no ser su grupo de interés y 2) la asignación taxonómica del material fósil de otros grupos de angiospermas fue corroborada por análisis filogenéticos (evidencia total).

Se realizaron dos corridas independientes de 60 millones de generaciones de cadena Markov Monte Carlo (MCMC, por sus siglas en inglés). Se guardaron muestras de cada una de las corridas cada 4000 pasos. De los 30 mil árboles resultantes de las dos corridas independientes 20% fueron descartados como “burn-

in". La convergencia de los análisis fue evaluada mediante una inspección visual en el programa Tracer v.1.7.1 (Rambaut et al., 2018), además de verificar la presencia de valores de muestra efectivos (ESS por sus siglas en inglés) óptimos (es decir lo suficientemente grandes para disminuir errores de muestreo, en este caso mayores de 200) en cada parámetro especificado.

Los árboles resultados de las dos corridas independientes se combinaron en un solo archivo con ayuda del programa LogCombiner v.2.6.2 volviendo a muestrear estados a menor frecuencia a 60,000 y con un burning de 10%. Con el resultado de esa combinación se generó el árbol de máxima credibilidad en TreeAnnotator V.2.6.0 con alturas del clado medias, las edades estimadas fueron calculadas con un intervalo de confianza de mayor densidad posterior 95% (HPD por sus siglas en inglés). Para la edición de árboles finales se utilizó el programa FigTree v.1.4.4 (Rambaut, 2014).

## RESULTADOS

### Revisión de la descripción y asignación taxonómica del polen fósil

Se detectaron incongruencias entre los términos utilizados por Erdtman y Praglowski (1974), Halbritter (1992) y la base de datos PalDat, respecto a aquellos utilizados en las descripciones de Graham (1985). Dichas incongruencias apuntan a que la orientación de los polos distal y proximal, así como el eje ecuatorial del polen fueron mal interpretadas por Graham (1985).

A continuación, se presenta las descripciones con los términos corregidos (remarcados en negritas) considerando la orientación correcta de los tipos de polen 1 y 2 de Graham (1985). El tipo 1 es un polen **oblado; monosulcado**, con el **sulco** recto, estrecho, margen interno entero, de 45  $\mu\text{m}$  de largo, extendiéndose casi a todo lo largo de la longitud del grano; tectado-perforado, pared delgada (ca. 1.5-2  $\mu\text{m}$ ), finamente reticulado, lumen ligeramente irregular en el contorno, ca. 1-1.5,  $\mu\text{m}$  en su superficie distal, disminuyendo hacia el **sulco** especialmente hacia los **extremos ecuatoriales**, muri de casi 1-1.5  $\mu\text{m}$  de ancho, liso, con margen entero; **25-30  $\mu\text{m}$  (largo) por 50-55  $\mu\text{m}$  (ancho)**. El polen tipo 2 de *Tillandsia* comparte la mayoría de las características del tipo 1, difiriendo únicamente en tener un retículo mucho más grueso y un diámetro del lumen más grande es de 3-4  $\mu\text{m}$  (versus 1.5-2,  $\mu\text{m}$ ).

Aún considerando estos términos corregidos, la descripción de los granos de polen de Graham (1985) carece de caracteres que permitan confirmar o refutar la asignación taxonómica de los mismos a Bromeliaceae, ya que los granos de polen

con unidad de dispersión en monada, heteropolar o isopolar; oblado; monosulcado y reticulados son comunes a representantes de diferentes órdenes de monocotiledóneas (Alismatales, Asparagales, Commelinales, Liliales, Pandanales y Poales; PalDat (<https://www.paldat.org/>; accedido 08/08/2020). Adicionalmente consultamos la opinión de una palinóloga Halbritter Heidemarie.

### **Evaluación de la estrategia de fechamiento más adecuada**

En consecuencia a la ausencia de material fósil certeramente atribuible a la familia, se considera que la alternativa de fechamiento más confiable es la calibración secundaria, utilizando las edades estimadas de un estudio que incluya material fósil analizado meticulosamente, es decir, un estudio con filogenias previamente calibradas con elementos fósiles certeros para aminorar el efecto del error asociado que pudiera generar edades mucho más antiguas.

### **Edades troncales y corona de Bromeliaceae, Tillandsioideae y *Tillandsia***

La matriz concatenada tuvo una longitud de 6,405 pb, de las cuales 1,804 corresponde a la región *matK-trnK* y 4,601 el gen *ycf1*. PartitionFinder (Lanfear et al., 2012) identificó dos particiones, la primera integrada por el gen *matK* y la segunda por ambos fragmentos del intrón *trnK* y el gen *ycf1*.

Las edades medias estimadas para Bromeliaceae fueron 102.94 m.a. (troncal; intervalo de 120.92-91.25 m.a.) y 63.23 m.a. (corona; intervalo de 96.7-32.43 m.a.); para Tillandsioideae 43.19 m.a. (troncal; intervalo de 71.44-22.59 m.a.) y 37.77 m.a.

(corona; intervalo de 59.94-19.31 m.a.); y para *Tillandsia* 19.65 m.a. (troncal; intervalo de 31.2-9.84 m.a.) y 18.99 m.a. (corona; 29.88-9.25 m.a.) (Figura 6).

### **Comparaciones con estimados de fechamiento previos**

Nuestro estimado de la edad troncal de Bromeliaceae se encuentra dentro del rango obtenido en estudios previos y cuyo valor de media es más cercano a las edades troncales obtenidas por Bouchenak-Khelladi et al., (2014), Givnish et al., (2011), Ramírez-Barahona et al., (2020) y Sulman et al., (2013) (Figura 7).

En el caso de la edad corona de Bromeliaceae estimada en el presente estudio se encuentra entre el rango general obtenido en estudios previos, sin embargo, se encuentra fuera del rango más común estimado por la mayoría de los estudios previos que oscila entre 26.22 a 19.1 m.a., siendo nuestro estimado más cercano al propuesto por Janssen y Bremmer et al., (2004), que representa un estimado atípico (Figura 8).

Las edades troncales y corona obtenidas para Tillandsioidae se contrastaron con los dos únicos dos trabajos que las han inferido, i.e. Givnish et al., (2011) y Ramírez-Barahona et al., (2020) (Figuras 9 y 10). En el caso de la edad troncal los estimados previos no sobrepasan los 20 m.a., mientras que nuestro estimado resultó en 43.17 m.a. (Figura 9) Para las edades corona las diferencias son mucho más notorias nuestro estimado resultó mucho más antiguo de 37.77 m.a. y los estudios previos no sobrepasan los 15 m.a. (Figura 10).

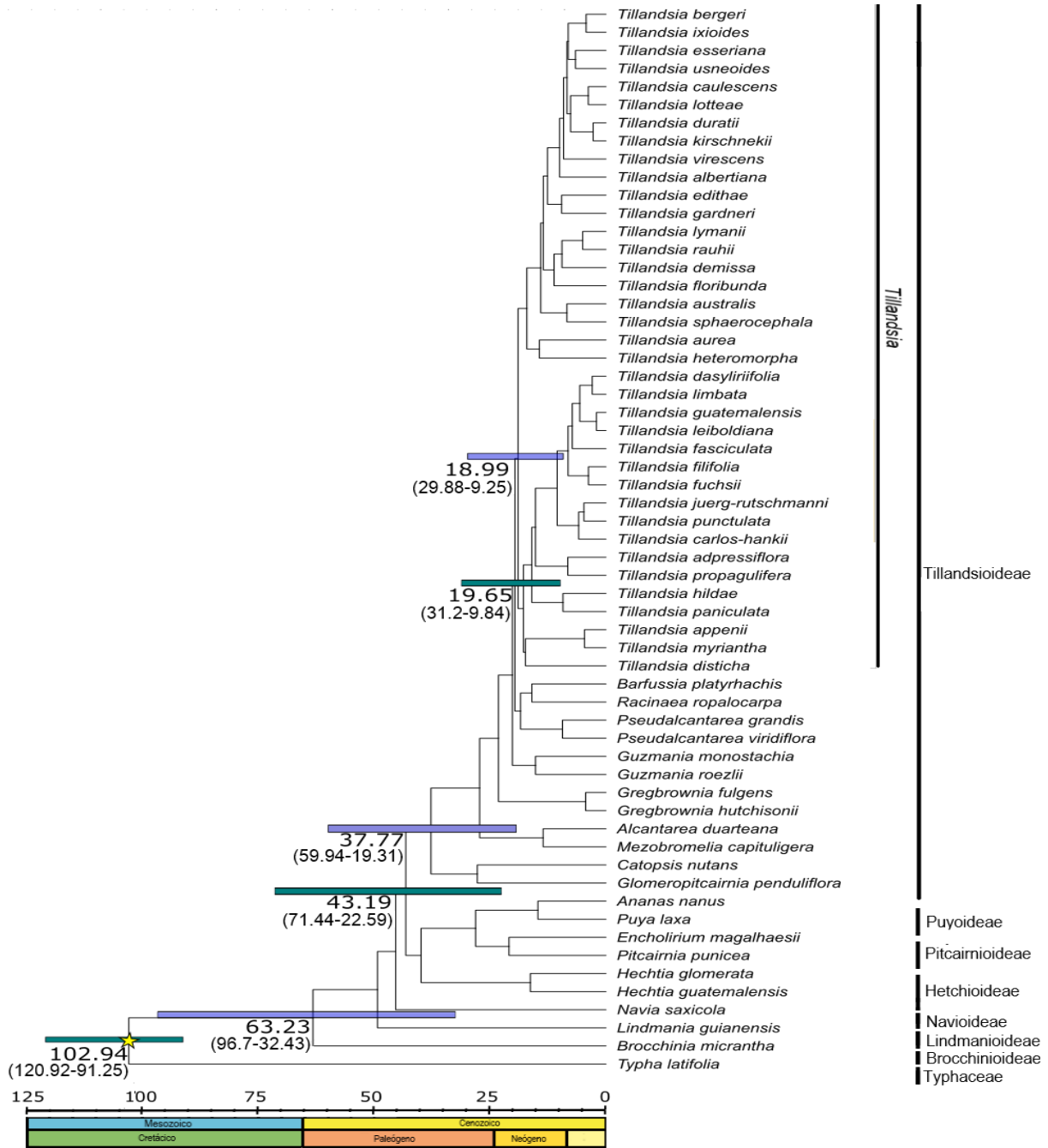


Figura 6. Árbol calibrado de Bromeliaceae estimado utilizando el modelo de nacimiento-muerte implementado en BEAST. Los números en los nodos indican la edad media y entre parentesis se señalan los intervalos de confianza como 95% (HPD) para las edades troncales (barras verde) y corona (barras lila) de Bromeliaceae, Tillandsioideae y *Tillandsia*. La estrella amarilla señala el nodo calibrado con las edades obtenidas del estudio de Ramírez-Barahona et al., (2020) con intervalo de 98.89 a 123.45 m.a. y media de 110 m.a. en el nodo troncal de Bromeliaceae.

## Edades troncal de Bromeliaceae

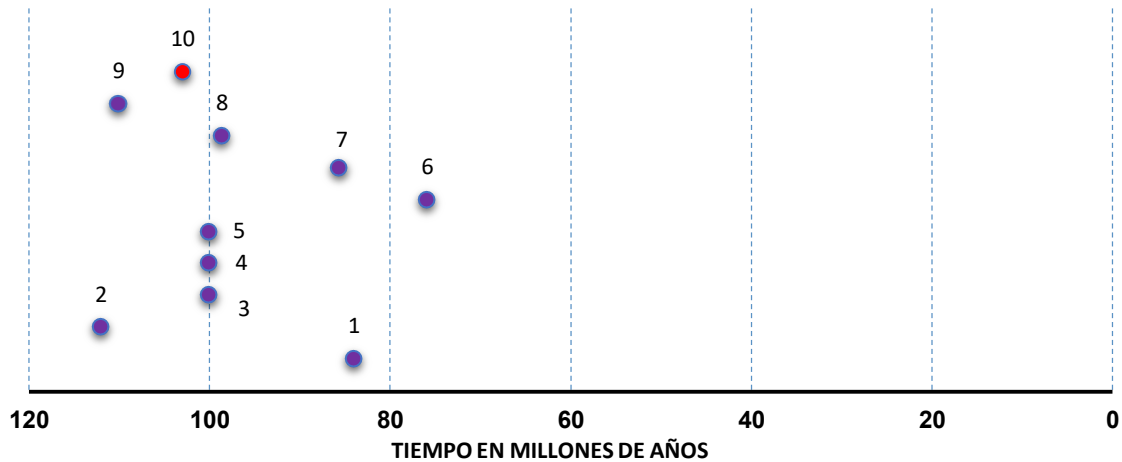


Figura 7. Comparación de las medias de edades troncales para Bromeliaceae de estudios anteriores y este trabajo. Con un punto púrpura se denotan las edades estimadas, los números a un costado de ellos indican el estudio correspondiente como sigue: 1) Givnish et al., 2004; 2) Janssen y Bremer et al., 2004; 3) Givnish et al., 2011; 4) Sulman et al., 2013; 5) Bouchenak-Khelladi, et al., (2014); 6) Magallón et al., 2015; 7); Tank et al., 2015; 8) Zhou et al., 2018.; y 9) Ramírez-Barahona et al., 2020. El punto rojo denotado además con el número 10 indica la edad troncal estimada en el presente estudio.

## Edades Corona para Bromeliaceae

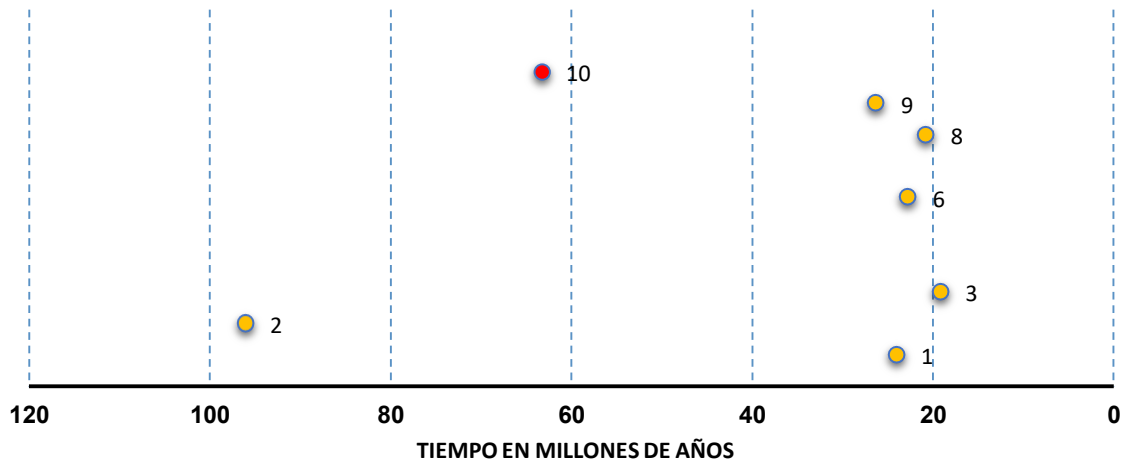


Figura 8. Comparación de las medias de edades corona para Bromeliaceae de estudios previos con este trabajo. Con un punto amarillo se indican las edades estimadas, los números a un costado de ellos indican el estudio correspondiente como sigue: 1) Givnish et al., 2004; 2) Janssen y Bremer et al., 2004; 3) Givnish et al., 2011; 4) Sulman et al., 2013; 5) Bouchenak-Khelladi, et al., (2014); 6) Magallón et al., 2015; 7); Tank et al., 2015; 8) Zhou et al., 2018.; y 9) Ramírez-Barahona et al., 2020. El punto rojo de notado además con el número 10 indica la edad troncal estimada en el presente estudi.



### Edades troncal de Tillandsioideae

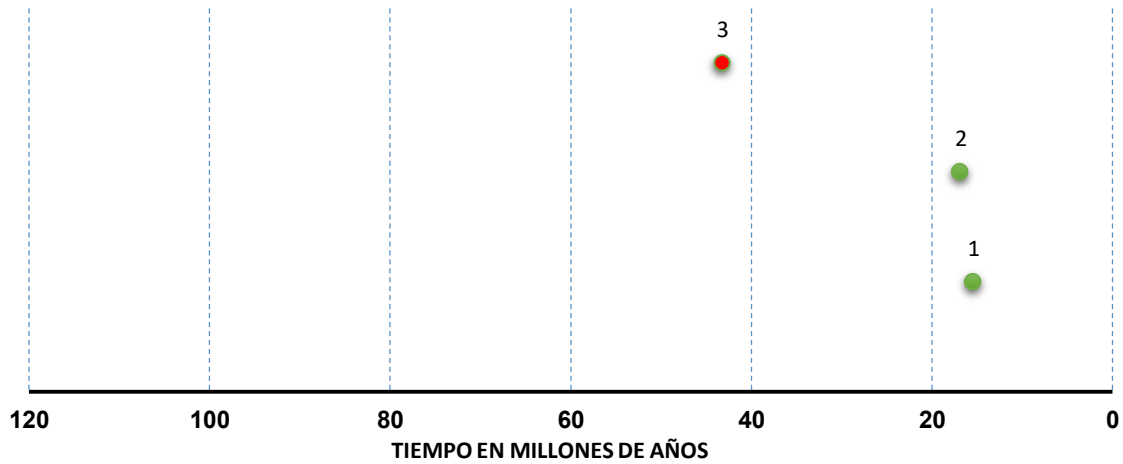


Figura 9. Se comparan las edades troncales de la subfamilia Tillandsioideae. Los puntos verdes indican los estudios y los números a un costado de los puntos indican el trabajo al que pertenecen como siguen: 1) Givnish et al., (2011); 2) Ramírez-Barahona et al., (2020). El punto rojo indica la edad estimada en el presente trabajo.

### Edades corona de Tillandsioideae

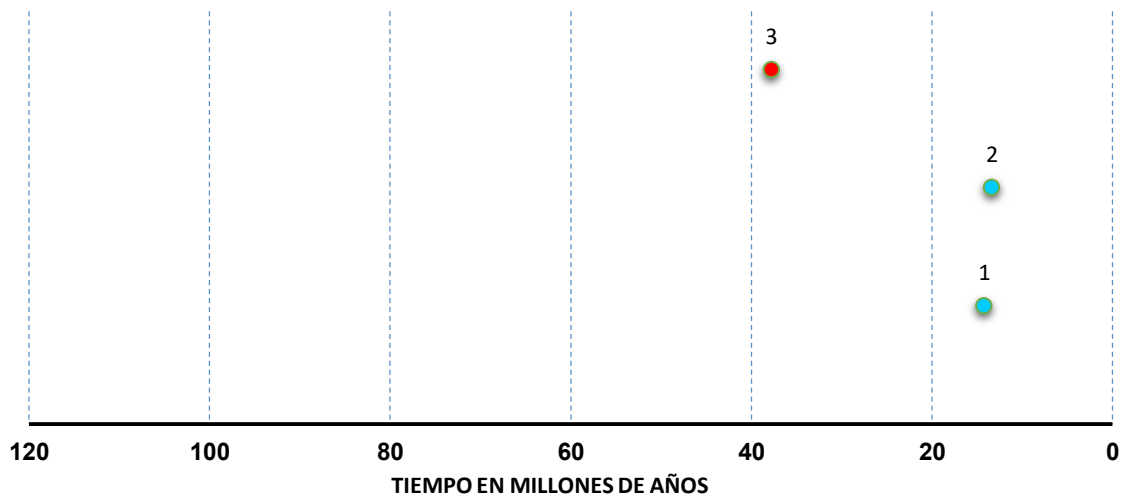


Figura 10. Se comparan las edades corona de la subfamilia Tillandsioideae. Los puntos azules indican los estudios y los números a un costado de los puntos indican el trabajo al que pertenecen como siguen: 1) Givnish et al., (2011); 2) Ramírez-Barahona et al., (2020). El punto rojo indica la edad estimada en el presente trabajo.

## DISCUSIÓN

El presente trabajo plantea la revisión de la asignación taxonómica de los granos de polen fósil descritos por Graham (1985). Así mismo, es el primer estudio de fechamiento que utiliza el gen del cloroplasto *ycf1*, un gen que ha demostrado alta informatividad filogenética en otros grupos de plantas con flores por presentar tasa evolutivas inclusive más altas que varios marcadores nucleares (Granados-Mendoza et al., 2020). Este marcador junto con la región *matK-trnK*, combinan fuentes de información con diferentes tasas evolutivas las cuales pueden ser informativas a diferentes niveles taxonómicos. El presente estudio además se destaca en que incorpora el mayor muestreo hasta la fecha para la subfamilia Tillandsioideae que haya sido incluido en un análisis de fechamiento. Al incluir un muestreo más denso al interior del género *Tillandsia* que estudios previos, es el primero en proponer edades toncal y corona para este linaje.

### **Descripción y revisión de la asignación taxonómica del polen fósil de Graham (1985)**

Los análisis morfológicos de granos de polen para la familia son escasos, y aunque de manera general se enfocan en el tipo de apertura, no existe consistencia en relación a los tipos de polen propuestos. Por ejemplo, Erdtman y Praglowski en (1974) realizan la agrupación más general, en el grupo A incluyen miembros que poseen tanto sulcos, como poros y en el grupo B agrupan todos aquellos que poseen más de un poro. Mientras que Silva et al., (2016) son más meticulosos en su clasificación y distinguen tres categorías de 3 o 4 poros (Tipo I), 2-porado (Tipo

II);1-colpado (Tipo III), pero su muestreo es tan escaso que no permite el reconocimiento de granos de polen con un solo poro, ni los tipos de sulcos identificados por Halbritter (1992). A pesar de su antigüedad el trabajo de Halbritter (1992) sigue siendo el más completo.

La descripción de los granos de polen propuesta por Graham (1985), fue incorrecta debido a la interpretación errónea de la orientación del mismo, que puede corroborarse si se conoce la posición del grano de polen en la tétrada. Fue necesario modificar o actualizar la terminología para poder usar términos comparables en otros grupos de plantas con flores y evaluar su asignación taxonómica.

Tanto la descripción de los granos de polen fósil de Graham (1985), como las fotos de los mismos presentan pocos detalles sobre el sulco, el cual podría contener información adicional que permitiría confirmar o descartar la asignación de dicho material a la familia Bromeliaceae. Las características del sulco son particularmente importantes ya que en ellas se basan los análisis morfológicos que identifican de manera general los grupos dentro de la familia Bromeliaceae. Las características no pudieron visualizarse a mayor detalle ya que en el año en que se publicó este hallazgo el uso del microscopio electrónico de barrido era muy limitado. Dadas las escasas particularidades observables los granos de polen descritos por Graham (1985) no es posible atribuirlo inequívocamente a la familia Bromeliaceae ya que sus características son comunes a representantes de diferentes órdenes de monocotiledóneas (Alismatales, Asparagales, Commelinales, Liliales, Pandanales y

Poales), además de estar presente en gimnospermas (Cycadales). Su uso como punto de calibración podría representar una estimación errónea para la familia Bromeliaceae.

Halbritter (comunicación personal, 2020) considera que la evidencia fotográfica y la versión corregida de la descripción proporcionada por Graham (1985) no resultan suficientes para confirmar su pertenencia a la familia Bromeliaceae. Además, mencionó que las paredes de los granos de polen de Bromeliaceae son delgadas en comparación con otros grupos, lo que disminuye la probabilidad de que pudieran fosilizarse.

### **Evaluación de la estrategia de fechamiento más adecuada**

Dado que no se puede confirmar o rechazar la asignación taxonómica del grano de polen y no existen otros registros fósiles para la familia, se optó por no utilizarlo en el análisis de fechamiento. Como alternativa decidimos utilizar un fechamiento secundario basado en un estudio en el cual las calibraciones estuvieran basadas en fósiles cuya posición taxonómica haya sido corroborada con análisis filogenéticos. Tal es el caso del estudio de Ramírez-Barahona et al., (2020) del cual se obtuvo la edad para fijar el nodo raíz de nuestro árbol filogenético. Implementando esta edad con un intervalo de confianza y distribución uniforme, lo cual ha sido propuesto disminuye la incertidumbre a consecuencia de incluir exclusivamente calibraciones secundarias (Schenk, 2016).

## **Edades troncales y corona de Bromeliaceae, Tillandsioideae y *Tillandsia***

Nuestros estimados de la edad troncal (102.94 m.a.) y corona (63.23) de Bromeliaceae están en concordancia con la interpretación de Givnish et al., (2011) que después de su origen en el Escudo Guayanés la familia Bromeliaceae se mantuvo en dicha región por varios millones de años, como resultado de un aislamiento geográfico provocado por cuerpos de agua cambiantes que circundaron el Escudo Guayanés durante el Paleo-orinoco (Hoorn, 1994; Hoorn et al., 1995; Potter, 1997). Conforme dicho aislamiento disminuyó, los linajes pudieron migrar de el sitio de origen y comenzar a diversificarse. Es de resaltarse que el periodo transcurrido entre el tiempo de origen y diversificación estimados en el presente trabajo disminuyen conforme menor es el nivel taxonómico, siendo considerablemente más corto entre la edad troncal y corona de *Tillandsia*. La rápida diversificación al interior de Tillandsioideae y *Tillandsia* pudo ser promovida por el gradual surgimiento y conexión de los segmentos norte y sur del sistema montañoso de los Andes que comenzó hace aproximadamente 66 millones de años a finales del Cretácico (Potter, 1997).

Los intervalos de confianza obtenidos fueron muy variables. En el caso nodo troncal de Bromeliaceae, donde se añadió el punto de calibración, resultó pequeño con una diferencia entre el límite máximo y mínimo (amplitud) de 29.67 m.a. Para el nodo corona de Bromeliaceae se encontró una amplitud de 64.27 m.a., su límite mínimo (32.43 m.a.) estaría más aproximado a los estimados arrojados por la mayoría de los estudios previos. Es posible que añadiendo algún otro tipo de restricción o

utilizando una distribución de probabilidad distinta, las edades arrojadas sean distintas.

Para el nodo troncal de Tillandsioideae la amplitud fue de 48.85 m.a., mientras que su nodo corona tuvo una amplitud de 40.63 m.a. En el caso del nodo troncal y corona de *Tillandsia* las amplitudes son muy similares entre sí (21.36 y 20.63 m.a., respectivamente) y las fechas medias estimadas son muy próximas, indicando que la diversificación del género ocurrió rápidamente después de su origen.

Los estimados de edades obtenidas en el presente estudio podrían verse modificadas si se incluyeran más especies representado otras subfamilias de Bromeliaceae e incluso otros grupos externos pertenecientes a otras familias de monocotiledóneas, así como si se añadiera más de un solo punto de calibración.

### **Comparaciones con estimados de fechamiento previos**

Las edades estimadas este trabajo para el nodo troncal de Bromeliaceae, difieren ampliamente de aquellos trabajos que incluyeron en su muestreo pocos miembros de la familia, mientras que se encuentran más cercanos a estudios con muestreos amplio para la familia como los trabajos de Bouchenak-Khelladi, et al., (2014); Givnish et al. (2011); Sulman et al., (2013); Zhou et al., (2018) (Tabla 2). En el caso de la edad corona de Bromeliaceae, encontramos una edad mucho más antigua que los trabajos previos donde la mayoría de los datos se agrupan en un rango de 32.4 a 19.1 m.a., mientras que para este trabajo obtuvimos una edad media de 63.23 m.a. y un dato que resulta considerablemente más antiguo que es el de Janseen y Bremer et al., (2004) quienes estimaron una edad de 96 m.a. Estas

diferencias pueden deberse a las distintas densidades de muestreo taxonómico al interior de Bromeliaceae, así como a las distintas regiones moleculares empleadas en los diferentes estudios.

Nuestros estimados de las edades troncales y corona de Tillandsioideae resultaron mucho más antiguos en relación a estudios previos, incluso de el estudio del cual basamos nuestra calibración secundaria Ramírez-Barahona et al.,(2020) apoyando nuestra hipótesis de que tanto el muestreo taxonómico como la selección de las regiones moleculares empleadas tienen un efecto amplio en los resultados. Adicionalmente, las diferencias pueden deberse a que en nuestro trabajo añadimos exclusivamente un nodo de calibración a que el muestreo estuvo enfocado hacia el género *Tillandsia*.

## **CONSIDERACIONES FINALES**

Estudios futuros podrían enfocarse en revisar directamente material fósil colectado por Graham (1985), que podría ser más informativo que únicamente revisar las microfotografías publicadas por el autor y permitir una conclusión más certera de su afinidad taxonómica. Futuros estudios de fechamiento en Bromeliaceae podrían ampliar el muestreo al tanto interior de la familia, como fuera de ella con representantes de otras familias de Poales y/o de otros órdenes de monocotiledóneas a fin de permitir la inclusión de calibraciones fósiles en nodos más profundos. En el mismo sentido, estudios futuros podrían explorar utilizar más marcadores moleculares provenientes de otras genomas (p.ej. nuclear o

mitocondrial) para evaluar el efecto de incluir regiones con diferentes tasas evolutiva, así como incorporar diferentes esquemas y métodos de fechamiento.



## LITERATURA CITADA

- Aldous, D., Popovic, L., 2005. A critical branching process model for biodiversity. *Adv. Appl. Probab.* 37, 1094–1115. <https://doi.org/10.1239/aap/1134587755>.
- APG III, Chase, M.W., Christenhusz, M.J.M., Fay, M.F., Byng, J.W., Judd, W.S., Soltis, D.E., Mabberley, D.J., Sennikov, A.N., Soltis, P.S., Stevens, P.F., 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot. J. Linn. Soc.* 181, 1–20. <https://doi.org/10.1111/boj.12385>.
- Arévalo, R., 2015. Three New Species of *Mormolyca* (Orchidaceae: Maxillariinae) with an Updated Molecular Phylogenetic Analysis. *Syst. Bot.* v. 40, 692–705. <https://doi.org/10.1600/036364415X689159>.
- Baresch, A., Smith, J.A.C., Winter, K., Lucia Valerio, A., Jaramillo, C., 2011. *Karatophyllum bromelioides* LD Gomez revisited: a probable fossil CAM bromeliad. *Am. J. Bot.* 98, 1905–1908. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100261>.
- Barfuss, M.H.J., Samuel, R., Till, W., Stuessy, T.F., 2005. Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequence data from seven plastid regions. *Am. J. Bot.* 92, 337–351. <https://doi.org/10.3732/ajb.92.2.337>.
- Barfuss, M.H.J., Till, W., Leme, E.M.C., Pinzon, J.P., Manzanares, J.M., Halbritter, H., Samuel, R., Brown, G.K., 2016. Taxonomic revision of Bromeliaceae subfam. Tillandsioideae based on a multi-locus DNA sequence phylogeny and morphology. *Phytotaxa* 279, 97.
- Benzing, D., 2000. Bromeliaceae: Profile of An Adaptive Radiation. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511565175>.
- Bouchenak-Khelladi, Y., Muasya, A.M., Linder, H.P., 2014. A revised evolutionary history of Poales: origins and diversification. *Bot. J. Linn. Soc.* 175, 4–16. <https://doi.org/10.1111/boj.12160>.
- Bouckaert, R., Vaughan, T.G., Barido-Sottani, J., Duchêne, S., Fourment, M., Gavryushkina, A., Heled, J., Jones, G., Kühnert, D., De Maio, N., Matschiner, M., Mendes, F.K., Müller, N.F., Ogilvie, H.A., du Plessis, L., Poppinga, A., Rambaut, A., Rasmussen, D., Siveroni, I., Suchard, M.A., Wu, C.-H., Xie, D., Zhang, C., Stadler, T., Drummond, A.J., 2019. BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLOS Comput. Biol.* 15, e1006650. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006650>.

- Bromham, L., Duchêne, S., Hua, X., Ritchie, A.M., Duchêne, D.A., Ho, S.Y.W., 2018. Bayesian molecular dating: opening up the black box. *Biol. Rev.* 93, 1165–1191. <https://doi.org/10.1111/brv.12390>.
- Bromham, L., Penny, D., 2003. The Modern Molecular Clock. <https://doi.org/10.1038/nrg1020>.
- Castello, L.V., Barfuss, M.H.J., Till, W., Galetto, L., Chiapella, J.O., 2016. Disentangling the *Tillandsia capillaris* complex: phylogenetic relationships and taxon boundaries in Andean populations. *Bot. J. Linn. Soc.* 181, 391–414. <https://doi.org/10.1111/boj.12400>.
- Chase, M.W., Williams, N.H., de Faria, A.D., Neubig, K.M., Amaral, M. do C.E., Whitten, W.M., 2009. Floral convergence in Oncidiinae (Cymbidieae; Orchidaceae): an expanded concept of *Gomesa* and a new genus *Nohawilliamsia*. *Ann. Bot.* 104, 387–402. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp067>.
- Crayn, D., G. Terry, R., Smith, J.A.C., Winter, K., 2000. Molecular systematic investigations in Pitcairnioideae (Bromeliaceae) as a basis for understanding the evolution of crassulacean acid metabolism (CAM). pp. 569–579.
- de Vries, J., Sousa, F.L., Bölter, B., Soll, J., Gould, S.B., 2015. YCF1: A Green TIC? *Plant Cell* 27, 1827. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.135541>
- Drew, B., Sytsma, K., 2011. Testing the Monophyly and Placement of *Lepechinia* in the Tribe Mentheae (Lamiaceae). *Syst. Bot.* 36, 1038–1049. <https://doi.org/10.1600/036364411X605047>.
- Drew, B., Sytsma, K.J., 2013. The South American radiation of *Lepechinia* (Lamiaceae): phylogenetics, divergence times and evolution of dioecy. *Bot. J. Linn. Soc.* 171, 171–190.
- Drew, B.T., Sytsma, K.J., 2012. Phylogenetics, biogeography, and staminal evolution in the tribe Mentheae (Lamiaceae). *Am. J. Bot.* 99, 933–953. <https://doi.org/10.3732/ajb.1100549>.
- Erdtman, G., Praglowski, J., 1974. A note on pollen morphology, in: In: *Flora Neotropica. Hionogr. No. 14.* (Ed. L. B. Smith R: R.J. Downs). Hafner Press, New York., pp. 28–33.
- Fourment, M., Darling, A.E., 2018. Local and relaxed clocks: the best of both worlds. *PeerJ* 6, e5140–e5140. <https://doi.org/10.7717/peerj.5140>.
- Gernandt, D.S., Hernández-León, S., Salgado-Hernández, E., de la Rosa, J.A.P., 2009. Phylogenetic Relationships of *Pinus* Subsection *Ponderosae* Inferred from Rapidly Evolving cpDNA Regions. *Syst. Bot.* 34, 481–491.

- Givnish, T.J., Barfuss, M.H.J., Ee, B.V., Riina, R., Schulte, K., Horres, R., Gonsiska, P.A., Jabaily, R.S., Crayn, D.M., Smith, J.A.C., Winter, K., Brown, G.K., Evans, T.M., Holst, B.K., Luther, H., Till, W., Zizka, G., Berry, P.E., Sytsma, K.J., 2014. Adaptive radiation, correlated and contingent evolution, and net species diversification in Bromeliaceae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 71, 55–78. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.10.010>.
- Givnish, T.J., Barfuss, M.H.J., Ee, B.V., Riina, R., Schulte, K., Horres, R., Gonsiska, P.A., Jabaily, R.S., Crayn, D.M., Smith, J.A.C., Winter, K., Brown, G.K., Evans, T.M., Holst, B.K., Luther, H., Till, W., Zizka, G., Berry, P.E., Sytsma, K.J., 2011. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography in Bromeliaceae: Insights from an eight-locus plastid phylogeny. *Am. J. Bot.* 98, 872–895. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000059>.
- Givnish, T.J., Millam, K.C., Berry, P.E., Sytsma, K.J., 2007. Phylogeny, adaptive radiation, and historical biogeography of Bromeliaceae inferred from ndhF sequence data. *Aliso* 23, 3–26.
- Givnish, T.J., Millam, K.C., Evans, T.M., Hall, J.C., Pires, J.C., Berry, P.E., Sytsma, K.J., 2004. Ancient vicariance or recent long-distance dispersal? Inferences about phylogeny and South American-African disjunctions in rapateaceae and bromeliaceae based on ndhF sequence data. *Int. J. Plant Sci.* 165, S35–S54. <https://doi.org/10.1086/421067>
- Graham, A., 1985. Studies in Neotropical Paleobotany. IV. The Eocene Communities of Panama. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 72, 504–534. <https://doi.org/10.2307/2399101>
- Granados Mendoza, C., Granados-Aguilar, X., Donadío, S., Salazar, G.A., Flores-Cruz, M., Hágsater, E., Starr, J.R., Ibarra-Manríquez, G., Fragoso-Martínez, I., Magallón, S., 2017. Geographic structure in two highly diverse lineages of *Tillandsia* (Bromeliaceae). *Botany* 95, 641–651. <https://doi.org/10.1139/cjb-2016-0250>
- Granados Mendoza, C., Jost, M., Hágsater, E., Magallón, S., van den Berg, C., Lemmon, E.M., Lemmon, A.R., Salazar, G.A., Wanke, S., 2020. Target Nuclear and Off-Target Plastid Hybrid Enrichment Data Inform a Range of Evolutionary Depths in the Orchid Genus *Epidendrum*. *Front. Plant Sci.* 10, 1761. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01761>
- Halbritter, H., 1992. Morphologie und systematische Bedeutung des Pollens der Bromeliaceae. *Grana* 31, 197–212. <http://dx.doi.org/10.1080/00173139209432032>
- Halbritter, H., Silvia, U., Grímsson, F., Weber, M., Zetter, R., Hesse, M., Buchner, R., Svojtka, M., Frosch-Radivo, A., 2018. Pollen Morphology and Ultrastructure. pp. 37–65. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-71365-6\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-319-71365-6_3)

- Hilu, K.W., Borsch, T., Müller, K., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Savolainen, V., Chase, M.W., Powell, M.P., Alice, L.A., Evans, R., Sauquet, H., Neinhuis, C., Slotta, T.A.B., Rohwer, J.G., Campbell, C.S., Chatrou, L.W., 2003. Angiosperm phylogeny based on matK sequence information. *Am. J. Bot.* 90, 1758–1776. <https://doi.org/10.3732/ajb.90.12.1758>
- Ho, S.Y.W., Duchêne, S., 2014. Molecular-clock methods for estimating evolutionary rates and timescales. *Mol. Ecol.* 23, 5947–5965. <https://doi.org/10.1111/mec.12953>
- Ho, Y.W., 2015. Molecular Clocks, in: *Encyclopedia of Scientific Dating Methods*. p. 978.
- Hoorn, C., 1994. An environmental reconstruction of the palaeo-Amazon River system (Middle–Late Miocene, NW Amazonia). *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 112, 187–238. [https://doi.org/10.1016/0031-0182\(94\)90074-4](https://doi.org/10.1016/0031-0182(94)90074-4)
- Hoorn, C., Guerrero, J., Sarmiento - Pérez, G., Lorente, M., 1995. Hoorn C, Guerrero J, Sarmiento GA, Lorente MA. Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene northern South America. *Geology* 23: 237-240. *Geology* 23, 237–240. [https://doi.org/10.1130/0091-7613\(1995\)023<0237:ATAACF>2.3.CO;2](https://doi.org/10.1130/0091-7613(1995)023<0237:ATAACF>2.3.CO;2)
- Iles, W.J.D., Smith, S.Y., Gandolfo, M.A., Graham, S.W., 2015. Monocot fossils suitable for molecular dating analyses. *Bot. J. Linn. Soc.* 178, 346–374. <https://doi.org/10.1111/boj.12233>
- Isaza, C., 2009. Relationships between biomass and morphological characters of phytotelmata bromeliads in a Colombian upper Andean forest.
- Janssen, T., Bremer, K., 2004. The age of major monocot groups inferred from 800+ rbcL sequences. *Bot. J. Linn. Soc.* 146, 385–398. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2004.00345.x>
- Katoh, K., Rozewicki, J., Yamada, K.D., 2017. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief. Bioinform.* 20, 1160–1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- Kendall, D.G., 1948. On the Generalized “Birth-and-Death” Process. *Ann. Math. Stat.* 19, 1–15.
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S.Y.W., Guindon, S., 2012. PartitionFinder: Combined Selection of Partitioning Schemes and Substitution Models for Phylogenetic Analyses. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1695–1701. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss020>

- Lee, M.S.Y., Ho, S.Y.W., 2016. Molecular clocks. *Curr. Biol.* 26, R399–R402. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.03.071>
- Liria, J., 2007. Fauna Fitotelmata en las bromelias *Aechmea fendleri* André y *hohenbergia stellata* Schult del Parque Nacional San Esteban, Venezuela. *Rev. peru. biol.* 14, 33–38.
- Luis D. Gómez P., 1972. *Karatophyllum bromelioides* L.D. Gómez (Bromeliaceae), nov. gen. et sp., del Terciario Medio de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical* 20, 221–229.
- Magallón, S., 2014. A Review of the Effect of Relaxed Clock Method, Long Branches, Genes, and Calibrations in the Estimation of Angiosperm Age. *Bot. Sci.* 92, 1. <https://doi.org/10.17129/botsci.37>
- Magallón, S., Gómez-Acevedo, S., Sánchez-Reyes, L.L., Hernández-Hernández, T., 2015. A metacalibrated time-tree documents the early rise of flowering plant phylogenetic diversity. *New Phytol.* 207, 437–453. <https://doi.org/10.1111/nph.13264>
- McVaugh, R., 1989. Bromeliaceae to Dioscoreaceae, in: *Flora Novo-Galiciana. Bromeliaceae to Dioscoreaceae*. The University of Michigan Herbarium, pp. 2–84.
- Müller, K., Quandt, D., Neinhuis, ., 2005. PhyDE®-Phylogenetic data editor.
- Neubig, K.M., Whitten, W.M., Carlswald, B.S., Blanco, M.A., Endara, L., Williams, N.H., Moore, M., 2009. Phylogenetic utility of *ycf1* in orchids: a plastid gene more variable than *matK*. *Plant Syst. Evol. Entwicklungsgeschichte Syst. Pflanz.* 277, 75–84. <https://doi.org/10.1007/s00606-008-0105-0>
- Neubig, K.M., Whitten, W.M., Williams, N.H., Blanco, M.A., Endara, L., Burleigh, J.G., Silvera, K., Cushman, J.C., Chase, M.W., 2012. Generic recircumscriptions of *Oncidiinae* (Orchidaceae: Cymbidieae) based on maximum likelihood analysis of combined DNA datasets. *Bot. J. Linn. Soc.* 168, 117–146. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2011.01194.x>
- Poczai, P., Hyvönen, J., 2017. The complete chloroplast genome sequence of the CAM epiphyte Spanish moss (*Tillandsia usneoides*, Bromeliaceae) and its comparative analysis. *PLOS ONE* 12, e0187199. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187199>
- Popovic, L., 2004. Asymptotic genealogy of a critical branching process. *Ann. Appl. Probab.* 14, 2120–2148.

- Potter, P.E., 1997. The Mesozoic and Cenozoic paleodrainage of South America: a natural history. *J. South Am. Earth Sci.* 10, 331–344. [https://doi.org/10.1016/S0895-9811\(97\)00031-X](https://doi.org/10.1016/S0895-9811(97)00031-X)
- Rambaut, A., 2014. FigTree, version 1.4.4. Acceso Julio, 2019. Disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Rambaut, A., Drummond, A.J., Xie, D., Baele, G., Suchard, M.A., 2018. Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Syst. Biol.* 67, 901–904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>
- Ramírez-Barahona, S., Sauquet, H., Magallón, S., 2020. The delayed and geographically heterogeneous diversification of flowering plant families. *Nat. Ecol. Evol.* <https://doi.org/10.1038/s41559-020-1241-3>
- Rannala, B., Yang, Z., 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: A new method of phylogenetic inference. *J. Mol. Evol.* 43, 304–311. <https://doi.org/10.1007/BF02338839>
- Renner, S.S., 2005. Relaxed molecular clocks for dating historical plant dispersal events. *Trends Plant Sci.* 10, 550–558. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.09.010>
- Schenk, J.J., 2016. Consequences of Secondary Calibrations on Divergence Time Estimates. *PLOS ONE* 11, e0148228. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148228>
- Schmalhausen, I.F., 1883. Beiträge zur Tertiärflora Süd-West-Russlands. *Palaeontologische Abhandlungen* 1, 283, 336.
- Schütz, N., Krapp, F., Wagner, N., Weising, K., 2016. Phylogenetics of Pitcairnioideae s.s. (Bromeliaceae): evidence from nuclear and plastid DNA sequence data. *Bot. J. Linn. Soc.* 181, 323–342. <https://doi.org/10.1111/boj.12403>
- Shi, S., Li, J., Sun, J., Yu, J., Zhou, S., 2013. Phylogeny and Classification of *Prunus sensu lato* (Rosaceae). *J. Integr. Plant Biol.* 55, 1069–1079. <https://doi.org/10.1111/jipb.12095>
- Silva, V.J.D., Ribeiro, E.M., Luizi-Ponzo, A.P., Faria, A.P.G., 2016. Ultrastructure and pollen morphology of Bromeliaceae species from the Atlantic Rainforest in Southeastern Brazil. *An. Acad. Bras. Ci. textordfemeninencias* 88, 439–449.
- Smith, L.B., Downs, R.J., 1977. *Flora Neotropica Tillandsioideae (Bromeliaceae)*, Clark T. Rogerson. ed. Organization for Flora Neotropica, New York.

- Smith, L.B., Till, W., 1998. Bromeliaceae, in: *The Families and Genera of Vascular Plants, Alismatanae and Commelinanae (except Gramineae)*. Springer Verlag, Germany.
- Soltis, D., Smith, S., Cellinese, N., Wurdack, K., Tank, D., Brockington, S., Refulio - Rodriguez, N., Walker, J., Moore, M., Carlsward, B., Bell, C., Latvis, M., Crawley, S., Black, C., Diouf, D., Xi, Z., Rushworth, C., Gitzendanner, M., Sytsma, K., Soltis, P., 2011. Angiosperm Phylogeny: 17 Genes, 640 Taxa. *Am. J. Bot.* 98, 704–30. <https://doi.org/10.3732/ajb.1000404>
- Soltis, D., Soltis, P., 1998. Molecular Systematics of Plants II, in: *Molecular Systematics of Plants II*. pp. 1–42. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5419-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5419-6_1)
- Sulman, J., Drew, B., Drummond, C., Hayasaka, E., Sytsma, K., 2013. Systematics, biogeography, and character evolution of *Sparganium* (Typhaceae): Diversification of a widespread, aquatic lineage. *Am. J. Bot.* 100. <https://doi.org/10.3732/ajb.1300048>
- Tank, D.C., Eastman, J.M., Pennell, M.W., Soltis, P.S., Soltis, D.E., Hinchliff, C.E., Brown, J.W., Sessa, E.B., Harmon, L.J., 2015. Nested radiations and the pulse of angiosperm diversification: increased diversification rates often follow whole genome duplications. *New Phytol.* 207, 454–467. <https://doi.org/10.1111/nph.13491>
- Thompson, EA., 1975. *Human Evolutionary Trees*. Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Wicke, S., Schneeweiss, G.M., dePamphilis, C.W., Müller, K.F., Quandt, D., 2011. The evolution of the plastid chromosome in land plants: gene content, gene order, gene function. *Plant Mol. Biol.* 76, 273–297. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9762-4>
- Yang, Z., Rannala, B., 1997. Bayesian Phylogenetic Inference Using DNA Sequences: A Markov Chain Monte Carlo Method. *Mol. Biol. Evol.* 14, 717–24. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025811>
- Yang, Z., Yoder, A.D., 2003. Comparison of Likelihood and Bayesian Methods for Estimating Divergence Times Using Multiple Gene Loci and Calibration Points, with Application to a Radiation of Cute-Looking Mouse Lemur Species. *Syst. Biol.* 52, 705–716. <https://doi.org/10.1080/10635150390235557>
- Yoder, A.D., Yang, Z., 2000. Estimation of Primate Speciation Dates Using Local Molecular Clocks. *Mol. Biol. Evol.* 17, 1081–1090. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026389>

- Zanne, A.E., Tank, D.C., Cornwell, W.K., Eastman, J.M., Smith, S.A., FitzJohn, R.G., McGlinn, D.J., O'Meara, B.C., Moles, A.T., Reich, P.B., Royer, D.L., Soltis, D.E., Stevens, P.F., Westoby, M., Wright, I.J., Aarssen, L., Bertin, R.I., Calaminus, A., Govaerts, R., Hemmings, F., Leishman, M.R., Oleksyn, J., Soltis, P.S., Swenson, N.G., Warman, L., Beaulieu, J.M., 2014. Three keys to the radiation of angiosperms into freezing environments. *Nature* 506, 89–92. <https://doi.org/10.1038/nature12872>
- Zhou, B., Tu, T., Kong, F., Wen, J., Xu, X., 2018. Revised phylogeny and historical biogeography of the cosmopolitan aquatic plant genus *Typha* (Typhaceae). *Sci. Rep.* 8, 8813. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27279-3>



## ANEXO

Nombre científico	<i>matK-trnK</i> n° de acceso GenBank	<i>ycf1</i> n° de acceso GenBank
<i>Alcantarea duarteana</i> (L.B. Sm.) J.R. Grant	AY614031.1	KX753723.1
<i>Ananas nanus</i> (L.B. Sm.) L.B. Sm.	KU258041.1	KU096011.1
<i>Barfussia platyrhachis</i> (Mez) Manzan. & W. Till	KX754195.1	KX753852.1
<i>Brocchinia micrantha</i> (Baker) Mez	KX754117.1	KX753774.1
<i>Catopsis nutans</i> (Sw.) Griseb.	KX754101.1	KX753682.1
<i>Encholirium magalhaesii</i> L.B. Sm.	KF784706.1	MF741101.1
<i>Glomeropitcaimia penduliflora</i> (Griseb.) Mez	KX754103.1	KX753689.1
<i>Gregbrownia fulgens</i> (L.B. Sm.) W. Till & Barfuss	KX754123.1	KX753780.1
<i>Gregbrownia hutchisonii</i> (L.B. Sm.) W. Till & Barfuss	AY614050.1	KX753683.1
<i>Guzmania monostachia</i> (L.) Rusby ex Mez	AY614054.1	KX753697.1
<i>Guzmania roezlii</i> (E. Morren) Mez	KX754139.1	KX753796.1
<i>Hechtia glomerata</i> Zucc.	AF162245.2	MF741055.1
<i>Hechtia guatemalensis</i> Mez.	AF162246.2	MF741056.1
<i>Lindmania guianensis</i> (Beer) Mez	AY614019.1	KX753760.1
<i>Mezobromelia capituligera</i> (Griseb.) J.R. Grant	KX754222.1	KX753864.1
<i>Navia saxicola</i> L.B. Sm.	KX754122.1	KX753779.1
<i>Pitcaimia punicea</i> Scheidw.	AY614021.1	KX753738.1
<i>Pseudalcantarea grandis</i> (Schltdl.) Pinzón & Barfuss	KX754107.1	KX753764.1
<i>Pseudalcantarea viridiflora</i> (Beer) Pinzón & Barfuss	AY614066.1	KX753686.1
<i>Puya laxa</i> L.B. Sm.	AY614022.1	KX753739.1
<i>Racinaea ropalocarpa</i> (André) M.A. Spencer & L.B. Sm.	AY614083.1	KX753721.1
<i>Tillandsia adpressiflora</i> Mez	KX754183.1	KX753840.1
<i>Tillandsia albertiana</i> Verv.	KX754127.1	KX753702.1
<i>Tillandsia appenii</i> (Rauh) J.R. Grant	AY614077.1	KX753729.1
<i>Tillandsia aurea</i> Mez	KX754136.1	KX753793.1
<i>Tillandsia australis</i> Mez	KX754126.1	KX753783.1
<i>Tillandsia bergeri</i> Mez	AY614133.1	KX753751.1
<i>Tillandsia carlos-hankii</i> Matuda	AY614089.1	KX753726.1
<i>Tillandsia caulescens</i> Brongn. ex Baker	AY614126.1	KX753733.1
<i>Tillandsia dasyliriifolia</i> Baker	KY114823.1	MF741094.1
<i>Tillandsia demissa</i> L.B. Sm.	AY614115.1	KX753737.1
<i>Tillandsia disticha</i> Kunth	AY614068.1	KX753782.1
<i>Tillandsia duratii</i> Vis.	AY614119.1	KX753745.1
<i>Tillandsia edithae</i> Rauh	KX754163.1	KX753820.1
<i>Tillandsia esseriana</i> Rauh & L.B. Sm.	AY614120.1	KX753731.1
<i>Tillandsia fasciculata</i> Sw.	KX754189.1	KX753846.1

<i>Tillandsia filifolia</i> Schltld. & Cham.	KX754199.1	KX753856.1
<i>Tillandsia floribunda</i> Kunth	KX754151.1	KX753808.1
<i>Tillandsia fuchsii</i> W. Till	KX754157.1	KX753814.1
<i>Tillandsia gardneri</i> Lindl.	AY614104.1	KX753709.1
<i>Tillandsia guatemalensis</i> L.B. Sm.	AY614094.1	KX753755.1
<i>Tillandsia heteromorpha</i> Mez	KX754131.1	KX753788.1
<i>Tillandsia hildae</i> Rauh	KX754198.1	KX753855.1
<i>Tillandsia ixioides</i> Griseb.	AY614129.1	KX753711.1
<i>Tillandsia juerg-rutschmanni</i> Rauh	KX754188.1	KX753845.1
<i>Tillandsia kirschnekii</i> Rauh & W. Till	KX754155.1	KX753812.1
<i>Tillandsia leiboldiana</i> Schltld.	KX754145.1	KX753802.1
<i>Tillandsia limbata</i> Schltld.	KY114838.1	MF741095.1
<i>Tillandsia lotteae</i> H. Hrom.	KX754204.1	KX753861.1
<i>Tillandsia lymanii</i> Rauh	KX754212.1	KX753869.1
<i>Tillandsia myriantha</i> (Baker) Betancur, J.	KX754196.1	KX753853.1
<i>Tillandsia paniculata</i> Schltld. & Cham.	AY614086.1	KX753754.1
<i>Tillandsia propagulifera</i> Rauh	KX754143.1	KX753800.1
<i>Tillandsia punctulata</i> Schltld. & Cham.	AY614087.1	KX753725.1
<i>Tillandsia rauhii</i> L.B. Sm.	AY614101.1	KX753748.1
<i>Tillandsia sphaerocephala</i> Baker	KX754153.1	KX753810.1
<i>Tillandsia usneoides</i> (L.) L.	AY614121.1	KX753742.1
<i>Tillandsia virescens</i> Ruiz & Pav.	KU197091.1	KU285338.1
<i>Typha latifolia</i> L.	AB088801.1	NO DISPONIBLE

Anexo 1. Se enlistan las especies utilizadas en el muestreo taxonómico y el número de acceso a Genbank para la región *trnK-matK* y el gen *ycf1* del cloroplasto.