



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

Posición filogenética de *Thamnosseris lacerata* (Asteraceae), endémica de las Islas Desventuradas de Chile

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de **Biólogo con mención en Medio Ambiente**.

CLAUDIO ALEJANDRO SILVA ALIAGA

Directora del Seminario de Título:

Dra. Rosa Scherson Vicencio

Co-Director del Seminario de Título:

Dr. Nicolás García Berguecio

Patrocinante:

Dra. Carezza Botto Mahan

Agosto 2023

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el o (la) candidato (a):

CLAUDIO ALEJANDRO SILVA ALIAGA

“POSICIÓN FILOGENÉTICA DE *THAMNOSERIS LACERATA* (ASTERACEAE),
ENDÉMICA DE LAS ISLAS DESVENTURADAS DE CHILE”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Biólogo Ambiental

Dra. Rosa Scherson Vicencio

Directora del Seminario de Título

Dr. Nicolás García Berguecio

Co-Director del Seminario de Título

Dra. Carezza Botto Mahan

Patrocinante

COMISIÓN REVISORA Y EVALUADORA

Dr. David Véliz Baeza

Presidente

Dra. Paola Jara-Arancio

Correctora

Santiago de Chile, Agosto 2023

BIOGRAFÍA

Nací un caluroso 14 de diciembre de 1996 en Santiago de Chile. Mi infancia estuvo rodeada de personas maravillosas quienes me hicieron sentir enormemente querido. Muchos años, siendo



niño, me iba de vacaciones durante dos meses junto a mis abuelos a Curanipe (Región del Maule), donde esos largos viajes me hicieron crecer rodeado de una biodiversidad maravillosa. Mi interés por la naturaleza fue creciendo en el transcurso de la adolescencia, donde agradezco toparme con mi profesora de Biología, quien hizo de mi experiencia escolar una ocasión única para aprender sobre ciencias naturales. El 2017 entré a estudiar Biología Ambiental en la Universidad de Chile, donde conocí personas con quienes compartí intereses en común y experiencias gratificantes. Durante este largo camino, encontré mi adoración por la botánica y por las salidas en búsqueda de plantas y paisajes, que intento fotografiar lo mejor posible para únicamente atesorar. En mis tiempos libres, suelo leer, cuidar del jardín, ver amigos y regalonear con mi gato Gaspar, anhelando que la vida me siga entregando la oportunidad de admirar la naturaleza y conocer lo poco que sabemos de ella.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres, Andrea y Claudio, por creer en mis capacidades y apoyarme en mis decisiones, como a la hora de elegir la carrera que quería estudiar. A mi hermana, por estar ahí en cada ocasión que necesité de su ayuda y apoyo. A mi abuelo Nico y mi abuela Carmen, por mostrarme su amor por el campo y la naturaleza. Agradezco profundamente cada enseñanza y cada momento junto a todos ustedes, por su apoyo incondicional en el proceso de escritura de tesis y por hacerme sentir siempre amado.

Agradezco a mi tutora Rosita Scherson y mi co-tutor Nicolás García por darme la oportunidad de trabajar junto a ustedes e introducirme en el mundo de la filogenia, gracias por guiarme durante este largo proceso, por orientarme en mis inquietudes y por estar siempre cuando necesité de vuestra ayuda. Estoy especialmente agradecido por enseñarme lo bello de la ciencia en un ambiente grato como lo es, el Laboratorio de Sistemática y Evolución y el Herbario EIF. Igualmente agradezco al equipo de personas que conocí ahí, por los frecuentes cafés, y por la siempre agradable compañía.

Agradezco a mi patrocinante Carezza Botto, por el apoyo en la realización de esta tesis fuera de mi facultad, y por cada respuesta que recibí frente a mis dudas. También agradezco a mis revisores Paola Jara-Arancio y David Véliz por los comentarios y sugerencias que hicieron de este trabajo una mejor versión.

Agradezco a mis compañeros de universidad, Paula, Álvaro, Sofía y Rosa por hacer de mi estancia en la carrera un tiempo agradable y lleno de risas.

Agradezco a mis amigos incondicionales Roberto, Catherine, Maca y Paula, por haber creído en mi desde el colegio, por haberme apoyado en cada decisión, por tantos bailes, cervezas y humos, y por la enorme cantidad de recuerdos plasmados para siempre en mi memoria.

Agradezco a cada planta que logré apreciar en este largo proceso académico, por permitir maravillarme con su sola existencia. Agradezco cada ocasión en la que logré reencontrarme con la naturaleza, por cada motivación que me entregó, y por las tantas veces que necesité perderme en un bosque para volver a encontrarme.

Agradezco a Christian por sus palabras y compañía, por escucharme cada vez que necesitaba desahogarme o contar ñoñerías, por ser mi compañero en las salidas en búsqueda de plantas y paisajes, y por aceptarme tal cual soy.

Finalmente, agradezco a mi mascota Gaspar, por acurrucarse en mi regazo durante todo este proceso de escritura, por distraerme acostándose en mi teclado cuando solía encontrarme agobiado, por cada momento de alegría, y por acompañarme extensas horas de luz y oscuridad durante este largo camino.

Dedicado a mi madre, por no soltar mi mano en todo este camino.

Y para ti abuelita, siempre vivirás en mí.

CUERPO PRELIMINAR

BIOGRAFÍA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE DE TABLAS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	1
ABSTRACT	1
INTRODUCCIÓN	2
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
Recopilación de datos.....	10
Extracción de ADN.....	11
Reacción de PCR y secuenciación de ADN.....	12
Análisis de datos.....	13
RESULTADOS	15
Cuantificación y amplificación de ADN.....	15
Verificación de secuencias.....	16
Ensamble y alineación de secuencias.....	17
Análisis filogenético de ITS.....	20
Análisis filogenético de <i>trnL-F</i>	23
Análisis concatenado de ITS y <i>trnL-F</i>	26
DISCUSIÓN	29
Posición filogenética de <i>Thamnoseris lacerata</i>	29
Relación entre <i>Thamnoseris lacerata</i> y especies exóticas de <i>Sonchus</i> en Chile.....	30
Procesos de hibridación ancestral entre ITS y <i>trnL-F</i>	32
CONCLUSIÓN	34
BIBLIOGRAFÍA	36
ANEXO	41

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I: Cantidad de ADN de <i>Thamnosseris lacerata</i> obtenido a partir de Easy Qubit.	15
Tabla A1: Números de accesión de GenBank de las especies seleccionadas para el estudio de la región ITS y <i>trnL-F</i> . “/” separa las secuencias en el caso de que se incorpore más de una en el análisis.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1:** Geles de agarosa al 1% observados a través de un transiluminador posterior a la amplificación de ADN de *T. lacerata*. En A) banda de ADN correspondiente a amplificación de la región ITS, en B) banda de ADN obtenida a partir de amplificación de región trnL-F, y en C) el estándar de tamaño AccuRuler (Maestrogen, Taiwan, China)..... 15
- Figura 2:** Secuencia de 696 bases nucleotídicas obtenida a partir del ensamble de *forward* y *reverse* para la región ITS de rADN de *Thamnosseris lacerata*, aquellas en la posición número 22 y 60 fueron reemplazadas por “N”. 17
- Figura 3:** Secuencia de 838 bases nucleotídicas de la región *trnL-F* a partir de trnL (UAA) de cpADN de *Thamnosseris lacerata*. 18
- Figura 4:** Alineamiento de las 36 secuencias seleccionadas del estudio de la región ITS, donde se observan los primeros 100 sitios de las alineación. *T. lacerata* se observa encerrada en rojo. Ilustración de Geneious prime (versión 2023.0 Biomatters). 19
- Figura 5:** Alineamiento de las 42 secuencias seleccionadas del estudio de la región *trnL-F*, donde se observan 72 sitios de las alineación. *T. lacerata* se observa con encerrada en verde. Ilustración de Geneious prime (versión 2023.0 Biomatters).... 19
- Figura 6:** Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en secuencia de rADN de la región ITS para las especies de la subtribu Hyoseridinae. Los apoyos de valores bootstrap (%) se encuentran sobre las ramas. Los números romanos I y II corresponden a dos clados del género *Sonchus* diferenciados. La especie de estudio (*Thamnosseris lacerata*) se representa en color rosado y la rama celeste corresponde a un clado altamente soportado (94% bootstrap) que incluye a *Dendroserris litoralis*. Las secuencias adicionales incorporadas de la misma especie son señaladas como “-2” y “-3”..... 21
- Figura 7:** Árbol filogenético de inferencia bayesiana basado en secuencias de rADN de la región ITS para las especies de la subtribu Hyoseridinae. Los valores de probabilidad posterior se encuentran sobre las ramas en cada nodo. Los números romanos I y II corresponden a dos clados del género *Sonchus* diferenciados. La especie de estudio (*Thamnosseris lacerata*) se representa en color rosado y la rama celeste corresponde a un clado altamente soportado (1 probabilidad posterior) que incluye a *Dendroserris litoralis*. Las secuencias adicionales incorporadas de la misma especie son señaladas como “-2” y “-3”. 22
- Figura 8:** Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en secuencia de cpADN de la región *trnL-F* para las especies de la subtribu Hyoseridinae. Los apoyos de valores bootstrap (%) se encuentran sobre las ramas. La especie de estudio (*Thamnosseris lacerata*) se representa en color morado y las ramas en azul corresponden a un clado bien soportado (86% bootstrap) de *Sonchus*. Las secuencias adicionales incorporadas de la misma especie son señaladas como “-2” y “-3”..... 24
- Figura 9:** Árbol filogenético de inferencia bayesiana basado en secuencias de cpADN de la región *trnL-F*. Los valores de probabilidad posterior se encuentran sobre las ramas en cada nodo. La especie de estudio (*Thamnosseris lacerata*) se representa en

color morado y las ramas en azul corresponden a un clado bien soportado (0.97 probabilidad posterior) de *Sonchus*. Las secuencias adicionales incorporadas de la misma especie son señaladas como “-2” y “-3”.....25

Figura 10: Árbol filogenético de máxima verosimilitud de Hyoseridinae basado en conjunto de datos combinados de las regiones ITS y *trnL-F*. Los apoyos de valores bootstrap (%) se encuentran sobre las ramas. Las ramas del clado de interés se representan en color naranja y la especie de estudio (*Thamnoseris lacerata*) en rosado para facilitar su identificación. Las secuencias adicionales incorporadas de la misma especie son señaladas como “-2” y “-3”.....27

Figura 11: Árbol filogenético de inferencia bayesiana de Hyoseridinae basado en conjunto de datos combinados de las regiones ITS y *trnL-F*. Los valores de probabilidad posterior se encuentran sobre las ramas en cada nodo. Las ramas del clado de interés se representan en color naranja y la especie de estudio (*Thamnoseris lacerata*) en rosado para facilitar su identificación. Las secuencias adicionales incorporadas de la misma especie son señaladas como “-2” y “-3”.....28

Figura A1: Árbol de consenso estricto de *Sonchus sensu lato* basado en el conjunto de datos combinado de ITS y cpADN de Mejías y Kim (2012).41

Figura A2: Árbol filogenético de inferencia bayesiana representado a partir de un filograma basado en secuencias de cpADN de la región *trnL-F*. La especie de estudio (*T. lacerata*) se representa en color rosado para facilitar su identificación.43

Figura A3: Árbol filogenético de inferencia bayesiana representado a partir de un filograma basado en secuencias de rADN de la región ITS. La especie de estudio (*T. lacerata*) se representa en color rosado para facilitar su identificación.44

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico

cpADN: Genoma del cloroplasto

rADN: Región de repetición del ADN ribosómico nuclear

ITS: Internal Transcribed Spacer

dNTP's: Desoxirribonucleótidos trifosfato

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RESUMEN

Las herramientas moleculares y la utilización de distintas regiones génicas han permitido obtener filogenias más robustas y ahondar en la historia evolutiva de diferentes especies, así como también al evaluar el papel de procesos como la introgresión y el polimorfismo ancestral. La posición filogenética de la especie *Thamnosseris lacerata* (Hyoseridinae, Cichorieae, Asteraceae), ha sido inestable durante décadas debido a la falta de material genético como evidencia molecular para respaldar su relación filogenética dentro de Hyoseridinae.

Con el objetivo de incorporar por primera vez a *T. lacerata* en una filogenia y determinar su posición filogenética a partir de ADN de la especie, se analizaron las primeras filogenias de las regiones ITS y *trnL-F*. Además, se evaluó la relación molecular con las especies exóticas de *Sonchus* (parte de Hyoseridinae) que habitan actualmente en Chile y se propuso evaluar la posibilidad de evidenciar procesos evolutivos que dieron origen a esta especie.

Los resultados a partir de secuencias de ITS y *trnL-F* indican que *T. lacerata* pertenece a un clado bien soportado llamado *Sonchus sensu lato*. Además, los resultados de ITS indican que la especie más cercana dentro de la filogenia pertenece al género *Dendroseris*. Por otro lado, el análisis de regiones concatenadas sugiere que existiría una relación cercana con *S. arvensis*, exótica de Chile en comparación con las demás especies exóticas que habitan en el país. La evaluación del papel de los procesos evolutivos que pudieron haber originado a *T. lacerata* fue limitada debido a la baja resolución en la filogenia de *trnL-F*, por lo que no fue posible evidenciar fenómenos evolutivos como la introgresión. Sin embargo, la posición filogenética

determinada en este estudio corresponde a la primera aproximación en comprender las relaciones evolutivas de esta especie endémica de Chile.

ABSTRACT

Molecular tools and the use of different gene regions have allowed to obtain better resolved phylogenies and delve into evolutionary history of different species, as well as evaluating the role of processes such as introgression and ancestral polymorphism. The phylogenetic position of the species *Thamnosseris lacerata* (Hyoseridinae, Cichorieae, Asteraceae), has been unstable for decades due to the lack of genetic material as molecular evidence to support its phylogenetic relationship within the Hyoseridinae.

In order to incorporate *T. lacerata* into a phylogeny for the first time and delimit its phylogenetic position from the species' ADN, the first phylogenies of ITS and *trnL-F* regions were analyzed. Moreover, the molecular relationship with the exotic species of *Sonchus* (part of Hyoseridinae) that currently inhabit Chile was evaluated and put forward to evidencing evolutionary processes that could have originated this taxon.

The results from ITS and *trnL-F* sequences indicate that *T. lacerata* belongs to a well-supported clade named *Sonchus sensu lato*. Furthermore, the ITS results point out that it could be a sister-group to the *Dendroseris* genus. Additionally, the analysis of concatenated regions suggests that there would be a closer relationship with the exotic species *S. arvensis*. The evaluation of the evolutionary processes that could have originated *T. lacerata* was limited due to the low resolution of the *trnL-F* phylogeny, so it was not possible to demonstrate evolutionary phenomena such as introgression. Nevertheless, the phylogenetic position determined in the current investigation corresponds to the first approximation to comprehend the origin of this endemic Chilean species.

INTRODUCCIÓN

Los avances en biología molecular han proporcionado una serie de herramientas para la identificación de especies, que junto con el pensamiento filogenético, han permitido aumentar los esfuerzos por reconstruir su historia evolutiva, y así ayudar a responder preguntas en el área de la evolución y la taxonomía (Wendel & Doyle, 1998; Arif y col., 2010). Entre muchas herramientas moleculares, la secuenciación de ADN y la filogenia molecular son instrumentos básicos para cualquier estudio de carácter filogenético, puesto que -entre otros- han permitido determinar las posiciones filogenéticas de diferentes especies (Mayuzumi & Ohba, 2004), apoyar diversas clasificaciones taxonómicas (e.g., Acosta y col., 2016; García y col., 2022) e incluso, remodelar los conceptos de relaciones y circunscripciones en todos los niveles de la jerarquía taxonómica (Qui y col., 1999; Soltis y col., 1999; Crawford, 2000).

A medida que las investigaciones en el área molecular aumentan, se hace evidente la utilización de diversas fuentes para resolver distintas preguntas científicas, particularmente debido a las diferentes tasas de evolución de secuencias entre genomas, genes y regiones génicas (Small y col., 2004). Además, la dependencia de una única región molecular a menudo puede resultar en una resolución filogenética insuficiente o inferencia incorrecta, por lo tanto, es cada vez más extendido aplicar distintas fuentes de datos a un grupo común de especies (Wendel & Doyle, 1998). Las dos principales fuentes de variación molecular utilizada con fines filogenéticos en plantas, han sido el genoma del cloroplasto (cpADN) y la región de repetición del ADN ribosómico nuclear (rADN) (Olmstead & Palmer, 1994). Una cantidad considerable de literatura científica ha sido publicada bajo el estudio

exhaustivo de las limitaciones y ventajas que presentan (e.g., Wolfe y col., 1987; Clegg y col., 1994; Small y col., 2004), así como de las diferencias en los resultados obtenidos al utilizar una u otra fuente de material genético (e.g., Ferher y col., 2007; Kim y col., 2007). Una de estas diferencias consiste en la aparición de disimilitudes en la posición filogenética de las especies, que comúnmente se plantean como incongruencias filogenéticas, las cuales, derivan en parte al reconocimiento de que los genomas presentan distintas historias evolutivas (Wendel & Doyle, 1998). No obstante, la práctica de utilizar distintas fuentes moleculares más que dificultar el entendimiento filogenético de los linajes, en ocasiones es deseable debido a que permite ahondar en el reconocimiento de las causas implicadas en este fenómeno.

En ocasiones, estos resultados pueden ser explicados por procesos de introgresión o polimorfismo ancestral (Wendel & Doyle, 1998). El rol de la introgresión en la evolución de las plantas es un proceso común en los genomas organelares, debido a la frecuencia aparentemente alta de introgresión citoplasmática (Reiseberg & Brunsfeld, 1998; Wendel & Doyle, 1998), lo que produce filogenias que probablemente reflejan la historia evolutiva de la introgresión en lugar de la historia de la división del linaje (Knowles, 2009; Reiseberg, 2000). Asimismo, la retención y clasificación estocástica de polimorfismos ancestrales causados por la clasificación incompleta del linaje, produce historias filogenéticas que también son engañosas (Escobar y col., 2011). Independiente de la causa de las incongruencias, la perspectiva de considerar estos fenómenos durante el análisis de la posición filogenética de las especies, ocasionalmente podría esclarecer el resultado filogenético lo que contribuye al conocimiento sobre los procesos evolutivos que originaron a las especies actuales.

Entre los grupos de plantas presentes, la tribu Cichorieae abarca un conjunto de plantas comprendidas dentro de las asteráceas (Asteraceae), que incluye 98 géneros y más de 1500 especies (Bremer, 1994). Diversos estudios han sido publicados con el objetivo de determinar las relaciones a nivel de subtribu y género dentro de Cichorieae, donde se ha evidenciado fenómenos de introgresión por ejemplo, en el género *Hieracium* subgénero *Pilosella* (Ferber y col., 2007). Sin embargo, los cambios más destacados según lo revelado por estudios filogenéticos se refiere a la subtribu Hyoseridinae (anteriormente Sonchinae), una de las más ampliamente distribuidas de Cichorieae, donde la detección de varias incongruencias entre filogenias, también ha evidenciado la posible ocurrencia de hibridación e introgresión en este grupo de plantas (Lee y col., 2005; Kim y col., 2007).

La clasificación de las categorías taxonómicas involucradas en Hyoseridinae ha sido propuesta por distintos autores (e.g., Stebbins, 1953; Jeffrey, 1966; Bremer, 1993, 1994) y en general, se ha basado en análisis cladísticos morfológicos y estudios moleculares (Kim y col., 1996a). Una de las clasificaciones consensuadas se refiere a la realizada por Bremer en 1993, quien utilizando análisis cladístico morfológico clasificó 11 géneros y aproximadamente 130 especies, definiendo dos alianzas: 1) *Launaea* y los géneros *Aetheorhiza* y *Reichardia* y 2) *Sonchus* y un grupo de géneros estrechamente relacionados (*Actites*, *Babcockia*, *Embergeria*, *Kirkianella*, *Lactucosonchus*, *Sventenia* y *Taeckholmia*) (Bremer, 1993). Pese a que esta clasificación ha sido confirmada por análisis moleculares posteriores, las publicaciones realizadas hasta la fecha siguen proponiendo cambios en las relaciones taxonómicas, ya que la resolución filogenética de ciertos géneros es aún poco robusta, y por consiguiente la literatura científica no entrega clara evidencia

todavía de la historia evolutiva de Hyoseridinae (e.g., Jansen y col., 1991; Whitton y col., 1995; Lee & Baldwin, 2004).

Pese a las continuas revisiones taxonómicas, en general se ha demostrado que *Sonchus* subgénero *Sonchus* es un género bien definido de Hyoseridinae, el cual incluye muchas malezas extendidas, exitosas y nocivas con una distribución cosmopolita. En Chile, el género está representado por cuatro especies: *Sonchus arvensis* L., *Sonchus asper* (L.) Hill, *Sonchus oleraceus* L. y *Sonchus tenerrimus* L., siendo las cuatro hierbas introducidas y tres de ellas con una amplia distribución a lo largo del país, a excepción de *S. arvensis* acotada a la Región de Magallanes (Rodríguez, y col., 2018). La literatura ha documentado que se trata de un género cuya forma de especiación involucró una radiación adaptativa producto de la aislación geográfica en microhábitats, por lo que parecen ser responsables del origen de varias especies endémicas de islas tanto en el Océano Pacífico (e.g., *Dendroseris* en las Islas Juan Fernández, *Thamnosseris* en las Islas San Ambrosio) como en el Océano Atlántico (la alianza leñosa *Sonchus* de las Islas Macaronesias) (Crawford y col., 1992; Sang y col., 1994; Kim y col., 2007).

Thamnosseris es un género monotípico, que pertenece a la subtribu Hyoseridinae, el cual es endémico de las Islas San Ambrosio, frente a la costa de Chile, islas que pertenecen a territorio chileno (Kim y col., 2007). *Thamnosseris lacerata* (Phil.) F. Phil., es un arbusto que puede alcanzar cinco metros de altura, que antiguamente se podía encontrar formando bosques de densa cobertura vegetal en las planicies superiores de San Ambrosio y también en el cerro Amarillo de San Félix, aunque en esta última de forma más escasa (Kuschel, 1963; Rivera, 1999). En la actualidad, sólo quedan vestigios de estos bosques, en los cuales se pueden

encontrar unos pocos arbustos remanentes en los lugares más húmedos habitando junto a herbáceas exóticas (Téran & Vilches, 2020). Esta disminución se ha asociado al detrimento en la calidad del hábitat debido a perturbaciones y transformaciones de su área de ocupación por la introducción de especies invasoras, lo que ha llevado a catalogar a *T. lacerata* como especie En Peligro (EN) (MMA, 2016).

Una problemática adicional que involucra a *T. lacerata*, tiene relación con la falta de material genético como evidencia molecular para determinar la posición filogenética de esta especie dentro de Hyoseridinae. Un considerable número de publicaciones durante varias décadas ha estudiado la relación filogenética sin evidencia molecular, lo que sugiere que su posición filogenética ha sido inestable (e.g., Stebbins, 1953; Jeffrey, 1966; Kim, y col., 1996b, 2007). La controvertida cuestión se ha centrado en la relación de *Thamnoseric* con el género *Dendroseric* (parte de Hyoseridinae) endémico de las Islas Juan Fernández. Autores entendidos en la materia, han sugerido modificaciones de ambos géneros a nivel de subtribu (Stebbins, 1953; Bremer, 1994; Jeffrey, 1966). Un consenso anteriormente establecido fue la creación de la subtribu Dendrosericinae que incluía a *Dendroseric* y *Thamnoseric* (Stebbins, 1953), pero al igual que otras clasificaciones, la evidencia pareciera no ser concluyente.

En trabajos más recientes, Kim y colaboradores (2007) mediante estudios filogenéticos moleculares del género *Sonchus* mostraron que *Dendroseric* está anidado en la subtribu Sonchinae (actualmente Hyoseridinae) ya que el rango subtribal Dendrosericinae establecido con anterioridad no se encontraba soportado. Además, el género *Thamnoseric* resultó ser hermano de *Dendroseric* (Jeffrey, 1966; Kim y col., 1996b; B.G Baldwin, comunicación personal), sugerencia que

posteriormente fue apoyada por diferentes autores (Lack, 2007; Kilian, 2009). En consecuencia, los nombres *Dendroseris* y *Thamnoseris* se consideraron sinónimos de *Sonchus*, y se propuso una re-circunscripción de la subtribu Sonchinae, que fue nombrada finalmente Hyoseridinae (Mejías y Kim, 2012). No obstante, la sugerencia de los autores de incluir a *Thamnoseris* dentro de un *Sonchus* más amplio, fue realizada a partir de una comunicación personal con el experto en el grupo, y no se ha aportado con ADN de la especie hasta ahora, lo que se puede comprobar realizando una búsqueda en GenBank.

El estudio de la posición filogenética de *T. lacerata* que se aborda en este trabajo es sustancial por una serie de razones: en primer lugar, el análisis filogenético incluye por primera vez la extracción de ADN de *T. lacerata*, lo que permite evaluar su posición filogenética actual en Hyoseridinae, lo que podría proporcionar evidencia para justificar las sugerencias anteriormente mencionadas o bien, ofrecer una nueva alternativa a raíz de nuevos descubrimientos. En segundo lugar, el trabajo de reconstrucción filogenética se realizará utilizando dos fuentes moleculares: cpADN y rADN, por consiguiente, el entendimiento de la relación de *T. lacerata* con las demás especies de la subtribu Hyoseridinae, tendría en cuenta la posibilidad de obtener incongruencias filogenéticas y por lo tanto, la posible evidencia de fenómenos de hibridación ancestral. Por último, se tendría la oportunidad de discutir la relación de *T. lacerata* con las especies exóticas del género *Sonchus* que habitan actualmente en Chile y así obtener una primera aproximación sobre su origen. Es importante mencionar, que si bien, sería interesante examinar con mayor detalle la historia evolutiva de la subtribu Hyoseridinae, para los propósitos que busca esta investigación, se limita la discusión y análisis al taxón de estudio, lo que a su vez,

constituye una gran oportunidad para contribuir al conocimiento de esta especie endémica de Chile.

OBJETIVO GENERAL

Analizar y determinar mediante evidencia molecular la posición filogenética de *Thamnosseris lacerata* (Asteraceae).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar la posición filogenética de *Thamnosseris lacerata* en la subtribu Hyoseridinae.
2. Analizar la relación filogenética entre las especies de *Sonchus* que habitan en Chile y *Thamnosseris lacerata*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recopilación de datos

Los criterios de selección de las especies fueron los siguientes: primero, se utilizó como base de selección las especies de la filogenia de Mejías y Kim (2012) (Ver Anexo: Figura A1). Luego, se seleccionaron aquellas especies para las que las secuencias de los genes de interés se encontraban completas y disponibles en la base de datos GenBank obtenidas de www.ncbi.nlm.nih.gov (International Nucleotide Sequence Database Collaboration). Finalmente, se descargó más de una secuencia por especie en el caso de que hubiera mayor disponibilidad en la base de datos.

Para el estudio de regiones genéticas nucleares se descargaron secuencias disponibles de los espaciadores ITS1 e ITS2 en formato FASTA de 24 especies, obteniendo un total de 35 secuencias (Ver Anexo: Tabla A1). Esta selección incluyó especies de varios géneros que pertenecen a la subtribu Hyoseridinae, específicamente, dos especies del género *Reichardia*, una del género *Launaea* y diecisiete especies del género *Sonchus*, además, se incluyó las especies *Aetheorhiza bulbosa* (actualmente *Sonchus bulbosus* (L.) N.Kilian & Greuter), *Actites megalocarpa* (actualmente *S. megalocarpus* (Hook.f.) J.M.Black) y *Dendroseris litoralis* (actualmente *S. brassicifolius* S.-C. Kim & Mejías). De las diecisiete especies de *Sonchus*, cuatro corresponden a especies que son exóticas y habitan en Chile: *S. arvensis*, *S. asper*, *S. oleraceus* y *S. tenerrimus* (Rodríguez, y col., 2018).

Para el estudio de la región del cloroplasto, se recopilaron secuencias del espaciador *trnL-F* de 23 especies obteniendo un total de 41 secuencias (Ver Anexo: Tabla A1). Asimismo, se seleccionaron especies de varios géneros de la subtribu Hyoseridinae, específicamente, tres del género *Launaea* y dieciséis especies del

género *Sonchus*, donde once especies son compartidas con el análisis del espaciador ITS. Además, se seleccionaron otras especies para las cuales habían secuencias disponibles de la región *trnL-F* en GenBank y no fueron incorporados en el análisis de ITS: *Chrysoprenanthes pendula* (actualmente *S. pendulus* Sch.Bip. Sennikov), *Sventenia bupleuroides* (actualmente *S. bupleuroides* Font Quer, N.Kilian & Greuter), *Babcockia platylepis* (actualmente *S. platylepis* Webb & Berthel) y *Taeckholmia pinnata* (actualmente *S. leptcephalus* Cass.). De las especies de *Sonchus* exóticas que habitan en Chile se obtuvieron secuencias de *S. asper* y *S. oleraceus*.

Como se mencionó con anterioridad, tanto para el estudio de las regiones genéticas nucleares como del cloroplasto, se descargaron diferentes secuencias para varias de las especies anteriormente mencionadas (Ver Anexo: Tabla A1). Con el objetivo de obtener una representación similar a la propuesta por Mejías y Kim (2012), todas las secuencias fueron incluidas al momento de realizar los árboles filogenéticos, al igual que se mantuvieron los nombres de las especies y se seleccionó a *Lactuca perennis* y *Prenanthes purpurea* como grupo hermano o externo que pertenecen a la subtribu Lactucinae (parte de Cichorieae).

Extracción de ADN

Se aisló ADN de *Thamnosseris lacerata* de tejido vegetal de un individuo herborizado, parte de la colección del herbario EIF de la Facultad de Ciencias Forestales y de la Conservación de la Naturaleza, Universidad de Chile, que fue colectado en las Islas Desventuradas por miembros de la ONG *Island Conservation*, y donado a EIF. El procedimiento se llevó a cabo empleando el protocolo de extracción DNeasy Plant Kit (Qiagen, Valencia, California, USA). El producto de

extracción fue cuantificado utilizando un fluorómetro de cuantificación Easy Qubit (Thermofisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) y visualizado a través de un gel de agarosa al 1% (1 g de agarosa por 100 ml de TAE), para finalmente confirmar el éxito de la extracción mediante un transiluminador con fluorescencia UV después de la tinción con Blue-orange.

Reacción de PCR y secuenciación de ADN

Se amplificó una región genética nuclear y otra del cloroplasto mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para la región de repetición del ADN ribosómico nuclear (rADN) se utilizó los cebadores ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') en concentración 10 μ M, los cuales son cebadores estándar para amplificar la región del espaciador del cistron nuclear ITS (White y col., 1990). Por otro lado, la reacción de PCR para el genoma del cloroplasto (cpADN) se realizó empleando los cebadores trnL (5'-GGTTCAAGTCCCTCTATCCC-3') y trnF (5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'), también en concentración 10 μ M, los cuales son cebadores universales para amplificar esta región no codificante del cloroplasto (Taberlet, 1991). Se seleccionaron estas regiones genéticas debido a que fueron utilizadas para reconstruir las relaciones filogenéticas de la alianza Hyoseridinae en estudios anteriores (Lee y col., 2005; Kim y Mejías, 2007).

La reacción de PCR fue preparada para ambos marcadores de forma independiente y en cada caso se incluyó una reacción sin ADN como control negativo. Para ITS se prepararon dos tubos; añadiendo a cada uno de ellos 23 μ l de una solución ya elaborada que contenía los cebadores seleccionados, además de la enzima Taq polimerasa, un Buffer y desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs). A

continuación, al primer tubo se le añadió 2 µl de ADN, mientras que al otro se le añadió 2 µl de agua libre de nucleasas. Por consiguiente, se obtuvo un volumen total de 25 µl en cada una de las preparaciones. Este procedimiento se repitió para *trnL-F*, no obstante, se agregó la solución preparada con los cebadores correspondientes para amplificar dicha región.

Las preparaciones fueron montadas en un termociclador Thermal Cycler (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), donde fueron amplificadas usando el mismo ciclo para ITS y *trnL-F* (Lee y col., 2005): el ADN fue desnaturalizado a 94°C durante 2 minutos, seguido de 32 ciclos de: 94°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos (T° *annealing*), y para culminar 72°C durante 2 minutos como extensión final. Una vez terminado este procedimiento, el producto de amplificación se verificó mediante la visualización de 5 µl de la muestra en un gel de agarosa al 1% y se observó en un transiluminador con fluorescencia UV después de la tinción con Blue-orange para confirmar el éxito de la amplificación. Finalmente las muestras fueron enviadas a la Unidad de Secuenciación de la Pontificia Universidad Católica para su posterior purificación y secuenciación mediante el método Sanger.

Análisis de datos

Una vez obtenidos los cromatogramas de las secuencias *forward* y *reverse* tanto para cpADN como para rADN, se verificaron mediante un BLAST en GenBank a través del software 4Peaks (Nucleobytes, Amsterdam, Países Bajos), para encontrar regiones de similitud de las secuencias obtenidas con la base de datos y comprobar la amplificación de la región de interés. A través del software Aliview (Larsson, 2014) fueron eliminados los extremos de ambas secuencias y se excluyeron las regiones que mostraban puntos máximos desiguales (diferentes

alturas), o bien donde el proceso de secuenciación no determinó los nucleótidos. Posteriormente, ambas secuencias (tanto *forward* como *reverse*) fueron ingresadas en el programa de alineamiento CodonCode (CodonCode Corporation, Delham, Massachusetts) en formato FASTA, donde fue hecho el reverso complementario a una de ellas para obtener una única secuencia. Se verificó el resultado obtenido y se reemplazó cualquier notación que no representara las bases nucleotídicas representadas por las letras A, C, G y T por la letra N, debido a la dificultad de determinar la base original. El resultado se descargó en un nuevo archivo FASTA en donde se añadieron las secuencias disponibles de las especies seleccionadas de GenBank. El alineamiento de las secuencias se realizó mediante el software MAFFT versión 7 en el programa Geneious Prime.

El análisis filogenético se hizo mediante dos métodos para comparar los resultados. Para el análisis bayesiano se utilizó el software Mr. Mayes 3.2.7 utilizando como soporte estadístico las probabilidades posteriores de los clados, donde se consideró un nodo bien soportado aquel que tenía un valor igual o superior a 0.95 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Además, se empleó el método de máxima verosimilitud (*maximum likelihood*) con el software RaxML, donde el soporte de los nodos individuales, se evaluó con valores de bootstrap considerando una medida fiable de la precisión filogenética valores del 70% o superiores (Hillis & Bull, 1993). Adicionalmente, se realizó una matriz de datos concatenados de ITS y *trnL-F* para obtener una representación filogenética de ambos genes combinados. Por último, se utilizó el software FigTree para visualizar las topologías resultantes y comparar tanto los dos métodos como las filogenias del núcleo y del cloroplasto.

RESULTADOS

Cuantificación y amplificación de ADN

La siguiente tabla ilustra las mediciones de cuantificación realizadas posterior a la extracción de ADN de *Thamnosseris lacerata*, obteniendo un promedio final de 9.53 ng/ μ l, resultado que proporciona suficiente cantidad de ADN para continuar con el proceso de amplificación y eventual secuenciación (Tabla I).

Tabla I: Cantidad de ADN de *Thamnosseris lacerata* obtenido a partir de Easy Qubit.

	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio
ADN (ng/ μ l)	9,42	9,54	9,64	9,53

El resultado de la amplificación de ADN de *Thamnosseris lacerata* de las regiones ITS y *trnL-F* visualizado a través de un gel de agarosa al 1% muestra en ambos casos una banda discreta que confirma el éxito de la amplificación (Fig. 1).

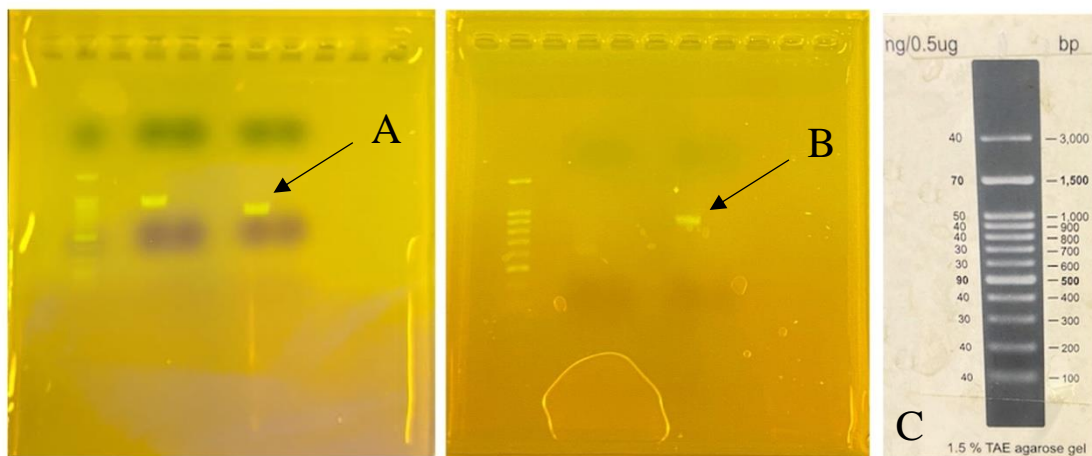


Figura 1: Geles de agarosa al 1% observados a través de un transiluminador posterior a la amplificación de ADN de *T. lacerata*. En A) banda de ADN correspondiente a amplificación de la región ITS, en B) banda de ADN obtenida a partir amplificación de región *trnL-F*, y en C) el estándar de tamaño AccuRuler (Maestrogen, Taiwan, China).

Verificación de secuencias

Como se mencionó con anterioridad, para encontrar regiones de similitud entre las secuencias obtenidas y la base de datos, se realizó un análisis BLAST a cada una de ellas. Para la región ITS, la secuencia *forward* (ITS5) coincide con 134 secuencias de la tribu Cichorieae, siendo 133 del género *Sonchus* de la subtribu Hyoseridinae. A nivel de especie, el mayor número de coincidencias es con *S. oleraceus* (33), seguido por *S. asper* (17) y *S. arvensis* (7), con un porcentaje de identidad mayor al 86,26%, 88,46% y 89,62%, respectivamente. Para la secuencia *reverse* (ITS4) se obtuvo 106 coincidencias con la subtribu Hyoseridinae, siendo 91 con el género *Sonchus*. El mayor número de coincidencias a nivel de especie, fue con *S. oleraceus* (37), seguido por *S. asper* (15) y *S. boulosii* (14), con un porcentaje de identidad mayor al 89,97%, 92,46% y 96,15% respectivamente. Adicionalmente, los datos observados muestran una estrecha relación con *Dendroseris littoralis*, obteniendo un porcentaje de identidad de las secuencias ITS5 e ITS4 de 94,16% y 96,89% respectivamente con dicha especie.

Por otro lado, para la región *trnL-F*, la secuencias *forward* (*trnL*) coincide con 84 secuencias de la subtribu Hyoseridinae, siendo 62 del género *Sonchus*. A nivel de especie, el mayor número de coincidencias es con *S. oleraceus* (7) con un porcentaje de identidad mayor al 80,72%. Para la secuencia *reverse* (*trnF*) se obtuvo 134 coincidencias con la subtribu Hyoseridinae, siendo 126 con el género *Sonchus*. El mayor número de coincidencias a nivel de especie, al igual que la secuencia *forward* fue con *S. oleraceus* (7) con un porcentaje de identidad mayor al 85,31%.

Ensamble y alineación de secuencias

Las secuencias fueron editadas mediante el software CodonCode, donde se cortaron 20 pares de bases nucleotídicas al inicio y al final. Para las secuencias de la región ITS, se lograron 131 y 696 bases nucleotídicas correspondientes a ITS4 e ITS5 respectivamente. Se realizó el ensamble complementario de ambas secuencias obteniendo la secuencia final y se reemplazaron aquellas bases nucleotídicas irreconocibles (Fig. 2). Para las secuencias de la región *trnL-F*, *trnF* no entregó buena resolución de secuenciación (solamente 15 bases), por lo tanto, no fue utilizada en análisis posteriores. En cambio, *trnL* entregó mejor resolución de secuenciación con un total de 838 bases nucleotídicas (Fig. 3).

```
1 TACAAGGTTTCCGTAGGTGAANCTGCGGAAGGATCATTTGTCGAACCCTGCAAGCAGAANGACCCGTGAAC
72 ATGTAAATACAACCTGGTGTGTTGAGACGGGCCCTTAGGTTCTGATCAGCAA CCCCATCCGGTGTGTTC
143 ATGGTATCTCTGTTGTGGTACCATGGATGTCCCATCGGGCTATAACAAACCCGGGCACGGCATGTGCCAAG
214 GAAAACGAAATAAGAGAA GGTATCTACTTCGTTTGCCCCGTTTTGCGGTGTGCATGCAGGTGGTAGCCTCC
285 TTTAAAACACTAACGACTCTCGGCAACGGATATCTCGGCTCACGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAA TGG
356 ATACTTGGTGTGAATTGCAGAATCCCGTGAACCATCGAGTTTTTGAA CGCAAGTTGCGCCGAAGCCATCC
427 GGC CGA GGGCACGCCTGCTGGCGTCA CGCATCGCGTCCGCCCTG CCAAACACCTGAAAGGGTAATCA
498 TGGTGATGGGGGCGGAAAT TGG CCTCCC GTTCTTGTGTTTCGGTTGGCCTAAA GATGAGTCCCCCTATGGC
569 GGATGCACAACTAGTGGTGGTTGAATAGACCCCTCGTCTGTGTTGTGTGTCTGAGCTGGGAGGGGAAGCTC
640 TCA TTT TAGACCCCACTGTATCGTTAAAAAATGATA TATCGACCGCGA CCC CAGGTCT
```

Figura 2: Secuencia de 696 bases nucleotídicas obtenida a partir del ensamble de *forward* y *reverse* para la región ITS de rADN de *Thamnosseris lacerata*, aquellas en la posición número 22 y 60 fueron reemplazadas por “N”.

```

1 ACATCCFAC TAGTCATCTGTCTCTCCACATTTCCTGTTACTATAAAACTGGGGTCTCCTGAACCTGAT
72 CGGGTTTTCCGAAAAC TCCAAAAGTTCCGAAAGCTTGATCAAAAAGGATTTTGCAGAGACTCGATGGAA
143 GCTGTTCTAACGAGTGGAGTTGATTGTCTTACATTCTTGA GGAATCCTTCTATTTTACTTCAGAAA GAA
214 AGATAAACCTATATACATAAAACA GAAGAATTGCTGTCTGTC TATTCCGTATTGAATGAAAAA TCGAATAT
285 TCATTGATCAACCATTCA CGCCAT AATCTGAAATTTCTTTG AAGATGTGATTTTTTCGGACGAGAA TAAAC
356 TTGAA C C C T C C G T T C T T T T G T C A A T A C C G A T T T C T C T T A T T T A T T T C A A T G A A A A T C C G T C G A T T T T
427 GTAATC CGGAGGGTTACAGTC CCTCTC TCCCAATAATA CCA TTTGCCTCC CAACTTCTTTATCATATCCT
498 TTTT GCGTTGATCGTTC AAAAC TCC TTT TCTCAT TCACTACTCTTTATATTGGAG CGTAAA TGCTGT TCTC
569 TTATC A C A T G T G A T A T C C T T C A T A C A T G T A A A A T G A A T A T C G A T T C C T C G G A A T C C C T A T T T G A A T G A T
640 T C A C G A T C G A T A T T T T A T T C A T A C T G A T C C T T A C A C C T A T G C T C T T T T A A C A T C T T C T A C T G A C G G G A T G
711 A T G G T T T G C A G A A C A C T T T C A A T G G A T C T A G A C T G C C C T T C T C A T T A A T A T G A A G A T G A C G A T G A G A C A T
782 G A T G A A T A C T T G G G A T A G C T C A C C T G A C A G A G G C T A G G A C T G A T T A T C C T C G T G T C C

```

Figura 3: Secuencia de 838 bases nucleotídicas de la región *trnL-F* a partir de trnL (UAA) de cpADN de *Thamnosseris lacerata*.

Cada una de las secuencias anteriormente mencionadas fue alineada con el conjunto de secuencias de las especies seleccionadas para cada región de estudio. Una vez realizada la alineación, para la región ITS, se eliminaron los 39 sitios del inicio y del final, obteniendo un total de 652 sitios alineados, de los cuales 186 (28,5%) son idénticos (Fig. 4). Para la región *trnL-F*, se eliminaron 49 sitios del final, obteniendo un total de 1.611 sitios alineados, de los cuales 1.163 (72,3%) son sitios idénticos (Fig. 5).

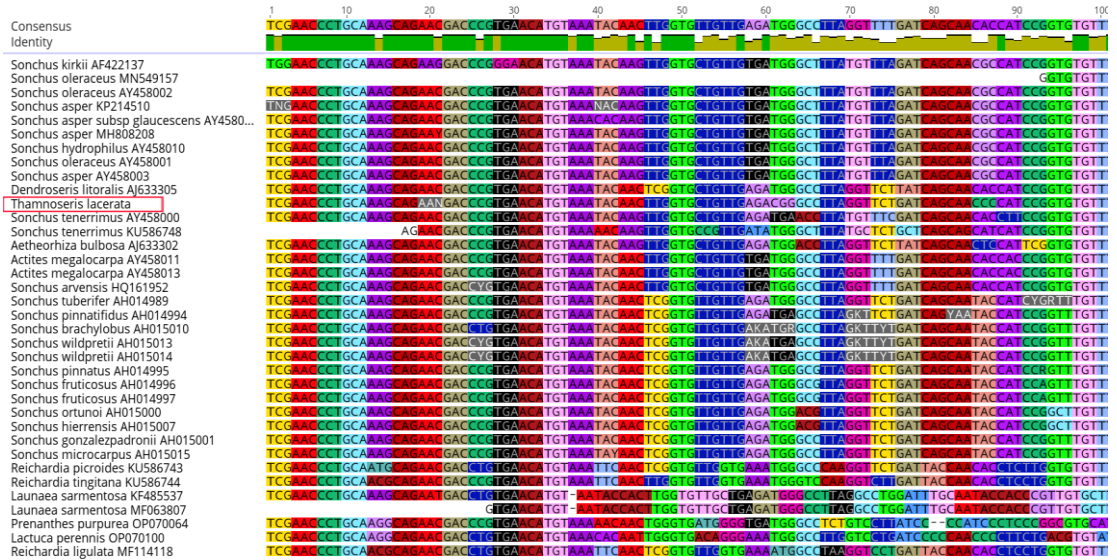


Figura 4: Alineamiento de las 36 secuencias seleccionadas del estudio de la región ITS, donde se observan los primeros 100 sitios de la alineación. *T. lacerata* se observa encerrada en rojo. Ilustración de Geneious prime (versión 2023.0 Biomatters).

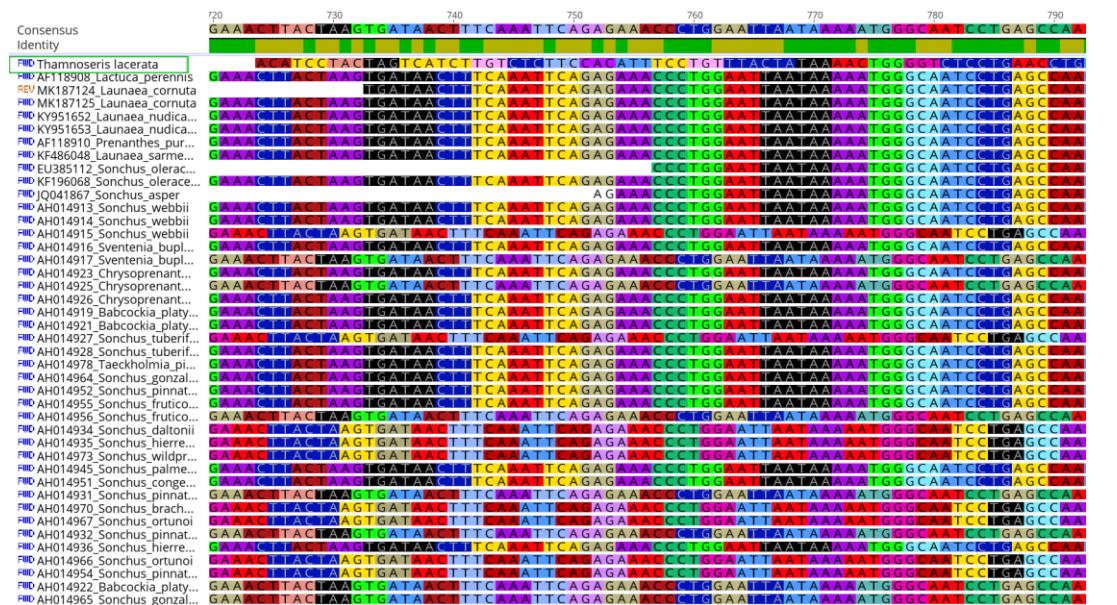


Figura 5: Alineamiento de las 42 secuencias seleccionadas del estudio de la región *trnL-F*, donde se observan 72 sitios de la alineación. *T. lacerata* se observa con encerrada en verde. Ilustración de Geneious prime (versión 2023.0 Biomatters).

Análisis filogenético de ITS

La topología general que representa los linajes de Hyoseridinae a partir de secuencias de la región ITS analizadas con máxima verosimilitud se asemeja a la obtenida por inferencia bayesiana (Figs. 6-7). En el análisis, el grupo interno tiene soporte de 100% y dentro de éste, los clados de los géneros *Reichardia* y *Launaea* están fuertemente apoyados por soporte estadístico (100% bootstrap y 1 probabilidad posterior).

En ambas topologías se pueden observar un gran clado de alto soporte (97% bootstrap y 1 probabilidad posterior) que alberga dos clados (I y II en las Fig. 6-7) que incluyen las especies del género *Sonchus* con alto soporte estadístico (100% y 98% bootstrap y 1 probabilidad posterior para ambos). Las especies de *Sonchus* exóticas en Chile: *S. tenerrimus*, *S. oleraceus* y *S. asper* se encuentran fuertemente anidadas en el clado *Sonchus* II. Sin embargo, *S. arvensis*, se encuentra en un clado mejor soportado con *Actites megalocarpa* (99% bootstrap y 1 probabilidad posterior).

Finalmente, los árboles filogenéticos indican que *Thamnosseris lacerata* se encuentra en un clado altamente soportado junto a *Dendroseris litoralis* (94% bootstrap y 1 probabilidad posterior). A pesar de ello, este clado no se resuelve en cuanto a su relación con las especies *A. megalocarpa* y *S. arvensis* (53% bootstrap y 0.78 probabilidad posterior). No obstante, la evidencia de ITS muestra que *T. lacerata* se encuentra dentro de un clado que compone a varias especies de *Sonchus* con fuerte soporte estadístico (97% bootstrap y 1 probabilidad posterior).



Figura 6: Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en secuencia de rADN de la región ITS para las especies de la subtribu Hyoseridinae. Los apoyos de valores bootstrap (%) se encuentran sobre las ramas. Los números romanos I y II corresponden a dos clados del género *Sonchus* diferenciados. La especie de estudio (*Thamnosерis lacerata*) se representa en color rosado y la rama celeste corresponde a un clado altamente soportado (94% bootstrap) que incluye a *Dendroseris litoralis*. Las secuencias adicionales incorporadas de la misma especie son señaladas como “-2” y “-3”.

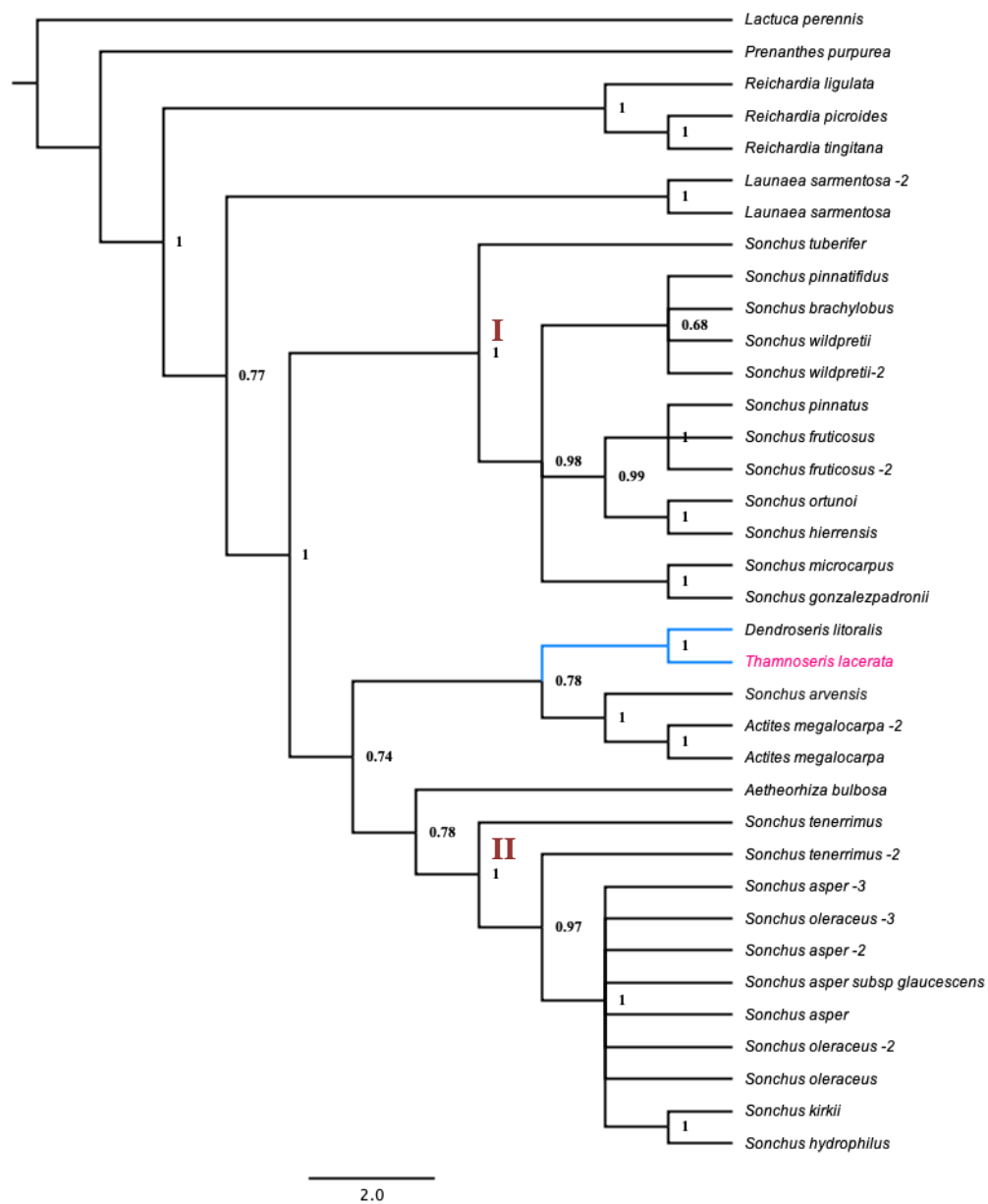


Figura 7: Árbol filogenético de inferencia bayesiana basado en secuencias de rADN de la región ITS para las especies de la subtribu Hyoseridinae. Los valores de probabilidad posterior se encuentran sobre las ramas en cada nodo. Los números romanos I y II corresponden a dos clados del género *Sonchus* diferenciados. La especie de estudio (*Thamnosericis lacerata*) se representa en color rosado y la rama celeste corresponde a un clado altamente soportado (1 probabilidad posterior) que incluye a *Dendroseris litoralis*. Las secuencias adicionales incorporadas de la misma especie son señaladas como “-2” y “-3”.

Análisis filogenético de *trnL-F*

La topología general que representa los linajes de Hyoseridinae de secuencias de la región *trnL-F* de máxima verosimilitud también se asemeja a la obtenida por inferencia bayesiana al igual que los resultados recabados en la región ITS (Figs. 8-9). En ambas topologías, el género *Launaea* está representado en un mismo clado con alto soporte estadístico (99% y 98% bootstrap y 1 probabilidad posterior para ambos), no obstante, la relación entre estos clados y el resto del grupo interno no está clara por falta de soporte.

El grupo interno restante forma un clado altamente soportado que incluye a los géneros *Sventenia*, *Chrysoprenanthes*, *Babcockia*, *Taeckholmia*, así como a las especies de *Sonchus* y *Thamnoseris lacerata* (86% bootstrap y 0.97 probabilidad posterior). Si bien, en el análisis de máxima verosimilitud, *T. lacerata* aparece en una única rama que no tiene relación con las demás especies del grupo interno por falta de soporte, sin embargo, está incluida en un clado amplio bien soportado (86% bootstrap), lo que también se refleja a partir de inferencia bayesiana, donde se puede ver que *T. lacerata* se encuentra con *Sonchus* en un clado bien soportado (0.97 probabilidad posterior).

Con respecto a las especies exóticas de *Sonchus*, *S. asper* y *S. oleraceus*, en ambos árboles filogenéticos aparecen en un clado con alto soporte (99% bootstrap y 1 probabilidad posterior), que si bien parece no estar resuelto en cuanto a su relación con *Chrysoprenanthes pendula* (56% bootstrap y 0.69 probabilidad posterior), este clado está dentro de un *Sonchus* más amplio con fuerte soporte estadístico (86% bootstrap y 0.97 probabilidad posterior).

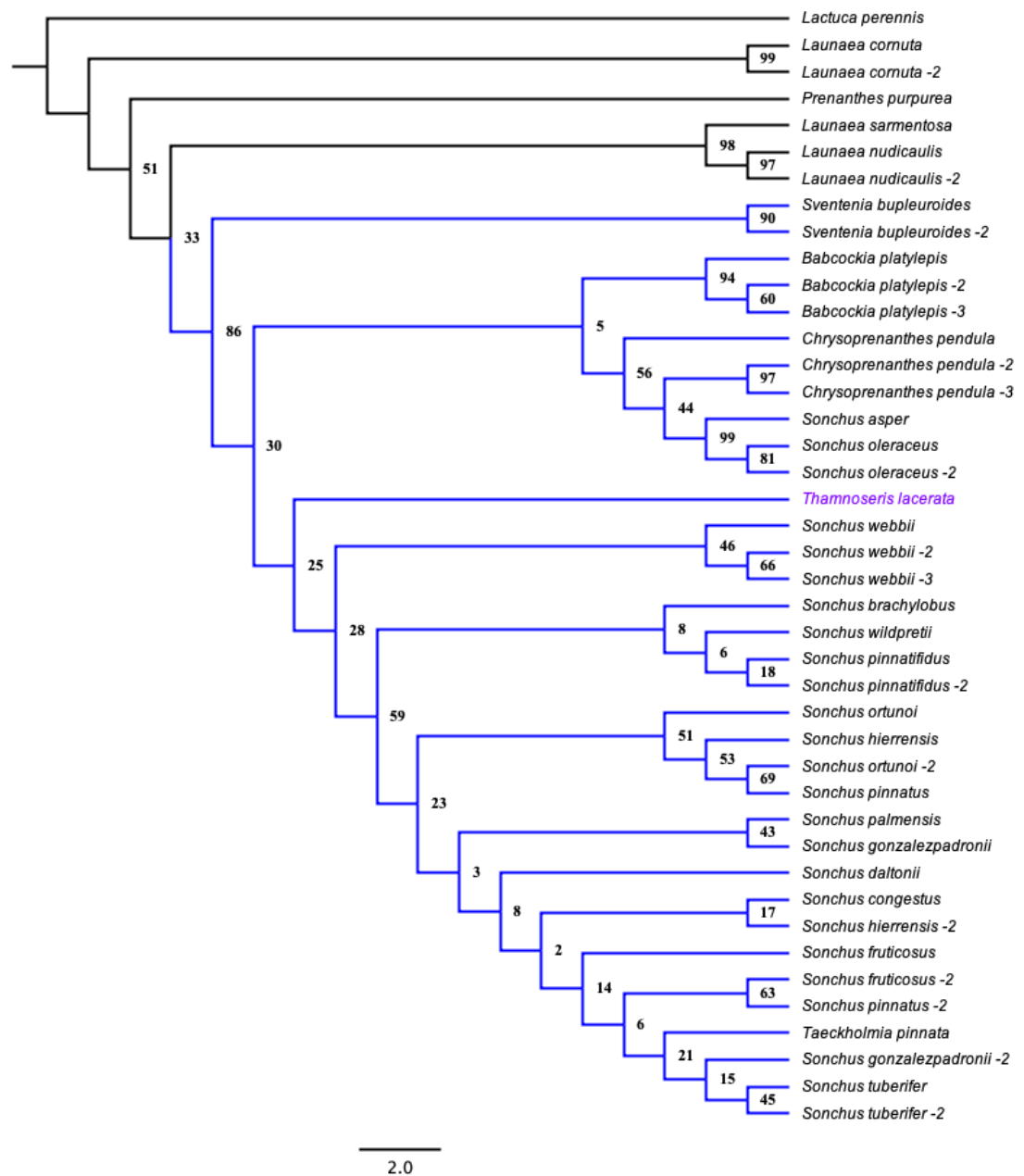


Figura 8: Árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en secuencia de cpADN de la región *trnL-F* para las especies de la subtribu Hyoseridinae. Los apoyos de valores bootstrap (%) se encuentran sobre las ramas. La especie de estudio (*Thamnoseric lacerata*) se representa en color morado y las ramas en azul corresponden a un clado bien soportado (86% bootstrap) de *Sonchus*. Las secuencias adicionales incorporadas de la misma especie son señaladas como “-2” y “-3”.

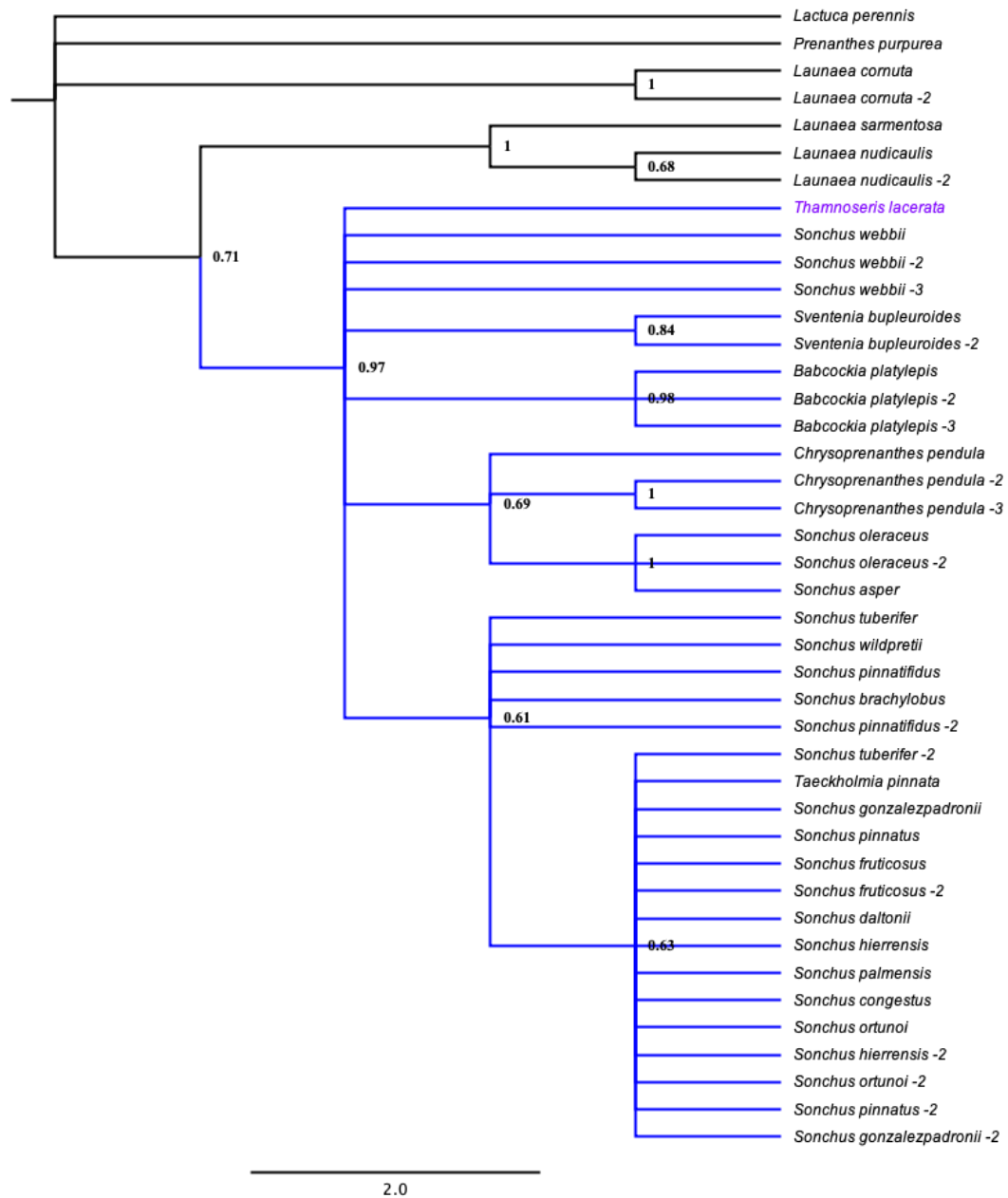


Figura 9: Árbol filogenético de inferencia bayesiana basado en secuencias de cpADN de la región *trnL-F*. Los valores de probabilidad posterior se encuentran sobre las ramas en cada nodo. La especie de estudio (*Thamnosseris lacerata*) se representa en color morado y las ramas en azul corresponden a un clado bien soportado (0.97 probabilidad posterior) de *Sonchus*. Las secuencias adicionales incorporadas de la misma especie son señaladas como “-2” y “-3”.

Análisis concatenado de ITS y *trnL-F*

En análisis de la matriz concatenada de ITS y *trnL-F* (Figs. 10-11), identificó un clado altamente soportado de *Sonchus* (83% bootstrap y 0.99 de probabilidad posterior). Sin embargo, al igual que el análisis independiente de cada marcador, las relaciones dentro de *Sonchus* son muy débiles y en general, sólo se distingue algunos clados bien soportados.

El clado *T. lacerata* – *D. litoralis* se encuentra bien apoyado tanto por máxima verosimilitud como por inferencia bayesiana (94% bootstrap y 1 probabilidad posterior), al igual que el análisis de datos independientes de ITS (94% bootstrap). Una diferencia llamativa, es el soporte entregado a la relación de este clado con *S. arvensis* – *A. megalocarpa*, pues la evidencia de datos combinados mejora la resolución y el apoyo de la relación de ambos clados (77% bootstrap y 0.99 probabilidad posterior).

Finalmente, a diferencia de *S. arvensis*, las demás especies de *Sonchus* exóticas en Chile (*S. asper*, *S. oleraceus* y *S. tenerrimus*) se encuentra en un clado junto a *S. kirkii* y *S. hydrophilus* con alto soporte estadístico (85% bootstrap y 1 probabilidad posterior).



Figura 10: Árbol filogenético de máxima verosimilitud de Hyoseridinae basado en conjunto de datos combinados de las regiones ITS y *trnL-F*. Los apoyos de valores bootstrap (%) se encuentran sobre las ramas. Las ramas del clado de interés se representan en color naranja y la especie de estudio (*Thamnoseris lacerata*) en rosado para facilitar su identificación. Las secuencias adicionales incorporadas de la misma especie son señaladas como “-2” y “-3”.

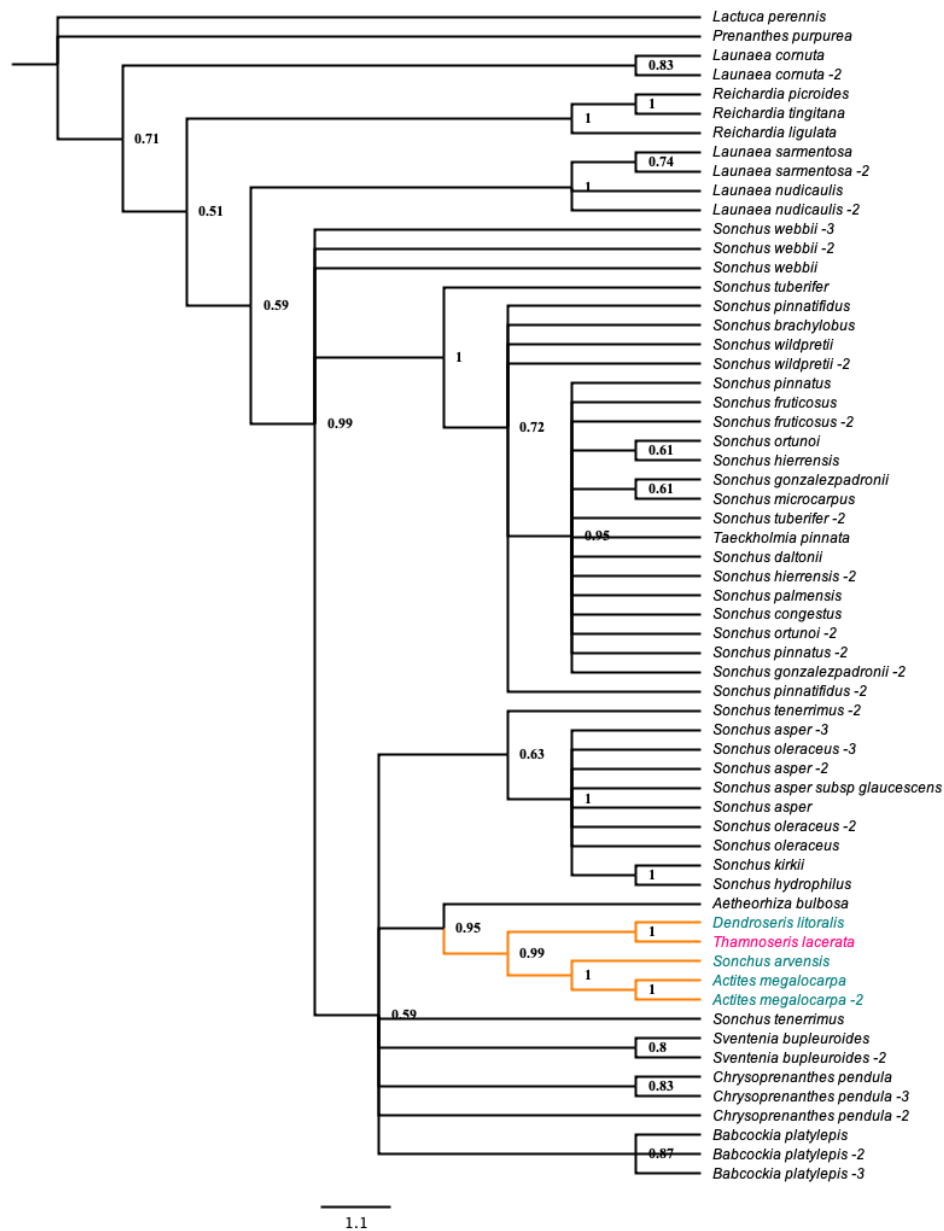


Figura 11: Árbol filogenético de inferencia bayesiana de Hyoseridinae basado en conjunto de datos combinados de las regiones ITS y *trnL-F*. Los valores de probabilidad posterior se encuentran sobre las ramas en cada nodo. Las ramas del clado de interés se representan en color naranja y la especie de estudio (*Thamnoseris lacerata*) en rosado para facilitar su identificación. Las secuencias adicionales incorporadas de la misma especie son señaladas como “-2” y “-3”.

DISCUSIÓN

Posición filogenética de *Thamnosericis lacerata*

Los resultados de ITS y *trnL-F* respaldan la sugerencia de Kim y Mejías (2012), descifrando con evidencia molecular una observación que numerosos autores se han planteado hace décadas. El ADN de *Thamnosericis lacerata* confirma que se encuentra dentro de Hyoseridinae, en el clado *Sonchus sensu lato* (s.l.) altamente soportado, por lo tanto, probablemente evolucionó dentro de *Sonchus*. No obstante, la relación de *T. lacerata* dentro de este clado se encuentra poco resuelta, y no existe claridad del parentesco con las alianzas de *Sonchus*. Un segundo hallazgo importante observado a partir de la región de ITS, es la relación de *T. lacerata* y *D. litoralis*, ya que la evidencia muestra que son especies hermanas con alto soporte a partir de ambos análisis estadísticos. Investigaciones previas han identificado al género *Dendroseris* como grupo monofilético (Crawford y col., 1992; Sang y col., 1994), lo que sugiere que *T. lacerata* podría ser un grupo hermano de *Dendroseris*. Sin embargo, este resultado debe ser interpretado con cautela ya que sólo se evidenció a partir de una especie del género *Dendroseris*. Además, el estudio de la región *trnL-F* no contiene ninguna especie de *Dendroseris* que pueda respaldar este resultado.

La posibilidad de representar los árboles filogenéticos de este estudio a partir de filogramas, permitió evidenciar una rama pronunciada en longitud de *T. lacerata* en comparación a las demás especies a partir de la región *trnL-F* (Ver Anexo: Fig. A2). Esta rama larga se puede atribuir a diferencias en las secuencias nucleotídicas de *T. lacerata* y su ancestro más reciente junto a las especies cercanas, donde las diferencias en las secuencias se manifiestan como un aumento en la longitud de la

rama de la especie. Por el contrario, el análisis de ITS no evidenció un largo importante en la rama de *T. lacerata* (Ver Anexo: Fig. A3). Una explicación tentativa, tiene que ver con la existencia de *D. litoralis* en el análisis filogenético. Dado que existe menor cantidad de cambios en las secuencias nucleotídicas entre ambas especies y su ancestro en común, esto se evidencia como una rama de longitud más acotada. Por lo tanto, habrá que incorporar tanto a *D. litoralis* como a otras especies de este género en el estudio de marcadores del cloroplasto y del núcleo para así ahondar y comprender mejor esta evidencia.

Relación entre *Thamnosseris lacerata* y especies exóticas de *Sonchus* en Chile

Como se mencionó con anterioridad, los resultados obtenidos no pueden explicar adecuadamente la relación entre *T. lacerata* y las especies de *Sonchus*, y por lo tanto, la relación de esta especie insular con las especies continentales exóticas de Chile no logra resolverse. La falta de apoyo filogenético para determinar el origen del clado *T. lacerata* – *D. litoralis* es un hallazgo coincidente con estudios anteriores que incluían solamente al clado *Dendroseris*, ya que el uso de regiones nucleares y plastidiales codificantes y no codificantes, ha sido insuficiente para proporcionar relaciones filogenéticas consistentes entre *Dendroseris* y grupos de *Sonchus* estrechamente relacionados (Sang y col., 1994; Kim y col., 1996a, 1996b, 1999, 2007; Lee y col., 2005). Aun cuando la tendencia de los estudios anteriores muestran que *Dendroseris* comparte un ancestro en común más reciente con las especies de *Sonchus* subg. *Sonchus*, como *S. arvensis*, y *Sonchus asper* var. *megalocarpa* (= *Actites megalocarpa*), esta relación no ha presentado buen soporte estadístico, resultado que es coincidente con lo observado en este estudio (Kim y col., 2007; Kim y col., 1996a, 1996b). Un acontecimiento interesante, es el resultado

del análisis concatenado de ITS y *trnL-F* puesto que tanto análisis de máxima verosimilitud como de inferencia bayesiana apoyan la relación de los clados *T. lacerata* – *D. litoralis* y *S. arvensis* – *A. megalocarpa*, lo que podría significar una primera aproximación para comprender el origen de *T. lacerata*. Sin embargo, debido a que no se obtuvieron secuencias de *A. megalocarpa* y *S. arvensis* para la región del cloroplasto, este resultado debe ser tomado con prudencia, ya que la obtención de secuencias de las especies de dicha región pueden mostrar hallazgos particulares en los datos independientes o bien, fortalecer la resolución en los datos combinados.

Las especies *S. asper* y *S. oleraceus* incluidas tanto en el análisis de ITS como en el de *trnL-F* muestran que se encuentran bien soportadas dentro de *Sonchus sensu lato*, al igual que *S. tenerrimus* y *S. arvensis*, aunque estas últimas solamente fueron observadas a partir del estudio de ITS. Sin embargo, la evidencia aportada por los datos combinados (Fig. 10) muestra que a excepción de *S. arvensis*, las demás especies (*S. asper*, *S. oleraceus* y *S. tenerrimus*) se encuentran dentro de un mismo clado bien soportado con otras dos especies de *Sonchus* (*S. kirkii* y *S. hydrophilus*). Aun cuando el análisis de BLAST mostró alta similitud entre las secuencias de *Thamnosseris lacerata* obtenidas con ITS4, ITS5 y *trnL* con las especies exóticas de *Sonchus* en Chile, no existe apoyo filogenético para aportar en la relación de *T. lacerata* con las especies de *Sonchus*, a excepción de afirmar que se encuentra dentro de *Sonchus* s.l. y que existiría una relación más cercana con *S. arvensis*.

Una metodología filogenética que incorpore una mayor cantidad de datos moleculares podría proporcionar una resolución más precisa sobre la identidad de los linajes cercanos a *T. lacerata*. El muestreo o selección de una mayor cantidad de especies también podría ayudar a resolver la incertidumbre sobre la relación de *T.*

lacerata y las especies de *Sonchus*, ya que, la incorporación de posibles especies hermanas de un linaje en particular podría entregar pruebas sólidas sobre sus parientes cercanos (Baldwin y col., 1998). Igualmente, una aproximación metodológica diferente, como por ejemplo la utilización de datos genómicos podría aumentar la resolución filogenética. Un estudio de secuencias completas del plastoma revelaron una mejor resolución entre *Dendroseris* y tres linajes principales dentro de *Sonchus*, donde se observó una relación de parentesco entre *Dendroseris*, *S. asper* y *S. oleraceus* altamente soportada (Cho y col., 2020). Por lo tanto, pruebas filogenéticas con más datos moleculares podrían resolver la relación de *T. lacerata* y las especies exóticas de *Sonchus* en Chile.

Procesos de hibridación ancestral entre ITS y *trnL-F*

A pesar de que eventos de introgresión y polimorfismo ancestral han sido estudiados como posibles patrones evolutivos en Hyoseridinae (e.g., Lee y col., 2005; Cho y col., 2022), este estudio no logró revelar fenómenos de hibridación ancestral, debido a la escasa resolución de la filogenia de cpADN de los clados que podrían haber marcado diferencias con la región ITS lo que limitó la evaluación de posibles fenómenos de hibridación o introgresión en esta filogenia.

Es importante señalar que esta limitación está asociada a la información disponible en la base de datos GenBank, dado que, aunque se buscó las mismas especies para ambos análisis, solo se descargaron aquellas secuencias de las especies que se encontraban disponibles. Por lo tanto, será necesario en un escenario futuro, aumentar el número de secuencias de *trnL-F* y secuenciar las mismas especies que componen el análisis de ITS, así como aumentar el número de

genes y eventualmente realizar análisis comparativos que permitan observar posibles incongruencias que podrían revelar patrones de hibridación ancestral.

CONCLUSIÓN

Este estudio aporta aspectos importantes sobre la posición filogenética de *Thamnosericis lacerata* contribuyendo al conocimiento de su historia evolutiva. La obtención de las primeras secuencias de regiones específicas de rADN y cpADN desarrolladas en este trabajo, respaldan las sugerencias de Mejías y Kim (2012), ya que tanto el análisis de datos independientes como de datos concatenados confirman la posición filogenética de *T. lacerata* dentro de *Sonchus* s.l. en Hyoseridinae. Adicionalmente, a partir de una región nuclear se ha logrado una resolución parcial de la relación *Thamnosericis* – *Dendroseris*, ya que en este estudio se indica que *T. lacerata* es un grupo hermano de *D. litoralis*. No obstante, se requiere contar con un mayor número de especies de *Dendroseris* para obtener resultados más robustos y así confirmar este parentesco.

A futuro será necesario adquirir datos de secuencias adicionales de más especies de Hyoseridinae para evaluar la relación de *T. lacerata* y las alianzas de *Sonchus*. Adicionalmente se podrían incluir nuevos estudios de regiones génicas que permitan aumentar la robustez del análisis filogenético. Tras la adquisición de nuevas regiones génicas y secuencias de especies adicionales, los estudios futuros podrían resolver interrogantes tales como la corroboración del clado *Thamnosericis* – *Dendroseris*, el origen y relaciones filogenéticas de dicho clado, la relación de *T. lacerata* con las especies de *Sonchus* exóticas que habitan actualmente en Chile y la posibilidad de evidenciar fenómenos ancestrales en la historia evolutiva de este taxon. Incluso, sería interesante reexaminar la posición filogenética con diferentes técnicas o marcadores moleculares, lo cual daría cuenta de una resolución robusta

que pueda respaldar la posición filogenética de *T. lacerata* determinada en este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, J.M., Salariato, D.L. & Cialdella, A.M. 2016. Molecular Phylogeny and Morphological Analysis of *Tetraglochin* (Rosaceae: Rosoideae: Sanguisorbeae) and Recognition of the New Species *T. andina*. *Systematic Botany*, **41**: 839-850.
- Arif, I.A., Bakir, M.A., Khan, H.A., al Farhan, A.H., al Homaidan, A.A., Bahkali, A.H., al Sadoon, M. & Shobrak, M. 2010. A brief review of molecular techniques to assess plant diversity. *International Journal of Molecular Sciences*, **11**: 2079-2096.
- Baldwin, B.G., Crawford, D.J., Francisco-Ortega, J., Kim, S.-C., Sang, T. & Stuessy, T. F. 1998. Molecular Phylogenetic Insights on the Origin and Evolution of Oceanic Island Plants. En P. S. Soltis, D. E. Soltis and J. J. Doyle, *Molecular Systematics of Plants II* (eds.), 410-441 pp.
- Bremer, K. 1993. New subtribes of the Lactuceae (Asteraceae). *Novon*, **3**: 328-330.
- Bremer, K., 1994. *Asteraceae: cladistics and classification*. Timber Press, Portland.
- Cho, M.S., Kim, S.H., Yang, J.Y., Crawford, D.J., Stuessy, T.F., López-Sepúlveda, P. & Kim, S. C. 2020. Plastid Phylogenomics of *Dendroseris* (Cichorieae; Asteraceae): Insights Into Structural Organization and Molecular Evolution of an Endemic Lineage From the Juan Fernández Islands. *Frontiers in Plant Science*, **11**: 594272.
- Cho, M.S., Yang, J.Y., Mejías, J.A. & Kim, S.-C. 2022. Phylogenomic insight into dysploidy, speciation, and plastome evolution of a small Mediterranean genus *Reichardia* (Cichorieae; Asteraceae). *Scientific Reports*, **12**(1).
- Clegg, M.T., Gaut, B.S., Learn Jr., G.H. & Morton, B.R. 1994. Rates and patterns of chloroplast ADN evolution (chloroplast ADN/ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/plant evolution/evolutionary rates) 15th International Botanical Congress. <https://www.pnas.org>. **91**: 6795-6801.
- Crawford, D.J., Stuessy, T.F., Cosner, M.B., Haines, D.W., Silva, M. & Baeza, M. 1992. Evolution of the Genus *Dendroseris* (Asteraceae: Lactuceae) on the Juan Fernandez Islands: Evidence from Chloroplast and Ribosomal ADN. *Source: Systematic Botany*, **17**: 676-682

- Crawford, D.J. 2000. Plant macromolecular systematics in the past 50 years: one view. *Taxon*, **49**: 479-501.
- Escobar, J.S., Scornavacca, C., Cenci, A., Guilhaumon, C., Santoni, S., Douzery, E. J.P., Ranwez, V., Glémin, S. & David, J. 2011. Multigenic phylogeny and analysis of tree incongruences in Triticeae (Poaceae). *BMC Evolutionary Biology*, **11**: 181.
- Fehrer, J., Gemeinholzer, B., Chrtek, J. & Bräutigam, S. 2007. Incongruent plastid and nuclear ADN phylogenies reveal ancient intergeneric hybridization in *Pilosella* hawkweeds (Hieracium, Cichorieae, Asteraceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **42**: 347-361.
- García, N., Cuevas, C., Sepúlveda, J.E., Cádiz-Véliz, A. & Román, M.J. 2022. Two new species of *Miersia* and their phylogenetic placements alongside the recently described *M. putaendensis* (Gilliesieae, Allioideae, Amaryllidaceae). *PhytoKeys*, **211**: 107-124.
- Hillis, D.M. & Bull, J.J. 1993. An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic Biology*, **42**: 182-192.
- Jeffrey, C. 1966. Notes on Compositae: I. The Cichorieae in east tropical Africa. *Kew Bull*, **18**: 427-486.
- Jansen, R.K., Michaels, H.J. & Palmer, J.D., 1991. Phylogeny and character evolution in the Asteraceae based on chloroplast ADN restriction site mapping. *Systematic Botanic*, **16**: 99-115.
- Kilian, N., Gemeinholzer, B. & Lack, W.L. 2009. Cichorieae – In Funk, V. A. Susanna, A., Stuessy, T. F & Bayer, R. J. (eds), *Systematics, evolution and biogeography of Compositae*: 343-383 pp. International Association for Plant Taxonomy, Vienna.
- Kim, S.C., Crawford, D.J. & Jansen, R.K. 1996a. Phylogenetic relationships among the genera of the subtribe Sonchinae (Asteraceae): evidence from ITS sequences. *Systematic Botany*, **21**: 417-432.
- Kim, S.C., Crawford, D.J., Francisco-Ortega, J. & Santos-Guerra-Source, A. 1996b. A Common Origin for Woody *Sonchus* and Five Related Genera in the Macaronesian Islands: Molecular Evidence for Extensive Radiation, **93**(15): 7743-8.

- Kim, S.-C., Crawford, D.J., Jansen, R.K. & Santos-Guerra, A. 1999. The use of a non-coding region of chloroplast ADN in phylogenetic studies of the subtribe Sonchinae (Asteraceae: Lactuceae). *Plant Systematic and Evolution*, **215**: 85-99.
- Kim, S. C., Chunghee, L. & Mejías, J. A. 2007. Phylogenetic analysis of chloroplast ADN matK gene and ITS of nrADN sequences reveals polyphyly of the genus *Sonchus* and new relationships among the subtribe Sonchinae (Asteraceae: Cichorieae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **44**(2): 578-597.
- Knowles, L.L. 2009. Estimating species trees: methods of phylogenetic analysis when there is incongruence across genes. *Systematic Biology*, **58**: 463-467.
- Kuschel, G. 1963. Composition and relationship of the terrestrial faunas of Easter, Juan Fernandez, Desventuradas and Galapagos Islands. *Occasional Papers of the California Academy of Sciences*, **44**: 79-95.
- Lack, H.W. 2007. Cichorieae – En: Kadereit K.W. & Jeffrey, C. (eds), *The families and genera of vascular plants*, **8**: 180-199. Springer-Verlag, Berlin.
- Larsson, A. 2014. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large data sets. *Bioinformatics*, **30**(22): 3276-3278.
- Lee, J. & Baldwin, B.G., 2004. Subtribes of principally north American genera of Cichorieae (Compositae). *Novon*, **14**: 309-313.
- Lee, C., Kim, S.-C., Lundy, K. & Santos-Guerra, A. 2005. Chloroplast ADN phylogeny of the Woody *Sonchus* alliance (Asteraceae: Sonchinae) in the Macaronesian Islands. *American Journal of Botany*, **92**(12): 2072-2085.
- Mayuzumi, S. & Ohba, H. 2004. The phylogenetic position of eastern Asian sedoideae (Crassulaceae) inferred from chloroplast and nuclear ADN sequences. *Systematic Botany*, **29**(3): 587-598.
- Mejías, J. A. & Kim, S.C. 2012. Taxonomic treatment of Cichorieae (Asteraceae) endemic to the Juan Fernández and Desventuradas Islands (SE Pacific). *Annales Botanici Fennici*, **49**: 171-178.
- Ministerio del Medio Ambiente (2016). Ficha de Antecedentes de la especie *Thamnoseric lacerata* (Phil.) F. Phil. Recuperado el 11 de Junio de:

https://clasificacionespecies.mma.gob.cl/wp-content/uploads/2019/10/Thamnosseris_lacerata_FIN_13RCE.pdf

Olmstead, R.G. & Palmer, J.D. 1994. Chloroplast ADN Systematics: A Review of Methods and Data Analysis. Source: American Journal of Botany, **81**(9): 1205-1224.

Qiu, Y.L., Lee, J., Bernasconi-Quadroni, F., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Zonis, M., Zimmer, E.A., Chen, Z., Sauolainen, V. & Chase, M.W. 1999. The earliest angiosperms: evidence from mitochondrial, plastid, and nuclear genomes. Nature, **402**: 404-407.

Rieseberg, L.H. & Brunsfeld, S.J. 1998. 7 Molecular Evidence and Plant Introgression. En P. S. Soltis, D. E. Soltis and J. J. Doyle (eds.), Molecular Systematics of Plants II. pp. 151-176.

Rieseberg, L.H., Baird, S.J.E. & Gardner, K.A. 2000. Hybridization, introgression, and linkage evolution. Plant Molecular Biology, **42**: 205-224

Rivera, J. 1999. Las Islas Desventuradas. Revista de Marina, **3**: 269.

Rodríguez, R., Marticorena, C., Alarcón, D., Baeza, C., Cavieres, L., Finot, V.L., Fuentes, N., Kiessling, A., Mihoc, M., Pauchard, A., Ruiz, E., Sanchez, P., Marticorena, A., & Bot, G. 2018. Catalogue of the vascular plants of Chile. Gayana Botanica, **75**(1): 1-430.

Ronquist, F., & Huelsenbeck, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. Bioinformatics, **19**(12): 1572-1574.

Sang, T., Crawford, D.J., Kim, S.-C. & Stuessy, T.F. 1994. Radiation of the endemic genus *Dendroseris* (Asteraceae) on the Juan Fernandez Islands: Evidence from sequences of the ITS regions of nuclear ribosomal ADN. American Journal of Botany, **81**: 1494-1501.

Small, R.L., Cronn, R.C. & Wendel, J.F. 2004. Use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants. Australian Systematic Botany, **17**: 145-170.

Soltis, P.S., Soltis, D.E. & Chase, M.W. 1999. Angiosperm phylogeny inferred from multiple genes as a tool for comparative biology. Nature, **402**: 402-404.

Stebbins, G.L. 1953. A new classification of the tribe Cichorieae, family Compositae. *Madroño*, **12**: 65-81.

Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. & Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast ADN. *Plant Molecular Biology*, **17**: 1105-1109.

Terán, D. & Vilches, M. 2020. Expedición Desventuradas: Una bitácora ornitológica hacia la Isla de San Ambrosio. *La Chiricoca*, **25**: 28-44.

Wendel, J.F. & Doyle, J.J. 1998. Phylogenetic Incongruence: Window into Genome History and Molecular Evolution. En P.S. Soltis, D.E. Soltis and J.J. Doyle (eds.), *Molecular Systematics of Plants II*. pp. 265-296. Kluwer, Dordrecht.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En *PCR Protocols* (eds.), pp. 315-322.

Whitton, J., Wallace, R.S. & Jansen, R.K. 1995. Phylogenetic relationships and patterns of character change in the tribe Lactuceae (Asteraceae) based on chloroplast ADN restriction site variation. *Canadian Journal of Botany*, **73**: 1058–1073.

Wolfe, K.H., Li, W.H., & Sharp, P.M. 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear ADNs (plant molecular evolution/molecular clock/mutation rate/organelle ADN/inverted repeat). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**: 9058-8.

ANEXO

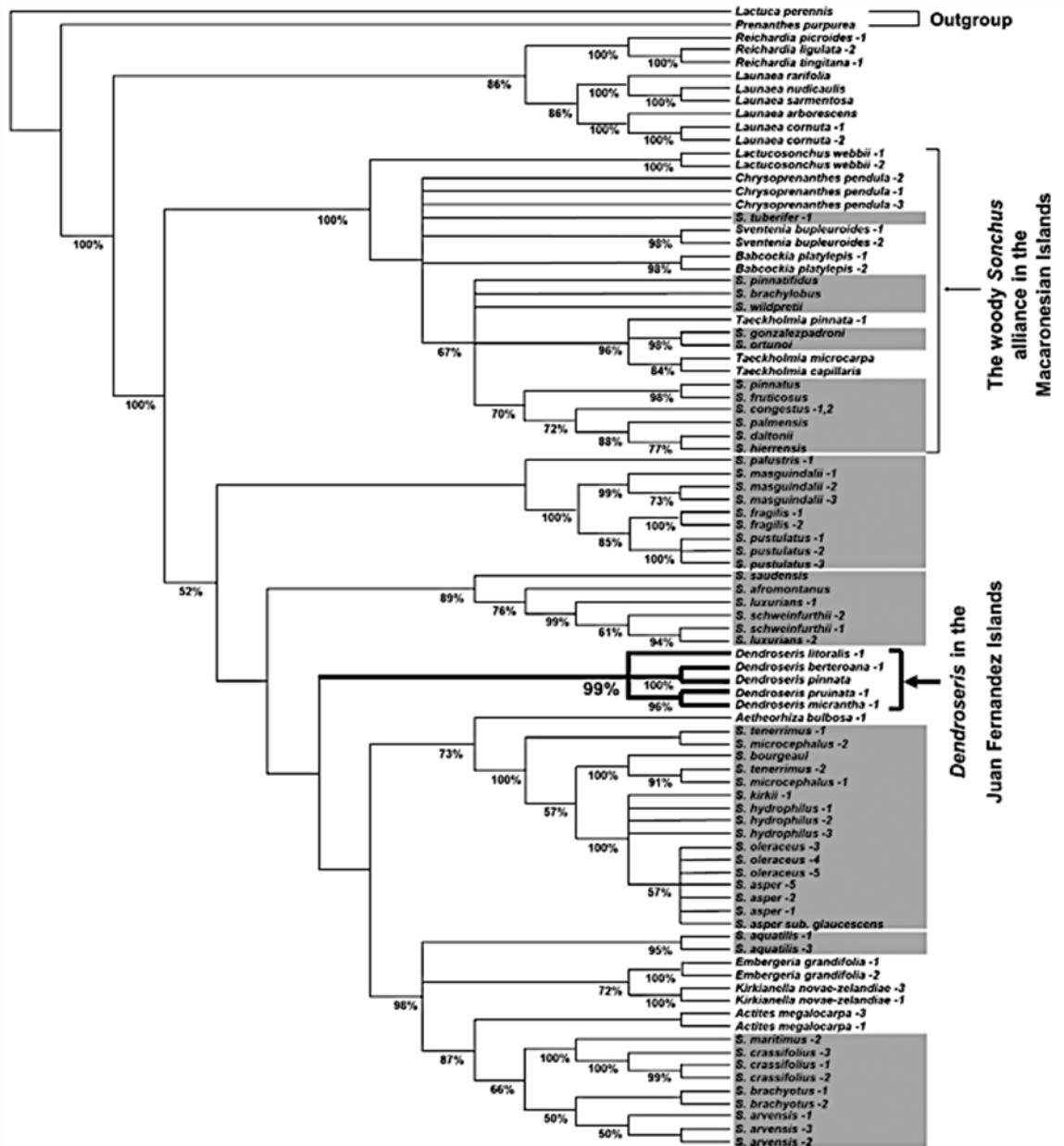


Figura A1: Árbol de consenso estricto de *Sonchus sensu lato* basado en el conjunto de datos combinado de ITS y cpADN de Mejías y Kim (2012).

Tabla A1: Números de accesoión de GenBank de las especies seleccionadas para el estudio de la región ITS y *trnL-F*. “/” separa las secuencias en el caso de que se incorpore más de una en el análisis.

Especie	Numero de accesoión GenBank	
	ITS1-ITS2	<i>trnL-F</i>
<i>Lactuca perennis</i>	OP070100	AF118908
<i>Prenanthes purpurea</i>	OP070064	AF118910
<i>Reichardia picroides</i>	KU586743	-
<i>Reichardia ligulata</i>	MF114118	-
<i>Reichardia tingitana</i>	KU586744	-
<i>Launaea sarmentosa</i>	MF063807 / KF485537	KF486048
<i>Launaea nudicaulis</i>	-	KY951653 / KY951652
<i>Launaea cornuta</i>	-	MK187125 / MK187124
<i>Chrysoprenanthes pendula</i>	-	AH014926 / AH014925 / AH014923
<i>Sonchus tuberifer</i>	AH014989	AH014928 / AH014927
<i>Sventenia bupleuroides</i>		AH014916 / AH014917
<i>Babcockia platylepis</i>		AH014919 / AH014921 / AH014922
<i>Sonchus pinnatifidus</i>	AH014994	AH014931
<i>Sonchus brachylobus</i>	AH015010	AH014970 / AH014932
<i>Sonchus wildpretii</i>	AH015014 / AH015013	AH014973
<i>Taeckholmia pinnata</i>		AH014978
<i>Sonchus gonzalezpadroni</i>	AH015001	AH014964 / AH014965
<i>Sonchus ortunoi</i>	AH015000	AH014966 / AH014967
<i>Sonchus pinnatus</i>	AH014995	AH014952 / AH014954
<i>Sonchus fruticosus</i>	AH014997 / AH014996	AH014955 / AH014956
<i>Sonchus microcarpus</i>	AH015015	-
<i>Sonchus congestus</i>	-	AH014951
<i>Sonchus palmensis</i>	-	AH014945
<i>Sonchus daltonii</i>	-	AH014934
<i>Sonchus hierrensis</i>	AH015007	AH014935 / AH014936
<i>Sonchus palustris</i>	-	AH014912
<i>Dendroseris litoralis</i>	AJ633305	-
<i>Aetheorrhiza bulbosa</i>	AJ633302	-
<i>Sonchus tenerrimus</i>	AY458000 / KU586748	-
<i>Sonchus hydrophilus</i>	AY458010	-
<i>Sonchus kirkii</i>	AF422137	-
<i>Sonchus oleraceus</i>	MN549157 / AY458002 / AY458001	EU385112 / KF196068
<i>Sonchus asper</i>	AY458003 / KP214510 / MH808208	JQ041867

<i>Sonchus asper</i> subsp. <i>glaucescens</i>	AY458005	-
<i>Sonchus webbii</i>	-	AH014915 / AH014913 / AH014914
<i>Actites megalocarpa</i>	AY458013 / AY458011	-
<i>Sonchus arvensis</i>	HQ161952	-

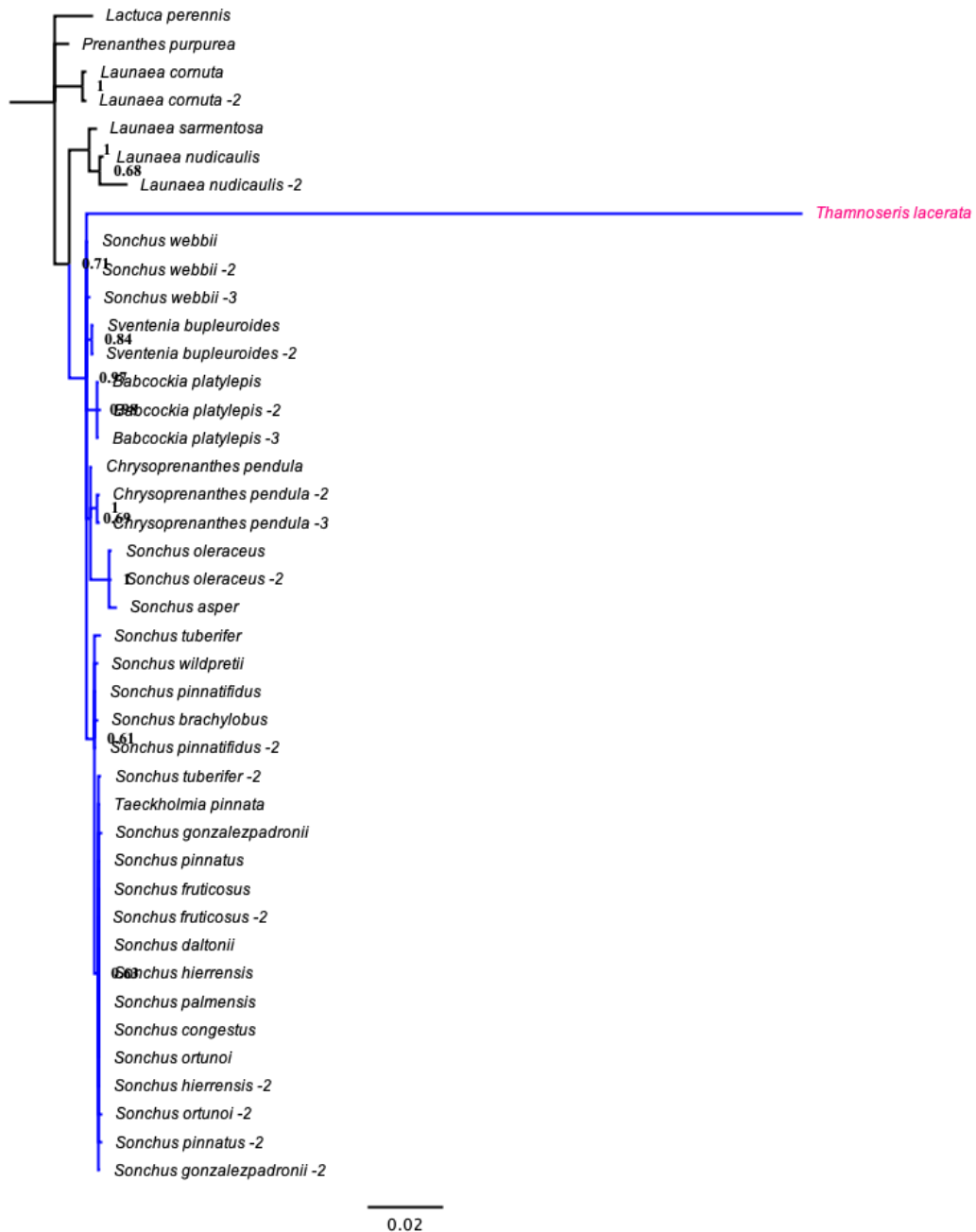


Figura A2: Árbol filogenético de inferencia bayesiana representado a partir de un filograma basado en secuencias de cpADN de la región *trnL-F*. La especie de estudio (*T. lacerata*) se representa en color rosado para facilitar su identificación.

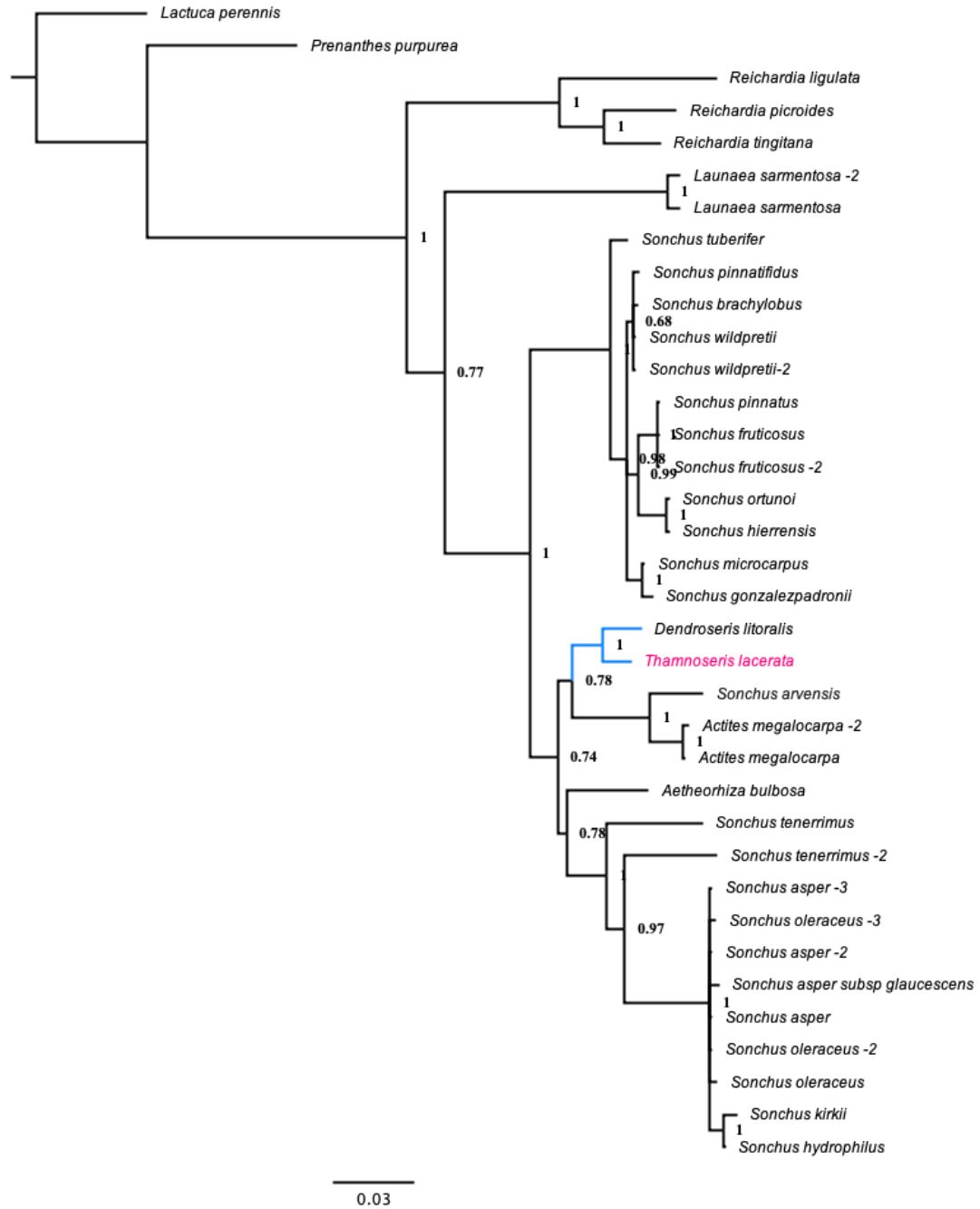


Figura A3: Árbol filogenético de inferencia bayesiana representado a partir de un filograma basado en secuencias de rADN de la región ITS. La especie de estudio (*T. lacerata*) se representa en color rosado para facilitar su identificación.