



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Reconstrucción filogenética del clado
Beaucarnea-Calibanus
(RUSCACEAE) basada en secuencias
ITS del nrDNA y un estudio M.E.B.
sobre adaptaciones foliares asociadas
a la pérdida de agua.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A

V A N E S S A R O J A S P I Ñ A



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM

DIRECTOR DE TESIS:
DR. MARK EARL OLSON ZUNICA

Empezar px

is, con mayusculas

2008



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.

Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno Rojas Piña Vanessa 55 24 73 57 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 40111620-3</p>
<p>2. Datos del tutor Dr. Mark Earl Olson Zunica</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Dr. José Alberto Burquez Montijo</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Dr. Carlos Martorell Delgado</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 M. en C. Julieta Alejandra Rosell García</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito. Reconstrucción filogenética del clado <i>Beaucarnea-Calibanus</i> (RUSCACEAE) basada en secuencias ITS del nrDNA y un estudio M.E.B. sobre adaptaciones foliares asociadas a la pérdida de agua. 136 p 2008</p>

A mi madre, por su apoyo incondicional, por siempre creer en mí y por ser un ejemplo de lucha y de logros.

A mi padre, por su cariño y por transmitirme ese gusto por el conocimiento.

A mi abuela, por brindarme siempre su apoyo y afecto.

A mi hermana, por su amistad y cariño y por siempre estar al pendiente de mí.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Mark Olson, por la dirección de este trabajo, por su gran apoyo, asesoría y entusiasmo.

Al proyecto CONACyT # 46475, "Diversificación de Angiospermas de México: Relojes Moleculares, Tasas de Especiación, Biomecánica y Espacios Ecológicos", gracias al cual fue posible mi tesis.

A todos los integrantes del sínodo, al Dr. Luis Eguiarte, al Dr. Alberto Burquez, al Dr. Carlos Martorell y a la M. en C. Julieta Rosell, por sus excelentes comentarios y sugerencias que hicieron de éste, un mejor trabajo.

A Leonardo Alvarado por sus detalladas revisiones y sus valiosas sugerencias; a Arturo de Nova por su gran ayuda en los análisis filogenéticos y a Martín Sánchez por su gran auxilio en diversos puntos de mi tesis y por su entusiasmo en aquellos momentos en que lo necesité.

A quienes hicieron y hacen posibles los laboratorios de Biología Molecular en donde desarrollé todo el trabajo molecular de mi tesis.

A Laura Márquez por su asesoría en las técnicas moleculares y por realizar la secuenciación automática de mis fragmentos de DNA, y a Marcelina García por su gran asesoría en las técnicas de extracción.

A Calixto León por realizar excelentes preparaciones foliares de las plantas con las que trabajé para los estudios de microscopía óptica.

A Berenit Mendoza del Laboratorio de Microscopía Electrónica por hacer posibles las microfotografías electrónicas de barrido de las hojas de mis plantas.

A la Dra. Patricia Feria por los datos de las variables bioclimáticas de las localidades de colecta de las plantas con las que trabajé.

A la Dra. Rebeca Aguirre por el Método Comparativo Filogenético que desarrolló y que utilicé en este trabajo.

A mis compañeros y amigos de cubículo, Laura, Angélica, Julieta y Leo, por su apoyo, comentarios y por los buenos ratos que pasamos juntos.

Al Instituto de Biología, UNAM, por permitirme realizar mi tesis y proporcionarme el apoyo necesario.

RESUMEN

I. INTRODUCCIÓN

- I.I LAS NOLINOIDES
- I.II EL CLADO *BEAUCARNEA-CALIBANUS*
- I.III IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL CLADO

II. ANTECEDENTES DEL PROYECTO

- II.I SINOPSIS HISTÓRICA DE *BEAUCARNEA* Y *CALIBANUS*
- II.II ESTUDIOS DE SISTEMÁTICA EN *BEAUCARNEA*
- II.III EL MARCADOR MOLECULAR
- II.VI ANÁLISIS Y RECONSTRUCCIÓN FILOGENÉTICA

III. OBJETIVOS

IV. HIPÓTESIS

V. JUSTIFICACIÓN

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

- VI.I COLECTA DE MUESTRAS
 - A. MUESTRAS PARA EXTRACCIÓN DE ADN
 - B. MUESTRAS PARA HERBARIO
 - C. MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO
- VI.II ESTUDIO MOLECULAR
 - A. SELECCIÓN DEL GRUPO EXTERNO
 - B. EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO
 - C. AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN ITS1-5.8S-ITS2 DEL rDNA POR PCR Y PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO
 - D. REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO
 - E. ALINEACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE LA REGIÓN COMPLETA
 - F. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS SECUENCIAS
- VI.III ESTUDIO MORFOLÓGICO
 - A. VARIABLES BIOCLIMÁTICAS
 - B. MICROFOTOGRAFÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO
 - C. CARACTERES MORFOLÓGICOS
 - D. MÉTODO COMPARATIVO Y FILOGENIA

VII. RESULTADOS

VII.I ANÁLISIS MOLECULARES

- A. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS
- B. ANÁLISIS FILOGENÉTICO
- C. ANÁLISIS DE LOS CLADOS

VII.II ANÁLISIS MORFOLÓGICOS

- A. PAPILAS DE LAS ESPECIES EN ESTUDIO:
MICROFOTOGRAFÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (M.E.B.)
- B. VARIABLES BIOCLIMÁTICAS
- C. CARACTERES MORFOLÓGICOS VS VARIABLES BIOCLIMÁTICAS
- D. MÉTODO COMPARATIVO Y FILOGENIA

VIII. DISCUSIÓN

- A. EL MARCADOR MOLECULAR
- B. LA MONOFILIA DEL GRUPO
- E. EL CARÁCTER PERENNIFOLIO VS LA ARIDEZ AMBIENTAL:
CORRELACIÓN FORMA-FUNCIÓN Y M.C.F

IX. CONCLUSIONES.

X. ANEXOS

- ANEXO 1. LISTA DE ESPECIES EN RIESGO EN MÉXICO
- ANEXO 2. REGISTRO DE COLECTAS
- ANEXO 3 MATRIZ DE ALINEACIÓN DE LAS SECUENCIAS EN ESTUDIO
- ANEXO 4. LÁMINAS CON LAS IMÁGENES DE M.E.B.

XI. REFERENCIAS

Palabras clave: clado *Beaucarnea* y *Calibanus*, patas de elefante, secuencias ITS, imágenes de M.E.B., surcos estomáticos, papilas o dientes, reconstrucción filogenética, adaptaciones foliares.

RESUMEN

Se propuso una hipótesis filogenética para el clado *Beaucarnea-Calibanus* (Ruscaceae) basada en 38 secuencias del marcador molecular ITS del nrDNA de un total de 18 especies, 12 del grupo interno y 6 del grupo externo. Los 106 caracteres parsimoniosamente informativos se sometieron a un análisis de máxima parsimonia, máxima verosimilitud y bayesiano. Los resultados de los tres análisis fueron congruentes y apoyaron la monofilia del clado y la parafilia de los géneros. Entre *Beaucarnea compacta* y *Calibanus glassianus* la divergencia nucleotídica fue de 0%; no se encontró evidencia para considerarlas como especies distintas bajo este marcador molecular. Las dos especies de *Calibanus* aparecieron anidadas en *Beaucarnea* en todos los análisis por lo que sugerimos la inclusión de sus especies en el género *Beaucarnea*. Se identificaron dos grandes grupos dentro del clado con apoyo de bootstrap y de probabilidades posteriores bayesianas. Un clado corresponde a las especies que habitan climas semiáridos del pacífico, centro y NE del territorio mexicano, y el otro comprende a las especies que habitan climas semihúmedos del SE de México y Guatemala. Las especies que habitan climas semiáridos poseen abundantes papilas o “dientes” en la periferia de los surcos estomáticos mientras que las especies que viven en ambientes semihúmedos carecen de éstos o los presentan en mucho menor cantidad. La precipitación y la temperatura se asocian a la presencia/ausencia de papilas en la periferia de los surcos estomáticos de sus hojas; baja precipitación y baja temperatura se correlacionan con la presencia de papilas, mientras que alta precipitación y temperaturas no muy extremosas se correlacionan con la ausencia de papilas. No existe efecto filogenético asociado a las variables climáticas y a los caracteres morfológicos en estudio de acuerdo a los análisis realizados.

Palabras clave: clado *Beaucarnea-Calibanus*, secuencias ITS, reconstrucción filogenética, imágenes de M.E.B., surcos estomáticos, papilas o dientes, adaptaciones foliares.



Beaucarnea gracilis,
Valle de Tehuacan-Cuicatlán, Puebla
Agosto 2006
Foto: Vanessa Rojas

I. INTRODUCCIÓN

Las especies vegetales exhiben una extensa variedad morfológica y funcional, una gran diversidad de formas de vida y una gran complejidad en cuanto a estrategias de supervivencia como resultado de la adaptación a la totalidad de los factores físicos, genéticos, fisiológicos, bioquímicos y ambientales que experimentan (Gifford y Foster, 1996; Wright y Gaut, 2004). Desde los genes hasta el paisaje, existen mecanismos que mantienen o que afectan la diversidad biológica (Rozzi, 2001) por lo que los atributos de cada individuo contribuyen en cada uno de los niveles biológicos, temporales y espaciales de la biodiversidad.

México es un país cuya superficie ofrece un mosaico de condiciones ambientales y microambientales a los organismos (Rzedowski 1987; Flores y Gerez, 1994). Dentro de sus grandes extensiones de terreno posee áreas geológicamente complejas con una gran variedad de condiciones topográficas y microclimáticas que delimitan la distribución de las comunidades vegetales. Esta heterogeneidad geológica se asocia al alto número de especies y de endemismos que observamos en nuestro país. A nivel mundial, México es reconocido como uno de los territorios con mayor número de especies vegetales por unidad de área, residiendo plantas de afinidad tropical y templada así como una alta proporción de endemismos y un importante germoplasma de especies domesticadas y ruderales nativas (Rzedowski, 1992).

La relación entre el ambiente, la morfología de los organismos y su función ha sido un tema de estudio substancial en términos macroevolutivos. Según Elstrott e Irschick (2004), el principal objetivo de estos estudios debe ser la dilucidación del proceso de coevolución entre estas variables con el fin de obtener una evidencia al menos indirecta sobre la acción de la selección natural en la modelación de los patrones macroevolutivos. Preguntas como, *¿de dónde viene tanta diversidad morfológica, fisiológica, conductual y de tolerancias ecológicas en un sentido evolutivo?* podemos comenzar a resolverlas analizando la correlación entre la forma de los individuos y su ambiente circundante, y si además de la información que nos proporciona esta correlación tenemos la información de las relaciones de parentesco de los organismos en estudio, podemos hacer inferencias sobre la historia evolutiva de un rasgo e inferir si éste podría ser producto del ambiente o de las relaciones de parentesco entre los organismos.

Una forma de descubrir las relaciones de ancestría-descendencia de los individuos es a través de analizar datos moleculares como las secuencias de nucleótidos, ya que nos permitan separar los componentes genéticos entre poblaciones o especies, y hacer deducciones bajo los conceptos de selección natural, descendencia común o evolución neutral (Rossi, 2005). También nos permiten hacer comparaciones entre organismos muy distintos morfológicamente pero que comparten información de ascendencia común en sus genomas (Rossi, 2005).

El clado *Beaucarnea-Calibanus* (B-C) lo comprenden plantas perennifolias en su mayoría endémicas de México; poseen una alta diversidad de formas vegetales, un amplio rango de condiciones microclimáticas y un reducido número de especies (13 especies). Son plantas con un alto valor ornamental a nivel nacional e internacional. No obstante, presentan problemas sistemáticos y taxonómicos pues existen numerosos casos de sinonimia en las bases de datos nomenclaturales como ^wTRÓPICOS (<http://mobot.mobot.org/W3T/Search/vast.html>) y en los herbarios nacionales como MEXU.

Con el fin de aclarar las relaciones de parentesco entre las especies del clado, analizamos las secuencias ITS del DNA ribosomal nuclear de las especies y generamos una hipótesis filogenética, la cual utilizamos posteriormente en una hipótesis adaptativa relacionada con la pérdida de agua. Lo anterior debido a que estas plantas poseen carácter perennifolio a pesar de que habitan en ambientes xerófilos. Mantener las hojas siempre verdes en climas áridos o semiáridos, como los bosques deciduos o los matorrales xerófilos, supone un gasto excesivo debido a la poca disponibilidad de agua. La presencia de troncos o cáudices suculentos, hojas con epidermis y cutícula gruesa y estomas dentro de criptas estomáticas, son algunas adaptaciones en torno a la economía del agua (McClendon, 1908; Bogler, 1998). Más del 90% del agua que toma una planta, la pierde durante el proceso de transpiración, particularmente a través de los estomas (Raven *et al.*, 1986). Es por ello que la regulación de los movimientos del estoma, es decir, el cierre y la apertura de las células guarda por presiones de turgencia, es central en la supervivencia de las plantas terrestres, ya que éstos deben maximizar la toma de CO₂ pero minimizar la pérdida de agua (Webb y Baker, 2002; Raven *et al.*, 1986). A esto se debe que muchas plantas de zonas áridas presenten estomas pequeños o casi inexistentes, y cantidades apreciables de ceras, pelos y tricomas, los cuales dificultan la salida del vapor de agua (Raven *et al.*, 1986).

En la mayoría de las monocotiledóneas de zonas secas, los estomas de las hojas surgen dentro de surcos más o menos profundos (como en *Dasyllirion glaucophyllum* y *Hesperaloe parviflora*) a profundos con prominentes “dientes” o “papilas” (como en *Nolina texana*) (Bray, 1903; McClendon, 1908). Las papilas o dientes en los surcos estomáticos parecen reducir la pérdida de agua, ya que en condiciones de sequía, las hojas se encogen dorso-ventralmente provocando el cierre de los surcos y las papilas previenen que el aire seco circundante se mezcle con el aire húmedo dentro de los surcos, lo que debe favorecer la retención de vapor de agua al interior de los surcos y evitar que los estomas cierren (McClendon, 1908; Felger y Hernickson, 1997). La presencia de surcos y papilas no es exclusiva de las monocotiledóneas; también ocurren en otras plantas como *Phoradendron diguetianum* y *P. flavescens*, en *Euphorbia cryptospinosa* y en cactáceas como *Selenicereus murrillii* y *Peniocereus* (Felger y Hernickson, 1997), en este caso localizados en el tallo fotosintético.

Para deducir si la presencia/ausencia de las papilas en la periferia de los surcos estomáticos de las hojas de las especies del clado se relaciona con las condiciones ambientales, examinamos las dimensiones de las papilas y las correlacionamos con variables ambientales de precipitación y de temperatura del hábitat de las especies. No obstante, sabemos que la presencia/ausencia de papilas también puede deberse a la herencia. Es decir, suponemos que los organismos cercanamente relacionados son más similares entre sí que entre organismos lejanamente emparentados debido a que comparten un origen común. Sin embargo, los organismos también pueden ser similares si sus respuestas adaptativas bajo ambientes parecidos, son similares, por lo que, si comparamos datos de los organismos del primer tipo y estadísticamente los tratamos como independientes, podemos cometer un error al atribuir a la adaptación, efectos que en realidad se deben a la ancestría (error estadístico de tipo I: rechazar la

hipótesis nula cuando ésta es verdadera) (Díaz, 2001). A esto se le denomina *efecto filogenético* (Harvey y Purvis, 1991).

Con el fin de descartar efecto filogenético asociado a los caracteres morfológicos en estudio, utilizamos una hipótesis filogenética generada en este trabajo, en un método comparativo filogenético que nos permitiera para identificar similitud significativa entre los miembros de los clados.

I.1 LAS NOLINOIDES

Se denominan Nolinoideas a los géneros que conformaban a la familia Nolinaceae (*Beaucarnea*, *Calibanus*, *Nolina* y *Dasyllirion*), y que hoy en día se circunscribe a la familia Rusceaceae *sensu lato*, la cual incluye a las familias Convallariaceae, Dracaenaceae y Nolinaceae, así como a los géneros *Comospermum* y *Eriospermum*, de acuerdo a análisis moleculares y morfológicos combinados (Rudall *et al.*, 2000a). En su conjunto forman un clado unido por la ausencia de fitomelano en la testa de la semilla y por una gran semejanza en las secuencias de los genes *rbcL* y *trnL-F*. Inusualmente este clado presenta una alta variedad morfológica pero carece de divergencia en las secuencias analizadas hasta ahora. Según los análisis de Rudall *et al.* (2000a) existen algunas reagrupaciones dentro de la familia:

RUSCACEAE Sprengel

- i. *Eriospermum*,
- ii. *Comospermum*,
- iii. **Nolinoideas** (anteriormente **Nolinaceae**) más *Ophiopogon* y *Liriope* (Ophiopogonae, excluyendo a *Peliosanthes*),
- iv. Dracaenoides (anteriormente Dracaenaceae),
- v. Polygonatae,
- vi. Convallarieae (incluyendo a *Aspidistra*) y
- vii. Ruscoideas (Rusceaceae *sensu stricto*) más *Peliosanthes*.

I.II EL CLADO *BEAUCARNEA-CALIBANUS*

El clado *Beaucarnea-Calibanus* (B-C) lo comprenden 13 especies de plantas neotropicales en su mayoría endémicas de México (**Tabla 1; Figuras 1, 2 y 3**). Exhiben un rango de distribución relativamente estrecho a lo largo de zonas montañosas semiáridas y en regiones tropicales secas del noreste, centro y sureste de nuestro país, así como en la porción norteña de Centroamérica (Hernández, 1993a; 1993b) (**Figura 4**). Estas especies se asocian a vegetación xerófila o a bosque tropical caducifolio (Rzedowski, 1987). Crecen en suelos oligotróficos, rocosos y en acantilados o en laderas de montañas con pendiente inclinada.

Tabla 1. Especies que conforman al clado B-C (Trelease, 1911; Hernández, 1992; Hernández, 1993a; Hernández, 2001; Hernández y Zamudio, 2003).

<i>Beaucarnea</i> Lem	<i>Calibanus</i> Rose
<i>B. recurvata</i> Lem	<i>C. hookerii</i> (Lem) Trel.
<i>B. gracilis</i> Lem	<i>C. glassianus</i> L. Hern & Zamudio
<i>B. stricta</i> Lem	
<i>B. purpusii</i> Rose	
<i>B. pliabilis</i> (Baker) Rose	
<i>B. guatemalensis</i> Rose	
<i>B. goldmanii</i> Rose	
<i>B. hiriartiae</i> L. Hern	
<i>B. congesta</i> L. Hern. <i>sp. nov.</i> , ined	
<i>B. sanctomariana</i> L. Hern	
<i>B. compacta</i> L. Hern & Zamudio	



Figura 1. Especies del clado que habitan matorrales xerófilos de la Sierra Madre Oriental. A. y B. *Beaucarnea compacta*; C. *Calibanus glassianus*; D. *Calibanus hookerii*.

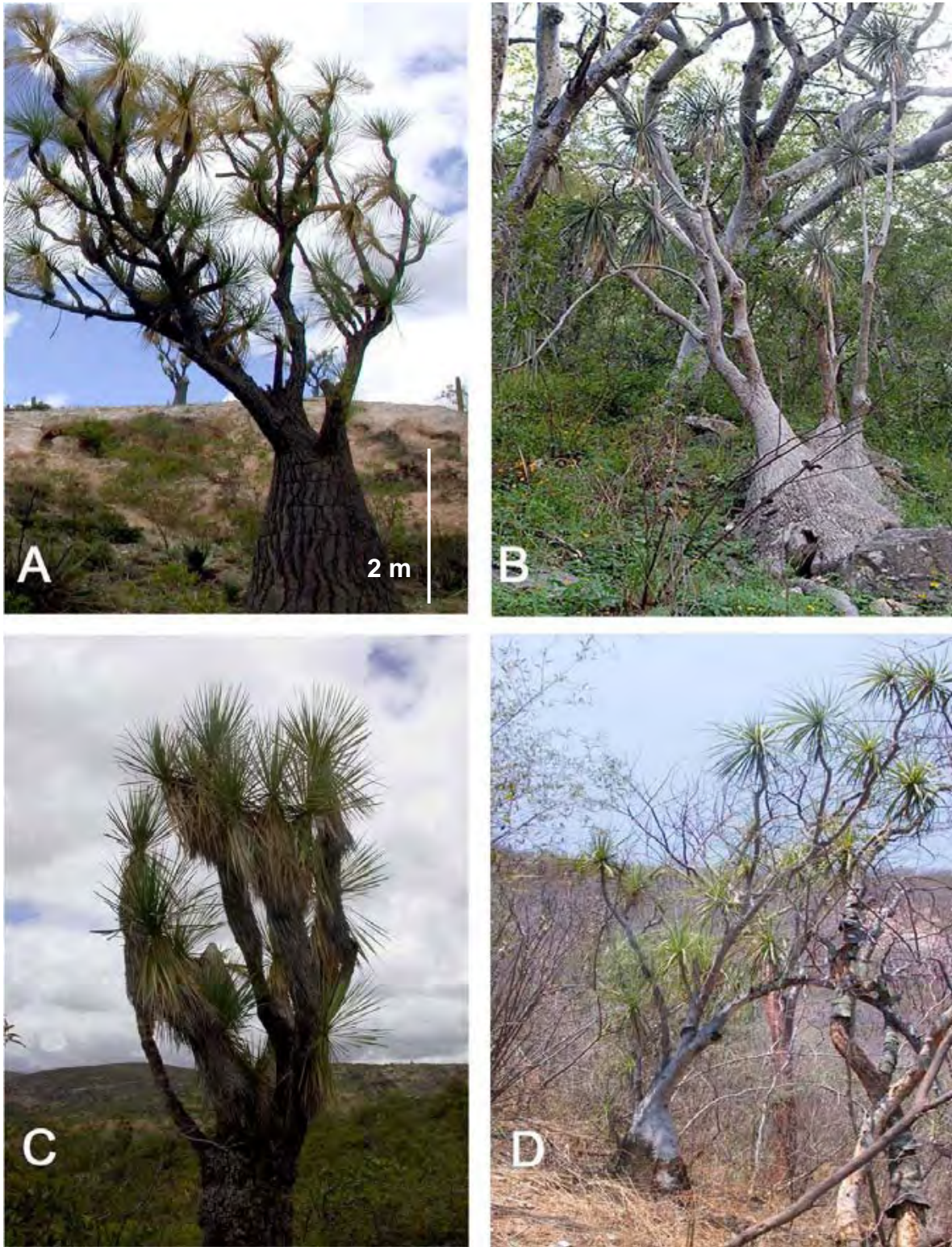


Figura 2. Especies del clado que habitan matorrales xerófilos y bosques tropicales caducifolios de Puebla, Oaxaca y Guerrero. A. *Beaucarnea gracilis*; B. *Beaucarnea stricta*; C. *Beaucarnea purpusii* y D. *Beaucarnea hiriartiae*.



Figura 3. Especies del clado que habitan bosques tropicales caducifolios de Quinatana Roo, Chiapas y Guatemala. A. *Beaucarnea pliabilis*; B. *Beaucarnea goldmanii*; C. *Beaucarnea recurvata* y D. *Beaucarnea guatemalensis*.



Beaucarnea gracilis



Beaucarnea stricta



Beaucarnea purpusii



Beaucarnea hiriartiae



Beaucarnea recurvata



Beaucarnea congesta

Figura 4. Mapas de distribución de las especies de *Beaucarnea* y *Calibanus* modificados de la base de datos nomenclatural TROPICOS [http://mobot1.mobot.org/website/map_post.asp].



Beaucarnea goldmanii



Beaucarnea pliabilis



Beaucarnea guatemalensis



Beaucarnea compacta



Calibanus glassianus



Calibanus hookerii

Figura 4. Continuación. Mapas de distribución de las especies de *Beaucarnea* y *Calibanus* [http://mobot1.mobot.org/website/map_post.asp].

GÉNERO *BEAUCARNEA*

Las especies de *Beaucarnea* son plantas arborescentes y dioicas caracterizadas por poseer la base del cáudice¹ muy ensanchado, suculento y con un acentuado relieve en la corteza (felema) formando placas poligonales (**Figura 5**). Poseen crecimiento secundario monocotiledóneo y llegan a alcanzar los 18 m de altura aunque la mayoría oscila entre los 7 y 8 m, a excepción de *Beaucarnea compacta* la cuál no sobrepasa los 60 cm de altura. Sus hojas emergen en rosetas terminales densas, son verde a verde-azulado, lineares con la base triangular o deltoidea y margen microserrulado, cóncavas, acanaladas y algunas con los canales papilados; pueden ser planas o cóncavas en sección transversal, dependiendo de la especie. Los estomas se localizan por encima del parénquima del mesófilo, entre manojos de fibras fuertes, o pueden localizarse entre costillas prominentes cubiertas con papilas más o menos intercaladas (cuando las poseen) (**Figura 6**). Los segmentos del perianto son enteros, las inflorescencias largas, terminales, paniculadas y ramificadas; las flores son unisexuales color blanco cremoso; los pedicelos articulados a la mitad; los ovarios uniloculares y los frutos son sámaras² tri-lobuladas o tri-colpadas con una sola semilla y parecen dispersarse por el viento gracias a su carácter alado (Trelease, 1911; Hernández, 1993a; Bogler, 1998) (**Figura 7**).

¹ Cáudice (*caudex* en inglés). Base del tallo de muchas plantas perennes, ancho y frecuentemente subterráneo, del cual surgen hojas nuevas e inflorescencias.

² *Sámara*: fruto seco e indehisciente en el que aparece una expansión o apéndice a modo de ala para facilitar su dispersión por el viento.



Figura 5. Corteza o felema de *Beucarnea stricta*. Se observan las placas poligonales características del género.

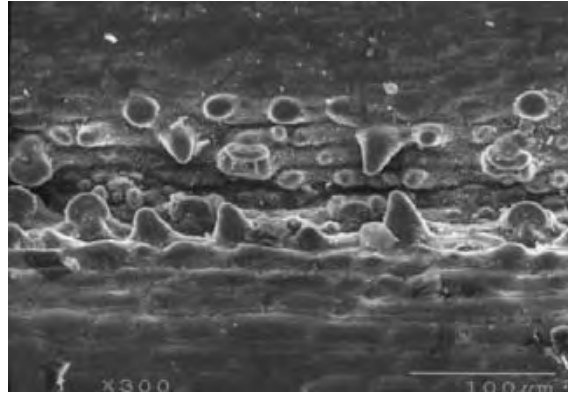


Figura 6. Imagen de M.E.B. de hoja de *Beucarnea stricta*. Se observa un surco estomático con criptas estomáticas y dientes en la periferia.



Figura 7. Infrutescencia de *Beucarnea compacta*. Se observan los frutos alados.

GÉNERO *CALIBANUS*

Las especies de *Calibanus* son plantas dioicas con cáudice pequeño, subgloboso, ensanchado y normalmente cubierto por corteza escamosa (**Figura 8**). Sus hojas verdes a verde-azuladas son numerosas, angostas y emergen como rosetas dispersas (**Figura 9**). Los estomas se localizan dentro de surcos, entre costillas prominentes cubiertas por papilas (**Figura 10**). Los segmentos del perianto son casi completos y redondos. Las inflorescencias son cortas y paniculadas; los pedicelos articulados y localizados cerca de las flores; las flores son unisexuales y sus frutos con una única semilla, son ovoides con tres aristas y tres costillas laterales e indehiscentes (no funcionales en flores estaminadas). Los frutos de *Calibanus* son redondos y sin provisión para planear en el aire, por lo que probablemente se dispersan al rodar o deslizarse sobre el suelo gracias a la acción del viento (Trelease, 1911; Bogler, 1998).



Figura 8. *Calibanus glassianus*. El cáudice es pequeño y subgloboso.



Figura 9. *Calibanus hookerii*. El cáudice es subterráneo y las numerosas hojas emergen en roseta.

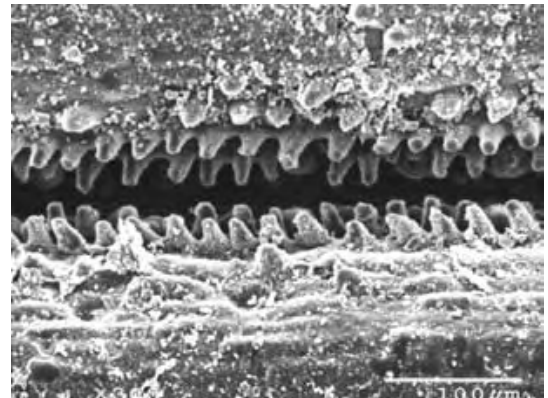


Figura 10. Imágen de M.E.B. de hoja de *Calibanus glassianus*. Se observa un surco estomático con papilas en la periferia.

I.III IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL CLADO

Las especies de *Beaucarnea* son muy comercializadas a nivel nacional e internacional como plantas de ornamento. Son mejor conocidas como: “Pata de Elefante”, “Sacamecate”, “Monja”, “Soyate de Tehuantepec”, entre otras. En México la mayor parte de las poblaciones de *Beaucarnea* se encuentran en un estado crítico por la continua destrucción del hábitat, ya sea por la agricultura, el forrajeo o por la excesiva extracción con fines comerciales (Cardel *et al.*, 1997). Siete de las once especies de *Beaucarnea* se encuentran “amenazadas” de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-059-ECOL-1994) (**Anexo 1**), por lo que sólo pueden ser comercializadas si los individuos provienen de unidades de reproducción de flora silvestre calificadas y si son autorizadas por la Secretaría de Desarrollo Social y por la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Sin embargo, en los últimos 30 años muchas plantas juveniles y adultas e incluso las semillas han sido sobrecolectadas y comercializadas ilegalmente en nuestro país y en el extranjero, principalmente en EUA, Holanda y Alemania (Hernández, 1993b). Según las evaluaciones realizadas por Hernández-Sandoval *et al.* (2001) sobre el estado poblacional de cada una de las especies, *Beaucarnea purpusii* presenta el mayor riesgo por su baja densidad de individuos; por lo que estos autores consideran que esta especie debe tratarse como en “peligro de extinción”. Así mismo, consideran que *Beaucarnea hiriartiae*, *B. congesta*, *B. recurvata* y *B. sanctomariana* deben tratarse como “seriamente amenazadas” y finalmente consideran que *B. goldmanii*, *B. gracilis*, *B. plibilis* y *B. stricta* deben tratarse como “amenazadas”.

II. ANTECEDENTES DEL PROYECTO

II.1 SINOPSIS HISTÓRICA DE *BEAUCARNEA* Y *CALIBANUS*

El género *Beaucarnea* fue descrito por Lemaire en 1861 quién designó como especie tipo a *B. recurvata*. Ese mismo año describió a *Beaucarnea gracilis* y a *B. stricta*. En 1906, Rose describió a *Beaucarnea guatemalensis*, *B. pliabilis* y *B. purpusii*, y en 1909 a *B. goldmanii*. En 1992, Hernández describió a *Beaucarnea hiriartiae*, en 1993 a *B. congesta* en su tesis doctoral (Hernández, 1993a), en el 2001 a *B. sanctomariana* y en el 2003, junto con Zamudio (Hernández y Zamudio, 2003), describió a *B. compacta*. El género *Calibanus* fue descrito por Rose en 1906 como género monotípico con *C. hookerii* (Lem) Trel. En el 2003, Hernández y Zamudio describieron la segunda especie para el género, *Calibanus glassianus*.

La clasificación tanto de *Beaucarnea* como de *Calibanus* ha sido muy controvertida (Hernández, 1993). En 1850, *Beaucarnea* se ubicaba dentro de la familia Asparagaceae, entre *Cordylina* y *Dracaena*. A Lemaire le parecía que tanto *Beaucarnea* como *Dasyilirion* diferían de estos dos géneros, e inclusive de *Sansevieria*, en la condición dioica, los segmentos del perianto libres en la base, los ovarios uniloculares y los frutos secos con una única semilla, por lo tanto, sugirió que *Dasyilirion* y *Beaucarnea* debían formar una pequeña familia cercana a Asparagaceae. Sin embargo, decidió finalmente nombrar a Dasyiliriaceae como subtribu de las Asparagaceae (Hernández, 1993a). Para 1872, *Beaucarnea* se conformaba por cinco especies de *Nolina* y por la única especie descrita en ese entonces de *Calibanus*. Baker (1872), colocó a *Beaucarnea* y a *Dasyilirion* dentro de las Liliaceae junto con diversos géneros como *Nolina*, *Asparagus*, *Crysotracton*, *Yucca*, *Aloe* y *Massonia*. En 1879, Watson erigió a la tribu Nolineae constituida por *Dasyilirion* y *Nolina*, dentro de Asparagaceae, entre las tribus

Convallarieae y Hemerocallideae. En 1881, Baker ubicó a *Dasyllirion* (que ahora incluía a una especie de *Beaucarnea* y a *Calibanus*) y a *Beaucarnea* (que incluía a nueve especies de *Nolina*) cerca de *Yucca*, *Hesperaloe* y *Herrería* en la tribu Yuccoideae de la familia Liliaceae. Posteriormente, Rose (1906) separó al género *Calibanus* de *Dasyllirion* y consideró que *Dasyllirion*, *Beaucarnea* y *Nolina* forman un grupo homogéneo. En 1911, Trelease desarrolló una nueva propuesta de relaciones entre estos grupos, en la cual consideró al grupo homogéneo identificado por Rose e incluyó a *Calibanus*, y trató al grupo desértico como Nolineae. Postuló las afinidades del grupo con base en caracteres morfológicos del fruto y consideró a *Nolina* como el “prototipo” debido a su amplia distribución, su alta variabilidad en cuanto a forma de crecimiento, por la presencia de frutos triloculados bien desarrollados con tres semillas y por el alto número de especies constituyendo grupos diferenciados. También debido a su conformidad con el “plan liliáceo” que consiste en pistilos triloculares y arco cotiledonar. Este mismo autor consideró a *Calibanus* como un probable derivado de *Nolina* y a *Beaucarnea* y a *Dasyllirion* como derivados paralelos de *Nolina*, o como derivados no muy bien establecidos del género, por poseer un sólo lóculo en la madurez y una sola semilla (además de que sus pistilos son unicelulares y los frutos alados). Propuso las afinidades de Nolineae de la siguiente manera (**Figura 11**):

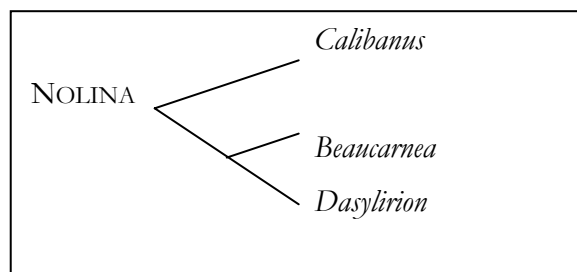


Figura 11. Representación de la afinidades entre *Nolina*, *Calibanus*, *Beaucarnea* y *Dasyllirion* propuestas por Trelease (1911) con base en caracteres morfológicos.

Posteriormente, Hutchinson (1934, 1959) reconoció a la tribu Nolineae y la colocó dentro de la familia Agavaceae junto con otros taxones arborescentes de hojas fibrosas como *Yucca*, *Agave* y *Dracaena*, pero excluyó a *Beaucarnea*. Esta propuesta fue la más popular de la época. Sin embargo, la posición de Nolinaceae dentro de Agavaceae no poseía soporte por diversos caracteres como los florales, los frutales, los seminales y los cariotípicos (Bogler, 1998). Nakai en 1943 elevó a la tribu Nolineae al rango de familia, Nolinaceae, lo cual fue apoyado por estudios comparativos realizados por Huber (ver Hernández, 1993). La familia Nolinaceae vuelve a descender al rango de subfamilia, en esta ocasión de Dracaenaceae. Dahlgren y Clifford (1982) incluyen a *Beaucarnea*, *Calibanus*, *Dasyllirion* y *Nolina* dentro de una de las dos subfamilias de Dracaenaceae: Nolineae, y finalmente Dahlgren *et al.* (1985) elevan nuevamente a la subfamilia Nolineae al rango de familia, Nolinaceae, manteniendo a todos sus integrantes.

Con base en la clasificación de Dahlgren *et al.* (1985) se han realizado trabajos posteriores de Agavaceae (Duball *et al.*, 1993; Eguiarte *et al.*, 1994; Eguiarte, 1995; Bogler, 1998; Hernández, 1995; Bogler y Simpson, 1995; Bogler y Simpson, 1996) en donde se trata a la familia Nolinaceae como un linaje evolutivo de Agavaceae *sensu lato*. Sin embargo, las diferencias entre Nolinaceae *sensu* Dahlgren *et al.* (1985) y Agavaceae *sensu stricto* (como la presencia de fitomelano en las semillas de Agavaceae y la ausencia de éste en las semillas de Nolinaceae, además de la evidencia citológica, anatómica y cariotípica) sugieren que los géneros que constituyen a la familia Nolinaceae *sensu* Dahlgren *et al.* (1985) son muy distintos de los que constituyen a la familia Agavaceae *sensu stricto* (García-Mendoza y Galván, 1995; Dahlgren *et al.*, 1985). Ante esta evidencia y con base en estudios moleculares y morfológicos más recientes, Rudall *et al.* (2000a) incluyeron a las familias Nolinaceae, Convallariaceae, Dracaenaceae y Eriospemaceae dentro de Ruscaceae (APG II, 2003). La inclusión de estas familias en Ruscaceae se debió a que el conocimiento sobre los límites y las

afinidades de las familias dentro de las Asparagales mejoró recientemente (Rudall *et al.*, 2000a). La monofilia de Ruscaceae se sustenta por secuencias de ADN (Chase *et al.*, 1995; Chase *et al.*, 2000; Rudall *et al.*, 1997; Rudall *et al.*, 2000b; Fay *et al.*, 2000) y por la falta de fitomelaninas en sus semillas, pocos óvulos, articulación en el pedicelo y un cariotipo y número cromosómico similar (Rudall *et al.*, 2000a). Según Rudall *et al.* (1998) y Fay *et al.* (2000), Ruscaceae *sensu lato* puede ser la familia hermana de Asparagaceae.

II.II ESTUDIOS DE SISTEMÁTICOS EN *BEAUCARNEA*

El primer estudio sistemático de *Beaucarnea* lo realizó Hernández (1993) para su tesis doctoral (no publicado) y es el estudio previo a mi trabajo. Para su análisis cladístico, Hernández incluyó a las especies consideradas por Trelease para el género e incluyó a *Beaucarnea purpusii* y a tres nuevas especies descritas por él, *Beaucarnea hiriartiae* (Hernández, 1992), *B. congesta* (Hernández, 1993a, no publicado) y *Beaucarnea sanctomariana* (Hernández, 2001). Utilizó caracteres vegetativos y reproductivos e incluyó a *Calibanus*, *Dasyllirion* y a *Nolina* como grupo externo.

El resultado de su análisis cladístico mostró la monofilia de *Beaucarnea* con 4 apomorfías aunque sin un buen apoyo de bootstrap. *Calibanus hookerii* apareció como grupo hermano de *Dasyllirion* y *Beaucarnea* (sin apoyo de bootstrap) y *Beaucarnea stricta* y *B. purpusii* aparecieron en politomía así como *Beaucarnea goldmanii*, *B. guatemalensis* y *B. pliabilis* (**Figura 12**). En su estudio excluyó los nombres *Beaucarnea glauca*, *B. horticola* y *B. tuberculata* y consideró a *B. petenensis* parte de *B. pliabilis* (Hernández, 1993a).

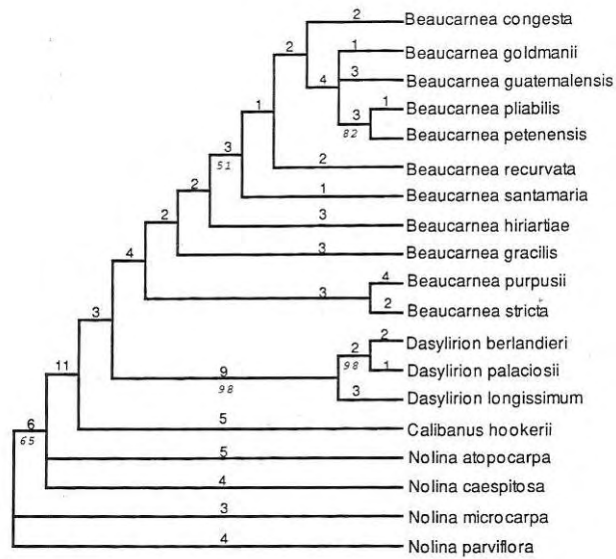


Figura 12. Árbol de consenso estricto de 114 pasos de longitud con un CI=0.5. Los números sobre las ramas indican apomorfías y los números debajo de las ramas indican los valores de bootstrap (Hernández 1993a).

En mi trabajo incluyo a todas las especies consideradas por Hernández (1993a) más *Beaucarnea compacta* y *Calibanus glassianus*, especies que fueron descritas posteriormente (Hernández y Zamudio, 2003). Excluyo a *Beaucarnea sanctomariana* debido a que no pudo ser colectada. Analizo también las “papilas” o “dientes” de las hojas observados anteriormente por Trelease (1911) y por Hernández (1993a) y determino si sus dimensiones pueden explicarse con base en el ambiente en que viven las plantas, o sí su presencia se debe a la cercanía filogenética de las especies.

II.III EL MARCADOR MOLECULAR

Cuando a principios de los 90's se originó la revolución de los análisis filogenéticos moleculares, la mayoría de los estudios filogenéticos de plantas basados en secuencias moleculares se apoyaban exclusivamente en genes y en espaciadores del genoma plástido (Catalán *et al.*, 1997; Clegg, 1993; Olmstead y Palmer, 1994; Olmstead y Reeves, 1995) particularmente del *rbcL* (Chase *et al.*, 1993). Sin embargo, estas secuencias tienen una desventaja importante ya que se heredan de forma uniparental y pueden tener una historia distinta a la de las especies en estudio, además de poca variación. Por lo anterior, diversos investigadores optaron por incluir datos de secuencias de marcadores nucleares en sus estudios, convirtiéndose éstos en datos *sine qua non* para la inferencia filogenética a un nivel genérico e infragenérico en plantas (Álvarez y Wendel, 2003).

Los genes del DNA ribosomal nuclear (nrDNA) han mostrado ser una herramienta filogenética muy poderosa en plantas superiores por su ubicuidad en los organismos (Hamby y Zimmer, 1991). La unidad entera (del 18S al 26S) del genoma nuclear vegetal se encuentra presente en miles de copias dispuestas en repeticiones en tandem en un locus o en múltiples loci. Cada región presenta distintas tasas de cambio en la secuencia, lo que promueve la detección, amplificación, clonación y secuenciación del nrDNA y permite que distintas regiones de la molécula puedan ser utilizadas para examinar linajes con distintos grados de divergencia (Suh *et al.*, 1993; Rogers y Bendich, 1987). Esta familia génica sufre evolución concertada rápida por entrecruzamiento desigual y conversión génica (cf. Zimmer *et al.*, 1980; Arnheim *et al.*, 1980; Arnheim, 1983) dentro e incluso entre loci (Appels y Dvorak, 1982; Hillis *et al.*, 1991), lo que promueve la uniformidad intragenómica de las unidades de repetición y en general, promueve la reconstrucción de las relaciones filogenéticas de las especies (Sanderson y Doyle, 1992).

Los espaciadores de transcripción interna “ITS” (*Internal Transcribed Spacer*, por sus siglas en inglés) del DNA ribosomal nuclear (nrDNA) separan las unidades codificantes 18S, 5.8S y 26S. La estructura y composición de estos espaciadores (tamaño y contenido de G+C) se mantiene relativamente constante entre las angiospermas, lo que sugiere algún tipo de restricción evolutiva (Baldwin, *et al.* 1995). Dicha conservación en tamaño y la alta variabilidad en las secuencias nucleotídicas (mayor que en el gen *rbcl*) permite que estos espaciadores puedan ser alineados a lo largo de taxones cercanamente relacionados, con la suficiente variabilidad como para permitir una buena resolución filogenética a nivel de familia género y especie, ya que las secuencias de las regiones espaciadoras evolucionan en general más rápido que las regiones codificantes (Zimmer *et al.*, 1980; Hamby y Zimmer, 1991, Suh *et al.*, 1993; Kim y Jansen, 1994; Baum *et al.*, 1994; Baldwin, *et al.* 1995; Bogler y Simpson, 1995). Las regiones ITS son parte de la unidad transcripcional del DNA ribosomal nuclear pero los segmentos espaciadores del transcrito no se incorporan al RNArn maduro, sino que auxilian en su maduración (Baldwin, *et al.* 1995). La unidad completa mide ~ 9kb de longitud (Bogler y Simpson, 1996; Douzery *et al.* 1999) (**Figura 13**).

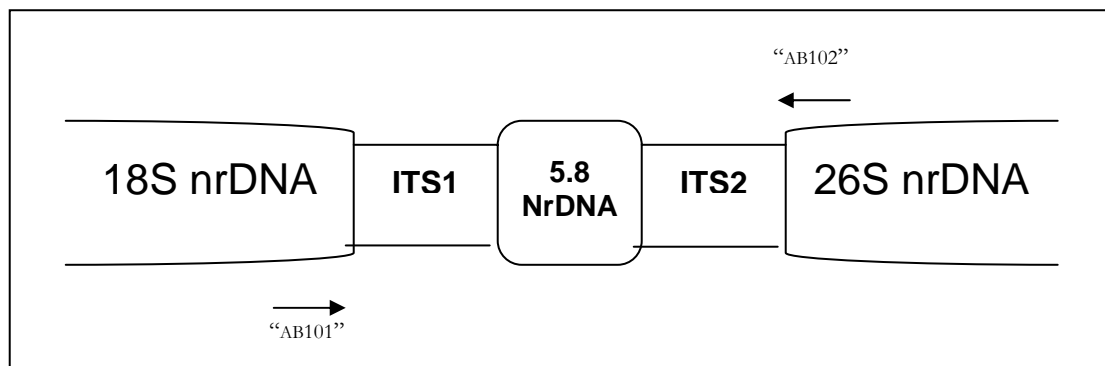


Figura 13. Esquema representativo de la región completa 18S-ITS1-5.8S-ITS2-26S del nrDNA. Las regiones a secuenciar corresponden a los espaciadores ITS1, ITS2 y 5.8S. Los iniciadores se encuentran anclados al 18S y al 26S respectivamente. Las flechas indican la posición aproximada de los oligos utilizados en la amplificación de la hebra del DNA a secuenciar.

A pesar de sus múltiples ventajas, algunos autores han reportado ciertas desventajas en la utilización de los ITS. Entre ellas destacan la inclusión de una mezcla de copias parálogas (secuencias duplicadas) y ortólogas (variantes congruentes con la especiación) en los análisis filogenéticos sin conocimiento previo debido a una incompleta homogeneización por evolución concertada. Esto implica que las secuencias parálogas pueden no ser eliminadas y las relaciones evolutivas inferidas no sean de los taxa sino de las copias (Hillis, 1994; Álvarez y Wendel, 2003). A esto se le denomina “sorteo de linajes” (*lineage sorting*) y provoca una incongruencia entre las filogenias de los taxones como consecuencia de un sorteo aleatorio de polimorfismo ancestral. Sin embargo, si la tasa de evolución concertada es lo suficientemente alta (70% de los sitios), la familia génica entera evoluciona como si fuera una única secuencia presente en múltiples copias duplicadas (Sanderson y Doyle, 1992). Por lo tanto, las secuencias parálogas con una alta tasa de evolución concertada se comportan como si fueran ortólogas y pueden ser utilizadas en la inferencia de relaciones de parentesco entre taxones sin temor a estar reconstruyendo eventos de duplicación génica en lugar de eventos de especiación (Sanderson y Doyle, 1992). Si a pesar de ello se estuviera reconstruyendo un evento de duplicación génica, las incongruencias entre la filogenia obtenida, la morfología, la biogeografía y la taxonomía se harían evidentes.

Otra desventaja de la utilización de estos espaciadores es la presencia de pseudogenes por degeneración de las copias, los cuales pueden evolucionar de forma independiente y a una tasa distinta de la de sus contrapartes funcionales (Álvarez y Wendel, 2003). Las consecuencias filogenéticas de la existencia de estos pseudogenes son inserciones y/o deleciones (*indels*) muy largos y en especial cambios en la estructura de las secuencias, en el contenido de GC y en la divergencia génica (Buckler y Holtsford, 1996; Buckler *et al.*, 1997). No obstante, los pseudogenes son fáciles de identificar, particularmente por la incongruencia

con el resto de las secuencias y por la obtención de ramas largas aisladas o difíciles de colocar (Kita e Ito, 2000).

En este trabajo la utilización de los espaciadores de transcripción interna del DNA ribosomal nuclear como marcadores moleculares no nos pareció inapropiada debido al buen comportamiento del locus y a que no se obtuvieron incongruencias entre las hipótesis filogenéticas obtenidas y la morfología de las especies, ni entre esta última y el hábitat que ocupan. En la discusión se aborda más ampliamente este tema.

II.IV ANÁLISIS Y RECONSTRUCCIÓN FILOGENÉTICA

El término *filogenia* fue introducido por Haeckel en 1866 para designar el desarrollo histórico de los organismos. El intento de Haeckel por reconstruir los linajes evolutivos se basaba en la idea de que el desarrollo embrionario (ontogenia) recapitulaba el desarrollo evolutivo (filogenia), idea que quedó plasmada en su frase célebre “la ontogenia recapitula la filogenia”. A pesar de que esta idea tiene mucho de cierto lo condujo a filogenias incorrectas. Hoy en día la palabra filogenia se refiere a la historia evolutiva o al patrón de descendencia de un grupo de organismos. Se basa en la idea de que la evolución de los caracteres permite la reconstrucción de las relaciones evolutivas entre las distintas especies, reedificando la historia de su diversificación, desde el origen de la vida en Tierra hasta la actualidad.

Con el fin de establecer los fundamentos de la clasificación biológica surgieron tres escuelas con ideas epistemológicas distintas pero que comparten como base metodológica el análisis de los caracteres taxonómicos: la Sistemática Evolutiva u Evolucionista, la Fenética o Taxonomía Numérica y la Sistemática Cladística o Sistemática Filogenética (De Queiroz y Donoghue, 1988). Hennig (1965) formalizó el concepto de sistemática filogenética refiriéndose al uso de caracteres derivados o apomórficos compartidos para la reconstrucción de las relaciones de ancestría y el agrupamiento de taxa con base en ancestría común (Wiley *et al.*, 1991).

Este trabajo se apoya en el método de reconstrucción de la sistemática cladística o sistemática filogenética, el método de sistematización de organismos más ampliamente utilizado en la actualidad (Morrone, 2001). Tiene su origen en la biología comparada y en la teoría de la evolución y opera bajo el principio de que existe una única historia genealógica que relaciona a todos los organismos:

Debido a que los caracteres son características de los organismos, ellos deben poseer un lugar en el árbol que representa esa historia; el lugar propicio para un carácter en ese árbol es aquél en el que éste surgió en la historia evolutiva. Un “árbol correcto” es aquél en el que los taxa están colocados correctamente y en orden genealógico y los caracteres están localizados en el lugar histórico en el que surgieron (Wiley et al., 1991)

La sistemática filogenética parte de dos postulados básicos:

- 1) El orden que reina en la jerarquía natural puede descubrirse y representarse de manera eficaz mediante diagramas con ramificación divergente.
- 2) El orden se manifiesta en la distribución de los caracteres derivados compartidos por los organismos en jerarquías anidadas.

En la reconstrucción filogenética, primero se especifican las suposiciones de cambio entre estados bajo el “criterio de optimalidad” y luego se estima la topología que mejor explique la distribución entre caracteres, entre las unidades de estudio (Page y Holmes, 1998). Los modelos de cambio entre estados que se utilizan para medir las hipótesis (o topologías) y seleccionar los árboles óptimos son los de *parsimonia* y los *probabilísticos*. Entre los primeros se encuentran los denominados “sabores de parsimonia”: Wagner (Wagner, 1961), Fitch (Fitch, 1971), Dollo (Le Quesne, 1972), Camin-Sokal (1965) y el método de parsimonia de polimorfismos (Farris, 1978; Felsenstein, 1979). Entre los segundos se encuentran los métodos de máxima verosimilitud y Bayesianos, los cuales

emplean los modelos de sustitución molecular: Jukes-Cantor (JC) (Jukes-Cantor, 1969), Kimura 2-parámetros (K80) (Kimura, 1980), Felsenstein (F81) (Felsenstein, 1981), Hasegawa-Kishino-Yano (HKY85) (Hasegawa *et al.*, 1985), Tamura-Nei (TN93) (Tamura y Nei, 1993), Kimura de 3-parámetros (K3P) y el modelo General Time Reversible (GTR) (Travaré, 1986).

Los modelos de *parsimonia* miden la dispersión en términos de número de pasos o de eventos de cambio extra que implica un árbol particular y el árbol más corto (el que menos pasos implica) es el que mejor describe los datos (Mabee, 1989). Dentro de estos métodos se encuentra el de máxima parsimonia (MP). Cuando se analizan datos moleculares, máxima parsimonia utiliza datos de secuencias de nucleótidos y lleva a cabo análisis sitio-por-sitio. Para cada topología de árbol calcula el mínimo número de cambios de nucleótidos o de sustituciones que son necesarios para explicar el patrón de sitios observados. Se suma el número de cambios sobre los sitios para obtener una estimación de parsimonia para cada topología, y la que posea el menor número de cambios es considerada como la más parsimoniosa (Alfaro *et al.*, 2003). Los modelos *probabilísticos*, por el otro lado, se basan en el concepto estadístico de verosimilitud como la probabilidad de observar la colección de datos si un árbol específico fuese el verdadero (Felsenstein 1981; Lewis, 1998). La dispersión se mide en función del acuerdo o ajuste entre los datos observados, las predicciones calculadas por un árbol particular y un modelo de cambio de probabilidad específica. Bajo este enfoque, el árbol óptimo es el de la máxima verosimilitud (Steel y Penny, 2000) o el de la probabilidad posterior bayesiana más alta (Rannala y Yang, 1996).

Cuando se utilizan métodos de *parsimonia* para seleccionar el mejor árbol, no es necesario hacer una evaluación *a priori* para estimar el mejor modelo pero sí una evaluación *a posteriori* (ACCTRAN, DELTRAN, etc.) en función de las transformaciones implícitas en el árbol óptimo elegido (Grant y Kluge, 2004; Kornet y Turner, 1999). Cuando se utilizan métodos *probabilísticos*, los modelos

de cambio son un pre-requisito para iniciar la reconstrucción filogenética. Se debe hacer una evaluación *a priori* para elegir la mejor hipótesis de cambio de estados, la cual depende de un árbol de referencia que se genera al calcular una medida de similitud total derivada de los datos y un algoritmo de “agrupamiento del vecino más cercano” o “neighbor joining” (De Luna *et al.*, 2005). Programas como ModelTest (Posada y Crandall, 1998) identifican el mejor modelo de cambio según la correspondencia de los datos y el árbol de referencia (Posada, 2003; Posada y Crandall, 2001; Yang, 1997). Una vez elegido el mejor modelo, éste se aplica para iniciar la búsqueda del árbol óptimo en programas como PAUP* (Swoford, 2002) y MrBayes (Huelsenbeck y Ronquist, 2001), los cuales miden la verosimilitud o las probabilidades bayesianas de los árboles en competencia (De Luna *et al.*, 2005)

Las medidas de confiabilidad en los análisis filogenéticos permiten identificar árboles o partes de ellos que se encuentran bien apoyados por los datos y que pueden ser adecuados en las inferencias biológicas evolutivas (Alfaro *et al.*, 2003). El método de confiabilidad más utilizado ha sido el método de *bootstrapping* (Efron, 1979), el cual involucra re-muestreos aleatorios con reemplazo de los caracteres provenientes de los datos originales, con el fin de generar matrices de datos idénticas en tamaño a la matriz original. Estas pseudoréplicas luego son sujetas a las mismas búsquedas filogenéticas que el conjunto de datos original. El soporte de bootstrap de un grupo de interés se calcula como la proporción de veces que se obtiene el grupo en las pseudoréplicas (Alfaro *et al.*, 2003). Otro método de confiabilidad es el método de inferencia bayesiano, el cual combina la probabilidad previa a la filogenia con la verosimilitud para producir una distribución de probabilidad posterior en el árbol, que puede ser interpretada como la probabilidad de que una agrupación sea correcta. A diferencia del método de bootstrap que puede definirse como una medida de repetibilidad, la probabilidad posterior bayesiana se define como la probabilidad de que un grupo sea monofilético (Huelsenbeck *et al.*, 2001).

III. OBJETIVOS

GENERAL

Reconstruir la filogenia del clado *Beaucarnea-Calibanus* (Ruscaceae) basada en las secuencias de los espaciadores de transcripción interna (ITS) del nrDNA y con base en ella, brindar las bases para determinar si las papilas de los surcos estomáticos de las hojas de las especies del clado son una adaptación a la sequía.

PARTICULARES

- ✚ Contribuir con la primer filogenia molecular del clado *Beaucarnea-Calibanus* (Ruscaceae) y determinar si el grupo en estudio y los géneros que lo integran son monofiléticos.
- ✚ Proporcionar las bases moleculares para una revisión taxonómica exhaustiva del caldo.
- ✚ Contribuir con secuencias de ITS de ambos géneros al banco de datos de genes (GenBank) para su uso en estudios posteriores.
- ✚ Utilizar la hipótesis filogenética inferida para determinar si la variación morfológica de los caracteres foliares en estudio podrían ser una adaptación al ambiente o si son producto de la cercanía filogenética de las especies.
- ✚ Aportar imágenes foliares de M.E.B. que contribuyan al conocimiento y entendimiento de estas plantas y que sirvan de base para estudios posteriores.
- ✚ Aportar material herborizado de ambos géneros para la colección del Herbario Nacional de México (MEXU), para su uso en biología y en otras áreas del conocimiento.

IV. HIPÓTESIS

FILOGENÉTICA

Si *Beaucarnea* y *Calibanus* son géneros hermanos que comparten un ancestro común, la posición de los caracteres moleculares en los árboles filogenéticos inferidos por los métodos de parsimonia y probabilísticos debe representar la monofilia de los géneros *Beaucarnea* y de *Calibanus*.

ADAPTATIVA

Si las papilas en la periferia de los surcos estomáticos de las hojas de las especies del clado son una adaptación a las condiciones ambientales de precipitación y/o temperatura en que viven, esperamos observar una correlación entre los caracteres morfológicos de las papilas y las variables de precipitación y/o temperatura del hábitat de las especies, independientemente de que las especies pertenezcan a uno u otro clado.

V. JUSTIFICACIÓN

La estrecha relación que mantienen las plantas con el medio ambiente las hace excelentes organismo de estudio en términos adaptativos. Las dicotiledóneas han sido las plantas más estudiadas por excelencia, pero existen otro tipo de plantas igualmente importantes y completamente distintas como es el caso de las monocotiledóneas. Es por ello que el estudio de los géneros *Beaucarnea* y *Calibanus* resulta importante, ya que además de ser plantas monocotiledóneas poseen una alta disparidad (diversidad morfológica), un reducido número de especies y una distribución prácticamente restringida a México.

Los miembros del clado *Beaucarnea-Calibanus* son muy importantes en la supervivencia de una gran variedad de insectos, epifitas e incluso de hongos micorrízicos (ver Cardel *et al.*, 1997; Camargo-Ricalde *et al.*, s/a) y comercialmente hablando son también muy importantes debido a su alto valor ornamental. Sin embargo, el estado de conservación de las especies de *Beaucarnea* es preocupante, ya que las plantas silvestres, particularmente los individuos jóvenes y las semillas, son sobrecolectadas para su venta y extracción ilegal del país. Este problema es crítico debido a la grave reducción de las poblaciones naturales, exponiéndolas a un estado de amenaza o de posible extinción (Hernández-Sandoval *et al.*, 2001). La incapacidad para distinguir claramente a las especies dificulta la implementación de programas de conservación y la formulación de leyes precisas y efectivas para su protección. Es por esto que los trabajos taxonómicos y sistemáticos resultan de suma importancia. El presente estudio brinda una base esencial para una revisión taxonómica moderna del clado al utilizar datos de secuencias de nucleótidos; también contribuye con información sobre datos morfológicos y ambientales útiles en los esfuerzos de conservación.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

VI.I COLECTA DE MUESTRAS

Se colectaron muestras de las especies de *Beaucarnea* y de *Calibanus* presentes en el Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM (JB-IBUNAM) con el fin de conocerlas y estandarizar las técnicas de extracción, amplificación y secuenciación del nrDNA foliar. Posteriormente se realizaron viajes de colecta a los sitios reportados con la presencia de las especies en forma silvestre (Hernández, 1992; Hernández, 2001; Hernández y Zamudio, 2003). Se realizó un viaje a Puebla y a Oaxaca para la colecta de muestras de *Beaucarnea gracilis*, *B. stricta*, *B. purpusii*, *B. congesta* y *B. sanctomariana* (aunque no pudieron colectarse muestras de esta última especie). Se realizó otro viaje al estado de Guanajuato para colectar muestras de *Calibanus hookerii*, *C. glassianus* y *Beaucarnea compacta*, y al estado de Tamaulipas por muestras de *B. recurvata*. Uno más al estado de Guerrero para colectar muestras de *Beaucarnea hiriartiae*; otro a Quintana Roo por muestras de *B. pliabilis*; otro más al estado de Chiapas por muestras de *B. goldmanii* y un viaje a Guatemala para colectar muestras de *B. guatemalensis* y *B. goldmanii*. El registro de las colectas se encuentra en la **Tabla 2** y los datos de colecta en el **Anexo 2**.

Tabla 2. Registro de colecta de las muestras por especie de *Beaucarnea* y *Calibanus* utilizadas en los análisis. Número de colecta, especie de la que fueron tomadas las muestras foliares, localidad de colecta, colector y fecha de colecta. JB-IBUNAM = Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM.

No. Colecta	ESPECIE	LOCALIDAD	COLECTOR	FECHA DE COLECTA
	<i>B. stricta</i>	Puebla	M. Olson	5-Mayo-04
	<i>B. hiriartiae</i>	Guerrero, Eduardo Neri	M. Olson	5-Mayo-05
2	<i>B. goldmanii</i>	JB-IBUNAM	V. Rojas	13-Mar-06
3	<i>B. recurvata</i>	JB-IBUNAM	V. Rojas	13-Mar-06
4	<i>B. hiriartiae</i>	JB-IBUNAM	V. Rojas	13-Mar-06
5	<i>C. hookerii</i>	JB-IBUNAM	V. Rojas	13-Mar-06
6	<i>B. stricta</i>	JB-IBUNAM	V. Rojas	17-Mar-06
7	<i>B. gracilis</i>	JB-IBUNAM	V. Rojas	17-Mar-06
8	<i>B. pliabilis</i>	JB-IBUNAM	V. Rojas	17-Mar-06
9	<i>B. gracilis</i>	Puebla, Tehuacán	V. Rojas y R. Medina	7-Aug-06
10	<i>B. gracilis</i>	Puebla, Zapotitlán	V. Rojas y R. Medina	7-Aug-06
11	<i>B. gracilis</i>	Puebla, Zapotitlán	V. Rojas y R. Medina	7-Aug-06
14	<i>B. purpusii</i>	Puebla, Zapotitlán	V. Rojas y R. Medina	9-Aug-06
15	<i>B. purpusii</i>	Puebla, Zapotitlán	V. Rojas y R. Medina	9-Aug-06
16	<i>B. purpusii</i>	Puebla, Zapotitlán	V. Rojas y R. Medina	9-Aug-06
17	<i>B. gracilis</i>	Puebla, Tehuacán	V. Rojas y R. Medina	9-Aug-06
18	<i>B. gracilis</i>	Oaxaca, Huajuapán	V. Rojas y R. Medina	9-Aug-06
19	<i>B. gracilis</i>	Oaxaca, Huajuapán	V. Rojas y R. Medina	9-Aug-06
20	<i>B. stricta</i>	Oaxaca, Cuicatlán	V. Rojas y R. Medina	11-Aug-06
21	<i>B. stricta</i>	Oaxaca, Cuicatlán	V. Rojas y R. Medina	11-Aug-06
22	<i>B. stricta</i>	Oaxaca, Cuicatlán	V. Rojas y R. Medina	11-Aug-06
23	<i>B. purpusii</i>	Oaxaca, Cuicatlán	V. Rojas y R. Medina	11-Aug-06
24	<i>B. purpusii</i>	Oaxaca, Cuicatlán	V. Rojas y R. Medina	11-Aug-06
25	<i>B. gracilis</i>	Oaxaca, Cuicatlán	V. Rojas y R. Medina	11-Aug-06
26	<i>B. purpusii</i>	Oaxaca, Cuicatlán	V. Rojas y R. Medina	11-Aug-06
27	<i>C. hookeriii</i>	Guanajuato	V. Rojas y M. Olson	04-Sep-06
38	<i>B. recurvata</i>	Tamaulipas, Antigua Morelos	V. Rojas y M. Olson	08-Sep-06
29	<i>B. recurvata</i>	Tamaulipas, Antigua Morelos	V. Rojas y M. Olson	08-Sep-06
30	<i>B. recurvata</i>	Tamaulipas, Antigua Morelos	V. Rojas y M. Olson	08-Sep-06
31	<i>B. compacta</i>	Guanajuato, Xichú	V. Rojas y M. Olson	10-Sep-06
32	<i>B. compacta</i>	Guanajuato, Xichú	V. Rojas y M. Olson	10-Sep-06
33	<i>B. compacta</i>	Guanajuato, Xichú	V. Rojas y M. Olson	10-Sep-06
34	<i>C. glassianus</i>	Guanajuato, Xichú	V. Rojas y M. Olson	10-Sep-06
35	<i>C. glassianus</i>	Guanajuato, Xichú	V. Rojas y M. Olson	10-Sep-06
36	<i>C. glassianus</i>	Guanajuato, Xichú	V. Rojas y M. Olson	10-Sep-06
E-424	<i>B. hiriartiae</i>	Guerrero, Cañón del Zopilote	R. Medina	23-Aug-06
E-425	<i>B. hiriartiae</i>	Guerrero, Cañón del Zopilote	R. Medina	23-Aug-06
E-426	<i>B. hiriartiae</i>	Guerrero, Cañón del Zopilote	R. Medina	23-Aug-06
44	<i>B. pliabilis</i>	Quintana Roo	A. Cervantes	29-Dic-06
1004	<i>B. guatemalensis</i>	Guatemala	J.C. Montero, L. Trejo, M. Véliz	31-Ene-07
1033	<i>B. guatemalensis</i>	Guatemala	J.C. Montero, L. Trejo	05-Feb-07
5	<i>B. goldmanii</i>	Guatemala, Alta Verapaz	L. Trejo	05-Feb-07
1103	<i>B. goldmanii</i>	Chiapas	M. E. Olson	14-May-07
1124	<i>B. congesta</i>	Oaxaca, Nizanda	M. E. Olson	20-May-07

A. MUESTRAS PARA EXTRACCIÓN DE DNA

Se colectaron las hojas más jóvenes posibles del centro de 1 a 2 rosetas por individuo (2 a 3 individuos por población) y se colocaron en sílica gel dentro de pequeñas bolsas de plástico con sellado hermético con el fin de deshidratar el tejido inmediatamente. Se rotularon debidamente y se guardaron para ser procesadas en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología, UNAM.

B. MUESTRAS PARA HERBARIO

Se colectaron cuatro hojas maduras que ya habían alcanzado el máximo crecimiento en la roseta. Se prensaron, rotularon y se fotografió cada individuo colectado en el campo (registro particular). Las muestras se enviaron al Herbario Nacional MEXU.

C. MUESTRAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (M.E.B.)

Se colectaron dos hojas maduras por especie de 1 o 2 rosetas y se colocaron en alcohol al 70% para iniciar su deshidratación y posteriormente fueron procesadas en el laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido del Instituto de Biología, UNAM.

VI.II ESTUDIO MOLECULAR

A. SELECCIÓN DEL GRUPO EXTERNO:

El clado *Nolina-Dasyilirion* fue seleccionado como grupo externo debido a que es el clado hermano de *Beaucarnea* y *Calibanus*, según los diversos estudios de Agavaceae (Dahlgren *et al.*, 1985; Álvarez de Zayas, 1987; Duvall *et al.*, 1993; Eguiarte *et al.*, 1994; Eguiarte, 1995; Bogler, 1995; Hernández, 1995; Bogler y Simpson, 1996) (**Figura 14**) y de Ruscaceae/Convallariaceae (Rudall *et al.*, 2000a). Los cuatro géneros conforman a las Nolinoides (antes Nolinaceae).

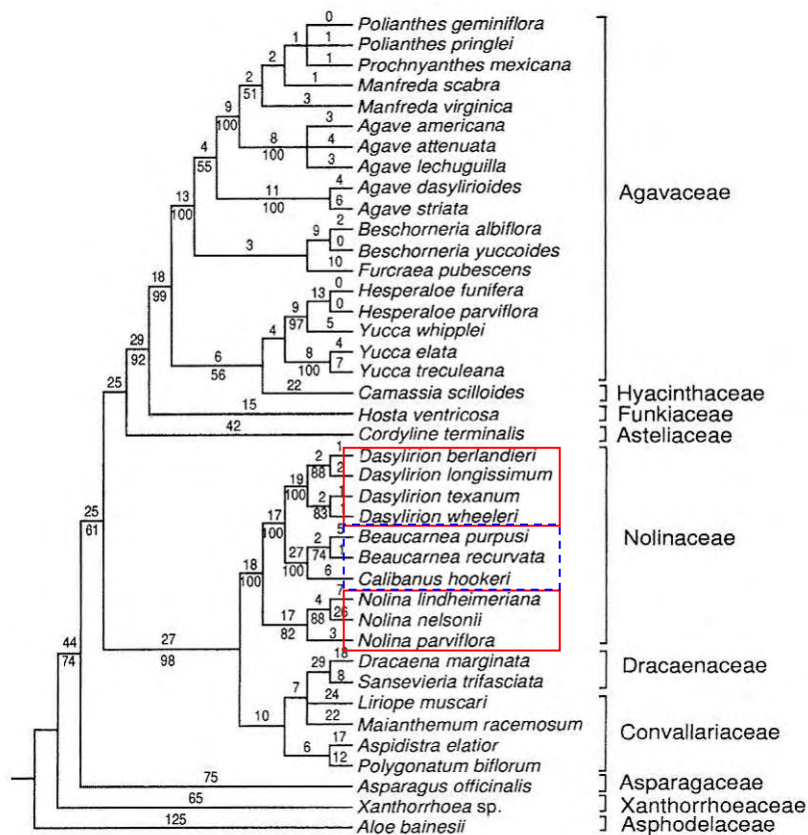


Figura 14. Filogenia de Agavaceae basada en variaciones de las secuencias ITS del rDNA (Bogler y Simpson, 1996). Las especies enmarcadas con----- corresponden al clado *Beaucarnea-Calibanus*. Las especies enmarcadas con_____ corresponden al clado *Nolina-Dasyilirion*.

Las secuencias de las especies del clado y del grupo externo previamente publicadas en GenBank fueron utilizadas para comparar las secuencias obtenidas en este trabajo, así como para delimitar a los espaciadores de transcripción interna del nrDNA y a los genes codificantes 18S, 5.8S y 26S; estas secuencias no fueron incluidas en los análisis. En la **Tabla 3** se encuentran las especies obtenidas del GenBank y su número de acceso.

Tabla 3. Número de acceso a las secuencias ITS de las especies de *Beaucarnea*, *Calibanus*, *Dasyilirion* y *Nolina* obtenidas del GenBank. * = Especies del grupo externo.

ESPECIE	ACCESO A GENBANK	
	ITS 1	ITS 2
<i>B. purpusii</i> Rose	U24006	U24026
<i>B. recurvata</i> Lem	U24007	U24027
<i>C. hookerii</i> Trel	U24009	U24029
* <i>D. berlandieri</i>	U24011	U24032
* <i>D. longissimum</i>	U24012	U24033
* <i>D. wheeleri</i>	U24014	U24035
* <i>D. texanum</i>	U24013	U24034
* <i>N. nelsonii</i>	U23986	U24045
* <i>N. lindheimeriana</i>	U23985	U24044

B. EXTRACCIÓN DEL DNA GENÓMICO

Se probaron distintos protocolos de extracción siendo el más satisfactorio el de Edwards *et al.* (1994) con adición de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1) (Olson, 2002). Se pesaron 0.05 mg de tejido previamente deshidratado con sílica-gel y se pulverizó con nitrógeno líquido. Se lisó el tejido con 700µl de buffer de extracción (Tris 1M HCl Ph 7.5; NaCl 5M; EDTA 0.5M Ph 8.0; SDS 10%; ddH₂O) y se solubilizaron las proteínas, los polisacáridos y el detergente con 700µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:24:1). Se precipitó el DNA con 700µl de isopropanol previamente enfriado, se lavó el extracto con 700 µl de alcohol al 70%, se resuspendió con 40 µl de ddH₂O y se digirió con 2 µl de RNAasa (RNAase, QIAGEN).

C. AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN ITS1-5.8S-ITS2 DEL nrDNA POR PCR Y PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO

Se probaron los oligos utilizados por Bogler y Simpson (1996) para amplificar la región completa ITS1-5.8S-ITS2 y los pares de oligos ITS1/ITS3 e ITS2/ITS4 para amplificar las regiones ITS por separado (ITS1 e ITS2), pero no se obtuvieron resultados satisfactorios en la mayoría de las muestras. A continuación se probaron los oligos AB101 (5'-ACGAATTCATGGTCCGGTGAAGTGTTTCG-3') y AB102 (5'-TAGAATTCCTCCGGTTCGCTCGCCGTTAC-3') (Douzery *et al.*, 1999), los cuales resultaron satisfactorios para todas las muestras. Estos oligos se anclan al gen 18S y 26S respectivamente.

Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen final de 50µl conteniendo 31µl de ddH₂O, 5µl de Buffer de PCR 10x (PCR buffer, QIAGEN), 10µl de Solución Q 5x (Q-solution, QIAGEN), 1µl de mezcla de dNTPs (dNTP-mix, QIAGEN) conteniendo 10Mm de cada dntp (datp, dgtp dttp dctp), 0.5µl de MgCl₂ 25Mm

(QIAGEN), 0.5 μ l de cada iniciador 10 μ mol/L (AB101 y AB102), 0.5 μ l de polimerasa de DNA con 5 unidades/ μ l (taq DNA polymerase, QIAGEN) y 1 μ l de DNA extraído. El programa de PCR se llevó a cabo en un termociclador (DNA Engine Peltier Thermal Cyclers, Bio Rad) y consistió de un calentamiento inicial de 94°C durante 2 seg para iniciar la desnaturalización del DNA y 35 ciclos constituidos por 94°C durante 40 seg para desnaturalizar el DNA y lograr la completa separación de las hebras; 48°C durante 1 min para alinear los iniciadores y 72°C durante 1 min para polimerizar la nueva hebra. Al final de los 35 ciclos la temperatura se mantuvo en 72°C durante 3 min para permitir que las nuevas hebras terminaran de polimerizarse y finalmente se mantuvo a 4°C hasta ser removido del termociclador. Los productos de PCR fueron visualizados mediante una electroforesis con gel de agarosa previamente teñido con bromuro de etidio a través de un transiluminador de electroforesis con luz ultra violeta (Kodak EDAS 290 High Performance Ultraviolet Transilluminator). Una vez lograda una amplificación satisfactoria, se prosiguió con la purificación de los productos mediante el kit de purificación QIAquick PCR Purification kit de QIAGEN.

D. REACCIÓN DE SECUENCIACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO

Se realizaron dos reacciones de secuenciación por muestra, una con el iniciador 5' y otra con el iniciador 3'. Cada reacción de secuenciación fue realizada en un volumen final de 10 μ l conteniendo 2 μ l de ddH₂O, 2 μ l de BigDye[®] (Terminator v3.1 Cycle 2.5x Sequence Buffer, Applied Biosystems), 1 μ l de cada iniciador (AB101 y AB102) 10 μ mol/L y 3 μ l de DNA purificado. El Programa de PCR de 24 ciclos consistió de 96°C durante 1 seg para desnaturalizar el DNA, 48°C durante 5 seg para alinear los iniciadores marcados con BigDye, y 60°C durante 4 min para polimerizar las hebras. Al final de los 24 ciclos la temperatura se mantuvo a 4°C hasta ser removido del termociclador. Los productos fueron purificados con

QIAprep Spin Miniprep kit de QIAGEN, liofilizados y analizados en un secuenciador de DNA automático ABI.

E. ALINEACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE LA REGIÓN COMPLETA

Las secuencias fueron editadas con el programa Sequencher 4.6 (1991-2006, Gene Codes Corporation) y alineadas manualmente con el programa Se-Al (v2.0a11, Rambaut, 2002). Los límites de las secuencias entre las dos regiones del ITS y las tres regiones codificantes (18S, 5.8S y 26S) del nrDNA fueron determinadas al comparar las secuencias publicadas en GenBank de *Beaucarnea purpusii* Rose (Hernández, ITS1: U24006; ITS2: U24026), *Beaucarnea recurvata* Lem (Bogler, ITS1:U24007; ITS2: U24027) y *Calibanus hookerii* Trel (Hernández, ITS1: U24009; ITS2: U24029). Con el fin de evitar ambigüedades por información imprecisa obtenida por el secuenciador en las regiones del 26S y 18S del nrDNA de algunas muestras, se estandarizó el tamaño de todas las secuencias de acuerdo al tamaño de las secuencias del GenBank (ITS1 = 243 a 247 pb, ITS2 = 226 a 230 pb).

F. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS SECUENCIAS

Se realizaron análisis de parsimonia, bayesianos y de máxima verosimilitud con el fin de comparar las topologías óptimas y sustentar la hipótesis filogenética. El criterio de optimalidad de parsimonia se empleó con el programa PAUP* versión 4.0b10 (Swofford, 2002) en una computadora Macintosh. Todos los caracteres fueron tratados como no ordenados y con pesos iguales. Se condujeron búsquedas heurísticas usando 1,000 réplicas de adición al azar reteniendo 100 árboles en cada paso. El algoritmo de intercambio de ramas TBR (tree bisection and reconnection) se utilizó para encontrar el árbol más corto en todos los análisis. El apoyo de ramas fue evaluado usando PAUP* con 1,000 réplicas de bootstrap

(Felsenstein, 1985), con las opciones TBR en búsqueda heurística con una secuencia de adición simple.

Para el análisis de máxima verosimilitud (MV) (*maximum likelihood*; ML) se eligió el mejor modelo de evolución de DNA para los datos de entre 56 modelos anidados usando el programa ModelTest v3.7 (Posada y Crandall, 1998). El modelo que mejor explicó los datos de acuerdo al criterio de información de Akaike fue el modelo General de Tiempo Reversible (*general time reversible*; GTR) con una proporción estimada de sitios invariables y una tasa de heterogeneidad con distribución gamma (GTR+I+ Γ , Γ shape = 0.4609, p[inv] = 0.000). Las búsquedas de MV se llevaron a cabo con el programa GARLI 951-GUI (Zwickl, 2006). Se realizaron tres repeticiones a partir de árboles iniciales aleatorios utilizando las opciones predeterminadas. Para medir el soporte de clados bajo MV se generaron 1 000 réplicas de bootstrap no paramétricas. Con el fin de obtener una estimación adicional de soporte de clados se condujo una inferencia bayesiana utilizando el mismo modelo molecular que en MV. Se condujeron simultáneamente cuatro cadenas de Markov iniciando a partir de un árbol aleatorio por 1 000 000 generaciones utilizando el programa MrBayes v.3.04 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001), salvando un árbol cada 100 generaciones. La asíntota (estásis) fue valorada visualmente mediante el software StartView v.4.5 (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). Los árboles anteriores al estásis fueron excluidos y los árboles restantes fueron utilizados para calcular las probabilidades posteriores bayesianas (PP).

VI.III ESTUDIO MORFOLÓGICO

A. VARIABLES BIOCLIMÁTICAS

Se asignaron variables bioclimáticas a cada registro de localidad georeferenciada mediante la extensión GetGrid del Sistema de Información Geográfica ArcView 3.2 (ESRI 1999) con la colaboración de la Dra. Patricia Feria Arroyo de la FES Zaragoza, UNAM. La escala considerada fue la extensión de México con una resolución de grano de 0.0833 (aprox. 1x1 km) por celda. Todas las capas de datos fueron acortadas a la extensión de México por lo que la proyección, el tamaño de celda y la extensión espacial fueron consistentes a lo largo de las capas. Las variables ambientales fueron tomadas del programa Worldclim (Hijmans *et al.*, 2005) (**Tabla 4**).

Tabla 4. Variables bioclimáticas utilizadas en el estudio con su abreviatura (Worldclim: Hijmans *et al.*, 2005).

ABREVIATURA	VARIABLE AMBIENTAL
PCF	Precipitación en el Cuarto más Frío del año
PCC	Precipitación en el Cuarto más Cálido del año
PPS	Precipitación en el Cuarto más Seco del año
PPL	Precipitación en el Cuarto más Húmedo del año
EP	Precipitación Estacional (Coeficiente de Variación)
PA	Precipitación en el Mes más Seco del año
PPLL	Precipitación en el Mes más Húmedo del año
TPA	Precipitación Anual
TPCF	Temperatura Media en el Cuarto más Frío del año
TPCC	Temperatura Media en el Cuarto más Cálido del año
TPCS	Temperatura Media en el Cuarto más Seco del año
TPCLL	Temperatura Media en el Cuarto más Húmedo del año
OAT	Rango Anual de Temperatura (TMPPF-TMPPC)
TMPPF	Temperatura Mínima del Mes más Frío del año
TMPPC	Temperatura Máxima del Mes más Cálido del año
ET	Temperatura Estacional (desviación estándar *100)
ISO	Isotermalidad (OAT/ODT) (* 100);
ODT	Media del Rango Diurno [Media mensual (temp max – temp mín)]
TA	Temperatura Media Anual

B. MICROFOTOGRAFÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

Se tomaron microfotografías de la superficie de las hojas de las especies de *Beaucarnea* y de *Calibanus* colectadas en el campo y en el Jardín Botánico (JB-UNAM) con un Microscopio Electrónico de Barrido (M.E.B.) de alto vacío (HITACHI S-2460N Scanning Electron Microscope) en el laboratorio de Microscopía Electrónica del Instituto de Biología, UNAM, con la ayuda de la M. en C. Berenit Mendoza Garfias. El procedimiento para preparar las muestras fue el siguiente:

- i. Se cortaron muestras de hoja de cada especie colectada de aproximadamente 5 mm de alto por el ancho de la hoja y se colocaron en tubos viales con alcohol al 70% para iniciar la deshidratación del tejido y posteriormente al 100% para deshidratarlas completamente.
- ii. Se substituyó completamente el alcohol absoluto de cada muestra por CO₂ líquido en una cámara de punto crítico, la cual aumenta la presión y la temperatura hasta el punto en el que el CO₂ pasa del estado líquido al gaseoso (punto crítico), sin modificar la estructura celular de la muestra. A continuación se bajó la presión completamente y se obtuvieron las muestras plenamente deshidratadas e íntegras estructuralmente.
- iii. Una vez deshidratadas las muestras se montaron en porta-muestras de aluminio con cinta de carbón adherible y se cubrieron de oro mediante una evaporadora de oro EMITECH, la cual rocía una capa de oro de > 20µ sobre la superficie de la muestra. Esta capa provee de una mayor resolución de la toma fotográfica debido a que vuelve conductiva a la superficie permitiendo que forme parte del flujo de electrones, los cuales al chocar se difractan con mayor facilidad (M. Olson y B. Mendoza, com. pers).
- iv. A continuación se introdujo cada muestra bañada en oro en el M.E.B. a 15 kv y se tomaron microfotografías a los aumentos: 70x, 125x, 300x, 700x,

1.0x, 1.5x, 2.5x con el fin de observar el arreglo de los surcos, criptas estomáticas y papilas.

- v. Los negativos fueron escaneados y las imágenes fueron procesadas para construir las láminas.

C. CARACTERES MORFOLÓGICOS

Se eligieron como caracteres morfológicos el diámetro y la longitud de las papilas de los surcos estomáticos, con el fin de determinar si estos caracteres responden a las condiciones climáticas en que viven las plantas. En las **Figuras 15 y 16** se muestran imágenes de Microscopía Electrónica de Barrido (M.E.B.) y de microscopía óptica de una papila foliar y se indica dónde fueron tomadas las medidas.

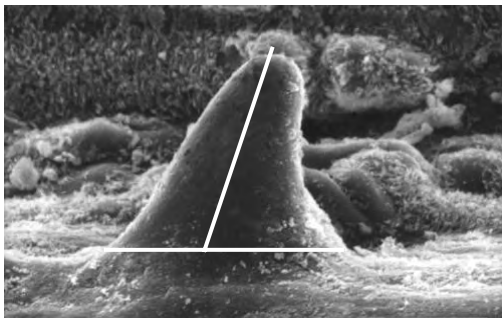


Figura 15. Imagen de M.E.B. de *Beaucarnea stricta*. Se muestra una papila foliar y con líneas blancas dónde fueron tomadas las medidas.

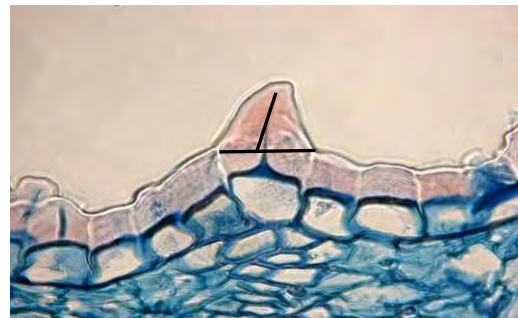


Figura 16. Imagen de microscopía óptica de *Beaucarnea guatemalensis*. Se muestra una papila foliar y con líneas negras dónde fueron tomadas las medidas

Las medidas de las papilas se realizaron a partir de los negativos escaneados de las microfotografías con ayuda del programa Image J 1.38x (<http://rub.info.nih.gov/ij>). Todas las medidas se estandarizaron de acuerdo a la escala a la que fueron tomadas las microfotografías.

Las hojas de las especies que no presentaron papilas se midieron a través de cortes transversales con ayuda de un microscopio compuesto Zeiss con micrómetro ocular con escala graduada en décimas de milímetros. En la **Figura 17** se muestra una imagen de microscopía óptica de *Beucarnea pliabilis* y se indica en dónde fueron tomadas las medidas, como estas plantas carecen de papilas, lo que se midió fue el borde que sobresale de la superficie cuticular de las células presentes en la periferia de los surcos estomáticos, lo anterior con el fin de hacer equivalentes las medidas con respecto a las especies que sí presentan papilas. En la **Figura 18** se encuentra una imagen de microscopio óptico de *Beucarnea purpusii* para mostrar cómo se observan las papilas en las especies que las presentan. Las mediciones fueron hechas bajo un aumento de 100x.

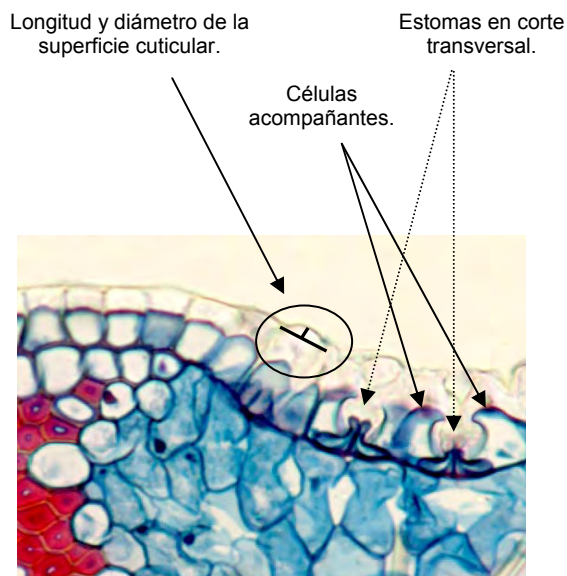


Figura 17. Imagen de microscopía óptica de *Beucarnea pliabilis*. Se muestra dónde fueron tomadas las medidas.

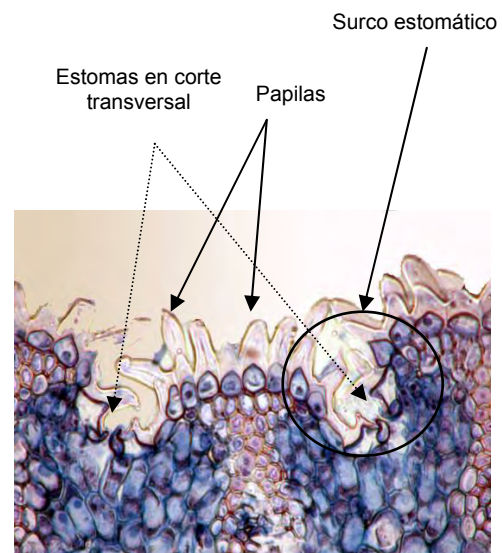


Figura 18. Imágen del microscopio óptico de *Beucarnea purpusii* en la que se muestran los surcos estomáticos con papilas.

Una vez colectados todos los datos, se obtuvo el promedio del diámetro y de la longitud de las papilas por especie. A continuación se sometieron a un análisis de correlación bivariado con ayuda del programa JMP IN v5.1 (©1989-2003, SAS Institute, Cary, NC) junto con las variables bioclimáticas con el fin de determinar si

existía una relación entre las condiciones ambientales de precipitación y de temperatura en que viven las plantas, y el diámetro y longitud de las papilas de los surcos estomáticos. Los valores de correlación cercanos a la unidad ($|r|$) y con un valor de significancia de $p=0.001$ (***), $p=0.05$ (**) o $p=0.1$ (*) fueron considerados como evidencia de correlación entre las variables.

D. MÉTODO COMPARATIVO Y FILOGENIA

Nos interesaba saber si los caracteres morfológicos, diámetro y longitud de las papilas de las hojas de las especies en estudio, eran producto de adaptación a las condiciones ambientales de temperatura y/o precipitación, pero para ello necesitábamos saber primero si violábamos o no el requisito de independencia estadística en nuestros análisis, es decir, necesitábamos estar seguros de que la similitud entre los caracteres morfológicos no se debía a que las especies son descendientes de un ancestro común (lo que se denomina *efecto filogenético*). Para poder tomar en cuenta las relaciones de parentesco entre los organismos, utilizamos un *método comparado filogenético* (MCF) desarrollado por la Dra. Rebeca Aguirre Hernández de la Facultad de Medicina, UNAM, el cual permite identificar similitud significativa entre miembros de clados. Es similar a otros MCF (Stearns, 1983; Giannini, 2003) pero se diferencia en que únicamente se basa en la topología y no en el largo de ramas; lo anterior con el fin de evitar suposiciones de tiempo y modo evolutivo que no pueden ser probadas al ser imposibles de distinguir en un árbol filogenético (como anagénesis gradualista vs cladogénesis puntuacional) (Olson y Aguirre, en preparación).

El desarrollo del método consistió en obtener el valor de correlación de la variable climática y del carácter morfológico más significativo y de evaluarlos con la hipótesis filogenética del clado generada con el modelo de máxima verosimilitud en este trabajo. Lo anterior se logró mediante la inclusión de variables indicadoras

de clado o dummies, las cuales representan membresía en cada clado en el grupo de interés.

Se construyeron tantos modelos de regresión como número de variables indicadoras de clado. En este caso, ajustamos 6 regresiones múltiples; cada variable morfológica como variable de respuesta y como variables independientes una variable ambiental y una variable indicadora de clado. Las regresiones múltiples se ajustaron en el ambiente computacional R (R Development Core Team, 2007). El modelo de regresión tuvo la siguiente forma:

$$\ln y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2$$

Donde, $\ln y$ = logaritmo natural del carácter morfológico en cuestión, β_0 = intercepto; β_1 = pendiente asociada a x_1 ; x_1 = variable climática en cuestión; β_2 = pendiente asociada a x_2 ; x_2 = variable indicadora de clado.

Finalmente, se evaluó la significancia de las variables indicadoras de clado y se determinó la existencia de efecto filogenético asociado al carácter y a la variable climática en cuestión, bajo la premisa de si la probabilidad (p) del coeficiente asociado con x_2 es significativa, se concluye que existe efecto filogenético, es decir, que la membresía en un clado ayuda a explicar la variación en la variable de respuesta.

En resumen, primero se observó qué variables morfológicas y ambientales estaban más correlacionadas (correlación de Pearson), para aquellas variables de correlación significativa se ajustaron los modelos de regresión múltiple tomando en cuenta la filogenia, lo anterior con el fin de saber si dicha correlación se asociaba al ambiente o a que las especies se encuentran cercanamente emparentadas, es por ello que construimos variables indicadoras de clado (dummies) y las sometimos a regresiones múltiples con cada una de las variables ambientales

como variables independientes. A continuación evaluamos la significancia de β_2 , si β_2 resultaba significativa, se determinaría que la membresía en un clado ayuda a explicar la variación en la variable de respuesta, y no únicamente la variable ambiental. Si β_2 no resultaba significativa, se determinaría que la variable ambiental ayuda a explicar la variación en la variable de respuesta (variable morfológica), es decir, que la relación entre las variables puede explicarse por adaptación al ambiente.

VII. RESULTADOS

VII.I ANÁLISIS MOLECULARES

A. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS

El tamaño total de la matriz de las secuencias alineadas (ITS1-5.8S-ITS2) fue de 643 pb. Las secuencias ITS1 midieron de 248 pb, las secuencias ITS2 midieron de 232 pb (dentro del rango reportado por Baldwin *et al.*, 1995 y Bogler y Simpson, 1996) y la región codificante midió 163 pb (**Anexo 3**). Fue necesario considerar 13 eventos de inserción/delección para alinear las secuencias. El contenido de G + C fue de 68% (similar a lo reportado por Bogler y Simpson, 1996). La divergencia nucleotídica entre pares de secuencias de la región ITS1-5.8S-ITS2 se encuentra en el rango de 0% - 16% con el valor más alto entre las secuencias de *Nolina nelsonii* y *Calibanus hookerii* (0.156). Dentro del grupo interno la divergencia nucleotídica se encuentra en el rango de 0% - 6% con el valor más alto entre las secuencias de *Beaucarnea pliabilis* y *Beaucarnea recurvata* (B.rec), *B. congesta* (B.con), *B. hiriartiae* (B.hir), *B. compacta* (B.com), *Calibanus glassianus* (C.gla) y *C. hookerii* (C.hoo); entre las secuencias de *Beaucarnea guatemalensis* (B.gua) y *Calibanus hookerii*; entre las secuencias de *B. gracilis* (B.gra) y *B. pliabilis* (B.pliabJB) y entre las secuencias de *B. purpusii* (B.pur) y *B. pliabilis* (B.pliQR). Entre *Calibanus glassianus* (C.gla) y *Beaucarnea compacta* (B.com), *B. goldmanii* (B.gol) y *B. guatemalensis* (B.gua), *B. pliabilis* (B.pliQR), *B. guatemalensis* (B.gua) y *B. goldmanii* (B.gol), la divergencia nucleotídica fue nula (**Tabla 5**).

Tabla 5. Número de sustituciones por 100 sitios de ITS1-5.8S-ITS2 en Nolinoides, según el modelo GTR+I+ Γ . *B.rec* = *Beaucarnea recurvata*, *B.con* = *Beaucarnea congesta*, *B.hir* = *Beaucarnea hiriartiae*, *B.com* = *Beaucarnea compacta*, *C.gla* = *Calibanus glassianus*, *C.hoo* = *Calibanus hookerii*, *B.gua* = *Beaucarnea guatemalensis*, *B.gol* = *Beaucarnea goldmanii*, *B.pliQR* = *Beaucarnea pliabilis* Quintana Roo, *B.pliJB* = *Beaucarnea pliabilis* Jardín Botánico, *B.strO* = *Beaucarnea stricta* Oaxaca, *B.strP* = *Beaucarnea stricta* Puebla, *B.strJB* = *Beaucarnea stricta* Jardín Botánico, *B.gra* = *Beaucarnea gracilis*, *B.pur* = *Beaucarnea purpusii*, *N.nel* = *Nolina nelsonii*, *D.ber* = *Dasyllirion berlandieri*. En **negritas** se marcan los valores más altos y más bajos.

	<i>B.rec</i>	<i>B.con</i>	<i>B.hir</i>	<i>B.com</i>	<i>C.gla</i>	<i>C.hoo</i>	<i>B.gua</i>	<i>B.gol</i>	<i>B.pli</i> QR	<i>B.pli</i> JB	<i>B.str</i> Oax	<i>B.str</i> Pue	<i>B.str</i> JB	<i>B.gra</i>	<i>B.pur</i>	<i>N.</i> <i>nel</i>
<i>B.rec</i>	0															
<i>B.con</i>	0.02															
<i>B.hir</i>	0.02	0.02														
<i>B.com</i>	0.01	0.02	0.03													
<i>C.gla</i>	0.01	0.02	0.03	0												
<i>C.hoo</i>	0.02	0.02	0.03	0.01	0.01											
<i>B.gua</i>	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06										
<i>B.gol</i>	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06	0									
<i>B.pliQR</i>	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0	0								
<i>B.pliJB</i>	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.01	0.01	0							
<i>B.strO</i>	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.05	0.05	0.05	0.05						
<i>B.strP</i>	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.05	0.05	0.05	0.05	0.01					
<i>B.strJB</i>	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02	0.05	0.05	0.05	0.05	0.01	0.01				
<i>B.grac</i>	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02	0.02	0.05	0.05	0.05	0.06	0.01	0.01	0.01			
<i>B.pur</i>	0.02	0.02	0	0.03	0.03	0.03	0.05	0.05	0.06	0.06	0.02	0.02	0.02	0.02		
<i>N.nel</i>	0.15	0.15	0.15	0.15	0.15	0.16	0.15	0.15	0.15	0.15	0.14	0.14	0.14	0.15	0.15	
<i>D.ber</i>	0.1	0.1	0.1	0.11	0.11	0.11	0.12	0.12	0.12	0.12	0.1	0.1	0.1	0.11	0.1	0.14

B. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

La matriz de datos contuvo 38 taxa y 642 caracteres de los cuales 106 resultaron parsimoniosamente informativos (63 de ITS1, 36 de ITS2 y 2 de 5.8S). A partir de estos datos, el análisis de parsimonia encontró 3 árboles más parsimoniosos ($L=137$, $CI=0.832$, $RI 0.955$). El árbol de consenso estricto se muestra en la **Figura 19**. El análisis de máxima verosimilitud (MV) eligió un árbol con un valor de $-\ln=1769.96804$ (**Figura 20**), cuya topología es congruente con el análisis de máxima parsimonia (MP) y cuyo filograma se muestra en la **Figura 21**. El análisis bayesiano se estabilizó a las 40 000 generaciones. Los 400 árboles iniciales fueron descartados y los 9 600 restantes fueron utilizados para calcular las probabilidades posteriores bayesianas (los valores se muestran en el árbol de MV, **Figura 20**). Las topologías obtenidos con base en las secuencias de ITS apoyan la monofilia de la asociación *Beaucarnea-Calibanus* ($BP^1=99\%$; $BMV^2=95\%$; $PP^3=0.99$). Los análisis de las secuencias suministraron un fuerte apoyo a la presencia de dos grandes clados en este grupo. Uno de ellos corresponde a las especies que crecen en los bosques húmedos de Chiapas, de la Península de Yucatán, Guatemala, Honduras y El Salvador, constituido por *Beaucarnea goldmanii*, *B. pliabilis* y *B. guatemalensis* ($BP=100\%$; $BMV=100\%$; $PP=1.0$). El otro corresponde a las especies del Altiplano Sur, la Sierra Madre Oriental, el Valle de Tehuacán-Cuicatlán y la Depresión del Balsas, constituido por *Beaucarnea gracilis*, *B. purpusii*, *B. stricta*, *B. hiriartiae*, *B. recurvata*, *B. congesta*, *B. compacta*, *Calibanus glassianus* y *C. hookerii* ($BP= 99\%$; $BMV=78\%$; $PP= 0.99$). En la **Figura 22** se muestra el filograma simplificado con el fin de mostrar los caracteres morfológicos y la distribución de las especies.

¹ Bootstrap de Parsimonia

² Bootstrap de Máxima Verosimilitud

³ Probabilidades Posteriores

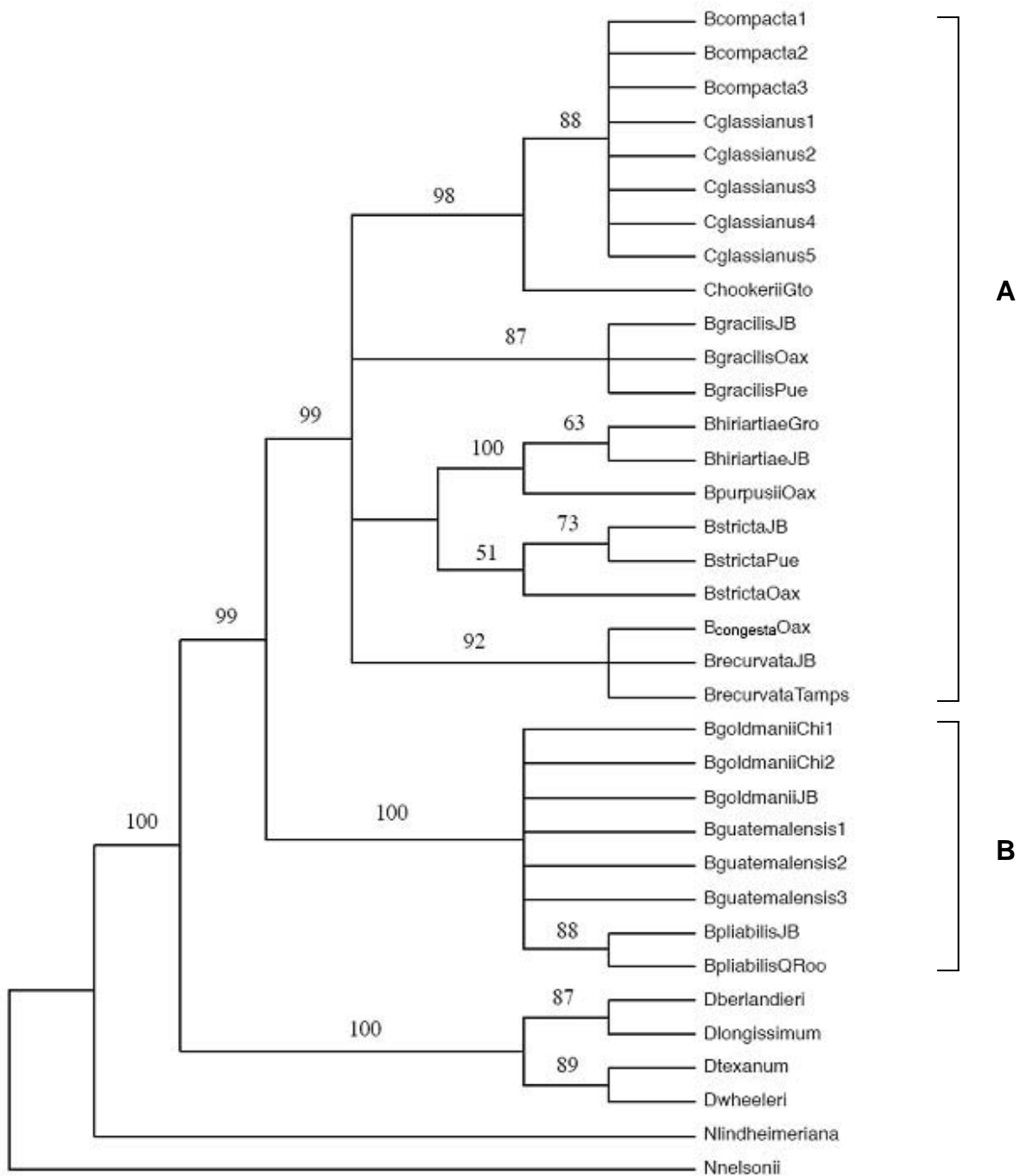


Figura 19. Árbol de consenso estricto de máxima parsimonia (MP) (L=137, CI=0.832, RI 0.955). Los números sobre las ramas indican el soporte de bootstrap. **A:** Clado constituido por las especies mexicanas. **B:** Clado constituido por las especies centroamericanas y del sur de México. Con las iniciales se denotan los estados y con los números se indican las muestras por especie de distintos individuos de una misma población. JB=Jardín Botánico, IBUNAM.

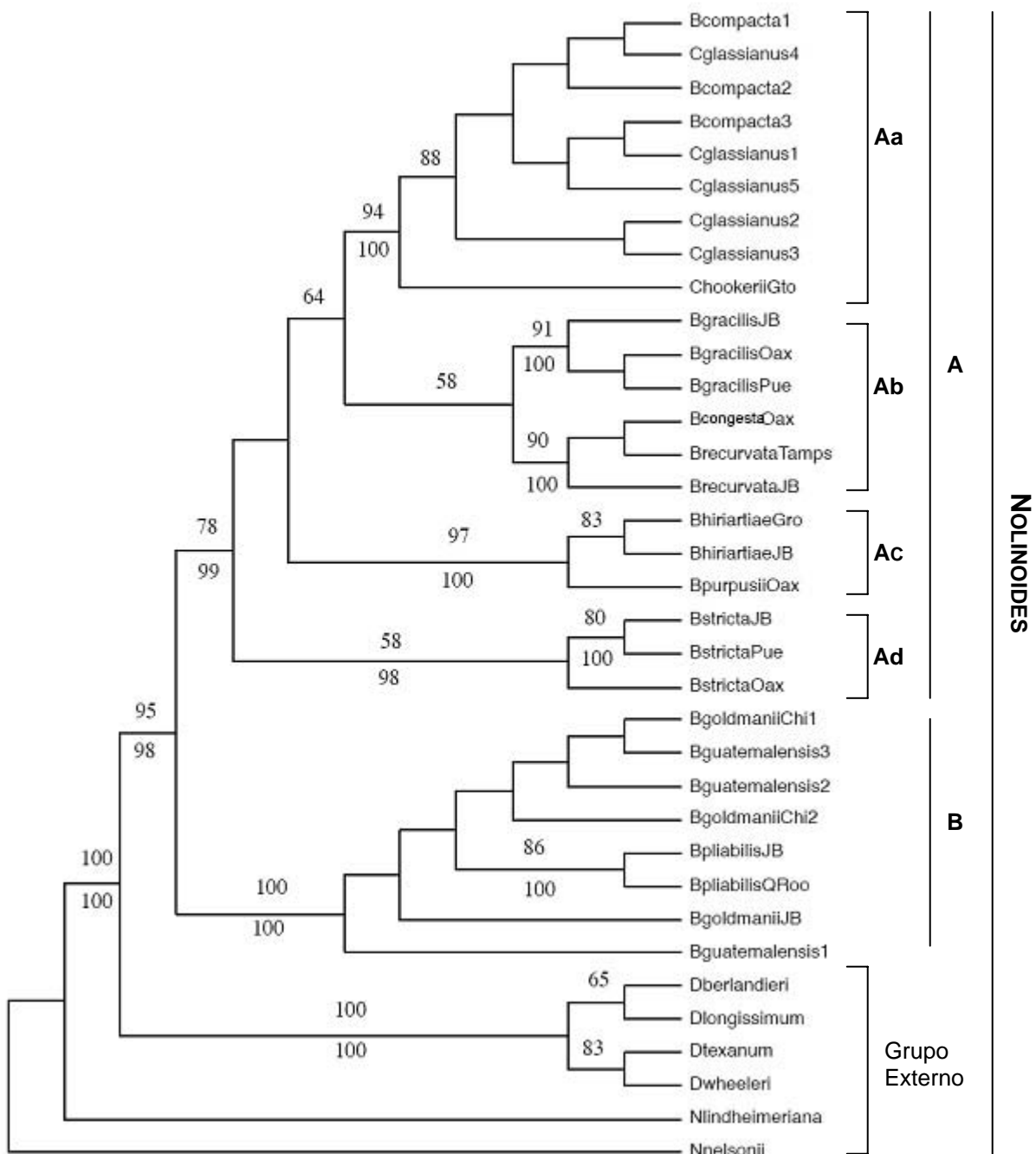


Figura 20. Árbol de máxima verosimilitud (MV) (GTR+I+ Γ , Γ shape = 0.4609, p[inv] = 0.000) (-Ln = 1769.96804). Los números sobre las ramas indican el soporte de bootstrap y los números debajo de las ramas indican las probabilidades posteriores bayesianas >95% de 1,000,000 generaciones. **A:** Clado constituido por: **Aa** = *B.compacta*-*C.glassianus*-*C.hookerii*; **Ab** = *B.gracilis*-*B.recurvata*-*B.congesta*; **Ac** = *B.hiriartiae*-*B.purpusii*; **Ad** = *B.stricta*; **B** = Clado compuesto por: *B.goldmanii*-*B.guatemalensis*-*B.pliabilis*. Con las iniciales se denotan los estados y con los números se indican las muestras por especie de distintos individuos de una misma población. JB=Jardín Botánico, IBUNAM.

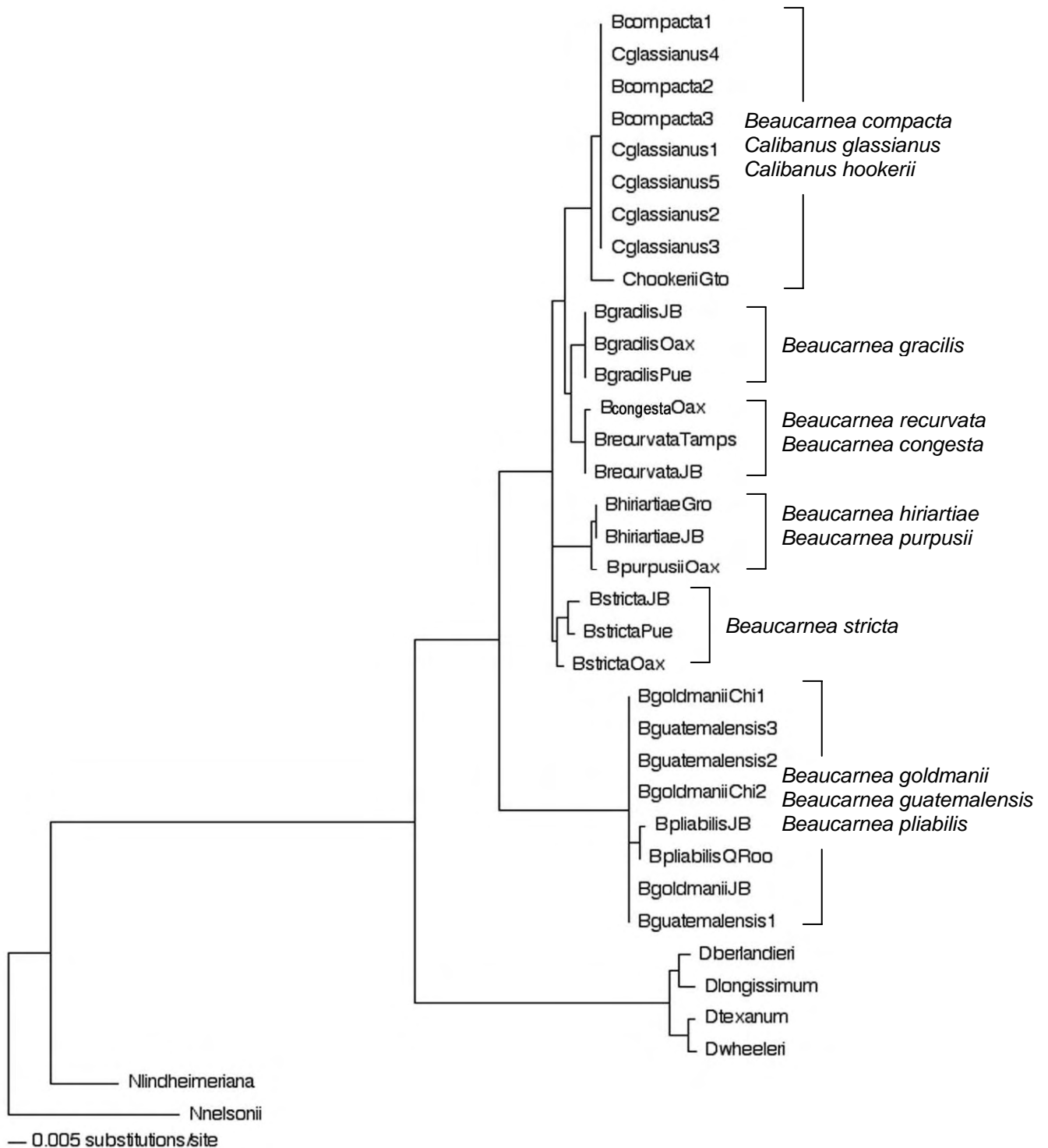


Figura 21. Filograma de máxima verosimilitud (GTR+I+ Γ , Γ shape = 0.4609, $p[\text{inv}] = 0.000$) (-Ln = 1769.96804). En la parte inferior izquierda se encuentra la medida base para el largo de ramas (0.005 sustituciones/sito). Se indican los integrantes de cada uno de los clados. Las iniciales denotan los estados donde fueron colectadas las muestras y con los números se indican las muestras por especie de distintos individuos de una misma población. JB=Jardín Botánico, IBUNAM.

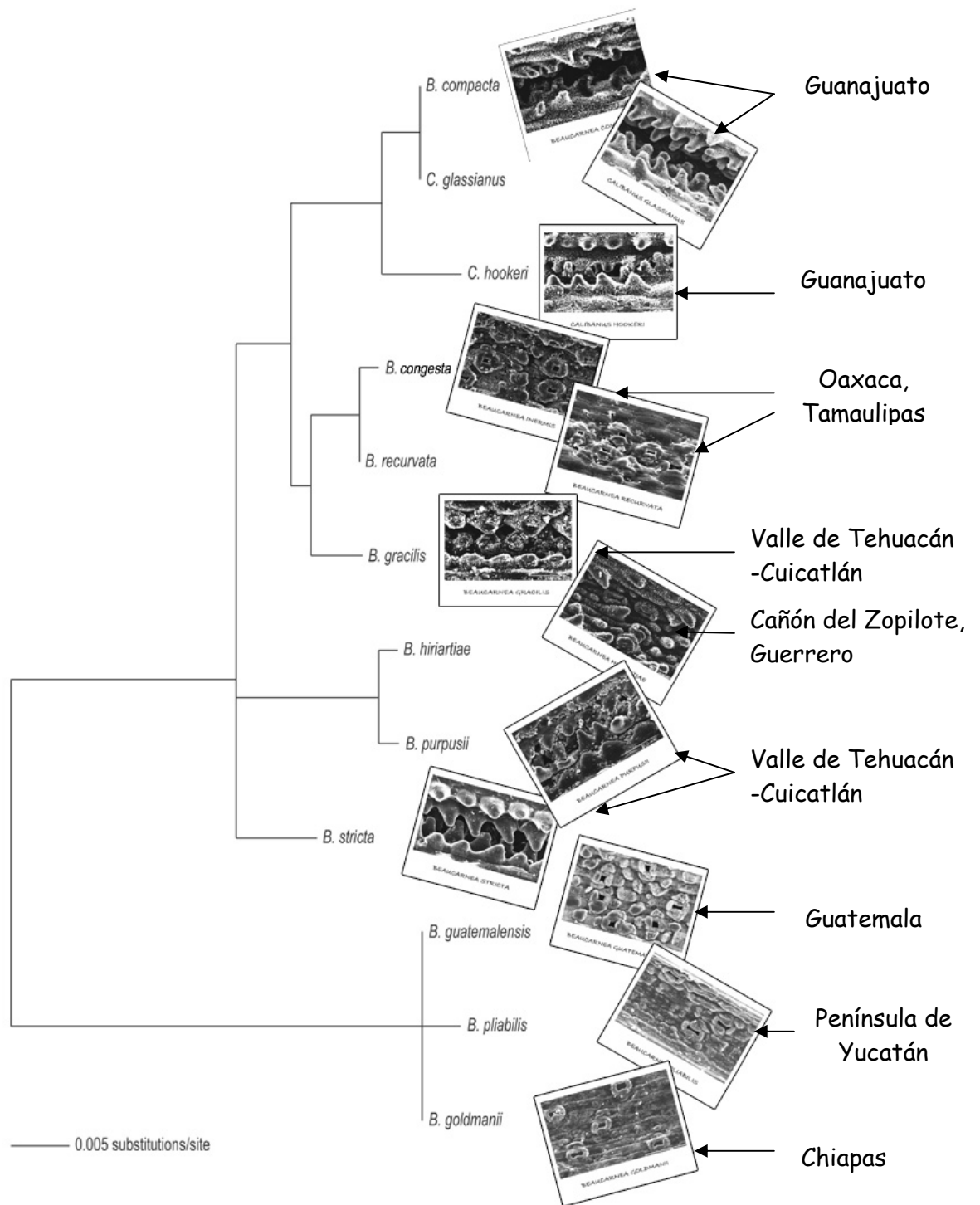


Figura 22. Filograma de MV simplificado. Se exhibe únicamente una muestra por especie del grupo interno. En la parte inferior izquierda se encuentra la medida base para el largo de ramas (0.005 sustituciones/sito). Las imágenes de M.E.B. muestran los caracteres en estudio por especie y a su lado derecho la localidad de colecta.

C. ANÁLISIS DE LOS CLADOS

CLADO A, CONFORMADO POR:

Aa. *B. compacta* - *C. glassianus* - *C. hookerii*

Ab. *B. gracilis* - *B. recurvata* - *B. congesta*

Ac. *B. hiriartiae* - *B. purpusii*

Ad. *B. stricta*.

Aa. *B. compacta* - *C. glassianus* - *C. hookerii*

Este clado aparece anidado dentro de *Beaucarnea* en todos los análisis (BP=98%; BMV=94%; PP=1.0). *Beaucarnea compacta* y *Calibanus glassianus* aparecen en politomía; no existen diferencias en las secuencias de esta región entre las especies.

Ab. *B. gracilis* - *B. recurvata* - *B. congesta*

Este clado se rescata bajo el análisis de máxima verosimilitud (BMV=58%) aunque bajo el análisis de máxima parsimonia aparece en politomía (BP=99%). La monofilia de *Beaucarnea gracilis* fue evidente en los tres análisis (BP=87%; BMV=91%; PP=1.0). No hay diferencias en las secuencias de este locus entre *Beaucarnea gracilis* de Puebla, Oaxaca y del Jardín Botánico. El clado *Beaucarnea recurvata* - *B. congesta* se apoya con el análisis de máxima verosimilitud y bayesiano (BMV=90%; PP=1.0). Bajo el criterio de máxima parsimonia aparece en politomía y bajo el criterio de máxima verosimilitud aparece como clado hermano de *Beaucarnea gracilis* (BMV=58%). No existen diferencias en las secuencias de esta región entre *B. recurvata* de Tamaulipas y del Jardín Botánico.

Ac. *B. hiriartiae* - *B. purpusii*

Esta asociación es monofilética (BP=100%; BMV=97%; PP=1.0). No existen diferencias entre las secuencias de *Beaucarnea hiriartiae* de Guerrero y del Jardín Botánico (BP=63%; BMV=83%). *Beaucarnea purpusii* de Oaxaca aparece como especie hermana de *B. hiriartiae* en todos los análisis. Bajo el criterio de parsimonia este clado es hermano de *Beaucarnea stricta*, aunque el soporte es bajo (>50).

Ad. *B. stricta*

Las topologías obtenidas apoyan la monofilia de esta especie (BP=51%; BMV=58%; PP=0.98). Entre *Beaucarnea stricta* de Puebla y de Oaxaca existe una pequeña distancia nucleotídica (BP=73%; BMV=80%; PP=1.0). De acuerdo al análisis de parsimonia este clado es hermano del clado *Beaucarnea hiriartiae*-*B. purpusii* aunque el soporte de confiabilidad es bajo (>50).

CLADO B, CONFORMADO POR:

B. goldmanii* - *B. guatemalensis* - *B. pliabilis

Esta asociación es monofilética de acuerdo a todas las topologías obtenidas (BP=100%; BMV=100%; PP=1.0). No obstante, no se resuelven las relaciones de parentesco para ninguna de las especies; no existen diferencias en las secuencias de esta región entre las especies. *Beaucarnea pliabilis* del Jardín Botánico y de Quintana Roo son un linaje monofilético (BP= 88%; BMV=86%; PP=1.0). Las tres especies habitan regiones semihúmedas del SE del país y Guatemala y las tres carecen de papilas en la periferia de los surcos estomáticos, a excepción de unos cuantos presentes en *Beaucarnea guatemalensis*.

VII.II ANÁLISIS MORFOLÓGICOS

A. PAPILAS DE LAS ESPECIES EN ESTUDIO:

MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (M.E.B.)

Las láminas con las fotografías de M.E.B se encuentran en el **Anexo 4**. En todas las fotografías se observaron hileras paralelas de criptas estomáticas entre costillas de tejido mecánico (**Láminas 1-19**). *Beaucarnea gracilis*, *B. hiriartiae*, *B. purpusii*, *B. stricta*, *B. compacta*, *Calibanus glassianus* y *C. hookerii* poseen surcos estomáticos profundos con prominentes papilas en la periferia (**Láminas 1-7**). *Beaucarnea recurvata*, *B. congesta*, *B. goldmanii*, *B. guatemalensis* y *B. pliabilis* poseen surcos estomáticos poco profundos y carecen de papilas (**Láminas 8-12**). *Beaucarnea guatemalensis* (**Lámina 11**) posee papilas en la periferia de los surcos pero en mucho menor cantidad que el resto de las especies que los presentan. *Beaucarnea compacta* parece ser un caso particular, ya que presenta papilas en toda la superficie foliar (**Lámina 5**).

Entre las muestras de las especies del campo y las especies cultivadas en el Jardín Botánico (JB) las diferencias radicaron en la cantidad y tamaño de las papilas, como puede observarse entre *Beaucarnea stricta* de Puebla y del Jardín Botánico (**Láminas 4 y 15**) y entre *Beaucarnea gracilis* de Puebla y del Jardín Botánico (**Láminas 1 y 13**) (*B. gracilis* del JB posee papilas mucho más delgadas y largas que la muestra poblana). Las diferencias también se observaron en la profundidad de los surcos. En el caso de *Beaucarnea hiriartiae* cultivado en el Jardín Botánico (**Lámina 2**), los surcos son profundos y se encuentran completamente cerrados por papilas, mientras que *B. hiriartiae* de Guerrero (**Lámina 14**) posee surcos poco profundos y pueden observarse con claridad las criptas estomáticas. *Beaucarnea goldmanii* del Jardín Botánico (**Lámina 16**) posee surcos estomáticos poco profundos, mientras que *B. goldmanii* de Chiapas

(Lámina 10) posee surcos con cierta profundidad, al igual que *B. pliabilis* (Láminas 12 y 17).

B. VARIABLES BIOCLIMÁTICAS

Los valores de precipitación y de temperatura de las localidades de colecta obtenidos con el Sistema de Información Geográfico ArcView 3.2 (ESRI, 1999) se encuentran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Valores de las variables de precipitación por especie en mm. PCF = Precipitación en el Cuarto más Frío del año; PCC = Precipitación en el Cuarto más Cálido del año; PPS = Precipitación en el Cuarto más Seco del año; PPL = Precipitación en el Cuarto más Húmedo del año; EP = Precipitación Estacional (Coeficiente de Variación); PA = Precipitación en el Mes más Seco del año; PPLL = Precipitación en el Mes más Húmedo del año; TPA = Precipitación Anual (ESRI, 1999). Con **negritas** se indican los valores **mínimos** y **máximos** por variable bioclimática.

ESPECIE	PCF	PCC	PPS	PPL	EP	PA	PPLL	TPA
<i>B. compacta</i>	27	273	26	357	95	7	139	630
<i>C. glassianus</i>	28	172	26	346	95	6	143	604
<i>C. hookerii</i>	24	183	24	205	79	6	80	407
<i>B. gracilis</i>	30	107	20	676	103	4	245	1120
<i>B. recurvata</i>	71	591	63	690	86	18	265	1263
<i>B. congesta</i>	30	267	23	569	102	7	236	979
<i>B. hiriartiae</i>	14	231	14	519	103	2	181	856
<i>B. purpusii</i>	34	201	18	358	92	6	132	652
<i>B. stricta</i>	23	288	15	412	97	4	184	766
<i>B. goldmanii</i>	46	344	26	568	91	6	252	1118
<i>B.guatemalensis</i>	54	260	32	874	89	7	361	1677
<i>B. pliabilis</i>	190	396	128	496	51	37	189	1228

Tabla 6. Continuación. Valores de las variables de temperatura por especie (*10). TPCF = Temperatura Media en el Cuarto más Frío del año; TPCC = Temperatura Media en el Cuarto más Cálido del año; TPCS = Temperatura Media en el Cuarto más Seco del año; TPCLL = Temperatura Media en el Cuarto más Húmedo del año; OAT = Rango Anual de Temperatura (TMPPC-TMPPF); TMPPF = Temperatura Mín del Mes más Frío del año; TMPPC = Temperatura Máx del Mes más Cálido del año; ET = Temperatura Estacional (desviación estándar *100); ISO = Isotermalidad (ODT/OAT) (* 100); ODT = Media del Rango Diurno [Media mensual (temp max – temp mín)]; TA = Temperatura Media Anual (ESRI, 1999). Con **negritas** se indican los valores **mínimos** y **máximos** por variable bioclimática.

ESPECIE	TPCF	TPCC	TPCS	TPCLL	OAT	TMPPF	TMPPC	ET	ISO	ODT	TA
<i>B. compacta</i>	173	247	173	173	258	82	340	2998	62	162	215
<i>C. glassianus</i>	176	255	177	177	261	86	347	3214	60	159	221
<i>C. hookerii</i>	143	207	143	143	264	42	306	2626	65	174	179
<i>B. gracilis</i>	198	238	199	199	200	123	323	1554	66	132	216
<i>B. recurvata</i>	175	264	187	187	222	106	328	3664	52	116	227
<i>B. congesta</i>	232	277	256	256	156	181	337	1762	61	96	256
<i>B. hiriartiae</i>	203	239	211	211	200	121	321	1333	69	139	221
<i>B. purpusii</i>	165	214	178	178	224	77	301	1867	66	150	191
<i>B. stricta</i>	162	212	164	164	244	60	304	1899	70	172	190
<i>B. goldmanii</i>	194	227	194	194	197	114	311	1283	73	144	212
<i>B.guatemalensis</i>	165	183	167	167	129	116	245	678	75	98	175
<i>B. pliabilis</i>	235	275	251	251	151	179	330	1644	69	105	259

En general, los valores más altos de precipitación los tuvo *Beaucarnea recurvata*, *B. guatemalensis* y *B. pliabilis*, y los valores más bajos los tuvo *Calibanus hookerii*, *B. gracilis* y *B. hiriartiae*. En relación a la temperatura, los valores más altos los tuvo *Beaucarnea congesta*, y los valores más bajos los tuvo *Calibanus hookerii*.

C. CARACTERES MORFOLÓGICOS VS VARIABLES BIOCLIMÁTICAS

Los promedios de los datos obtenidos del diámetro y longitud de las papilas por especie se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Promedio del diámetro y de la longitud de las papilas de los surcos estomáticos por especie de *Beaucarnea* y de *Calibanus* en μm . Con **negritas** se indican los valores mínimos y máximos.

NO. COLECTA	ESPECIE	DIÁMETRO PROMEDIO (μm)	LONGITUD PROMEDIO (μm)
Rojas 31	<i>B. compacta</i>	23.30	17.19
Rojas 34	<i>C. glassianus</i>	22.44	19.93
Rojas 27	<i>C. hookerii</i>	22.79	20.93
Rojas 11	<i>B. gracilis</i>	28.20	17.69
Rojas 28	<i>B. recurvata</i>	18.71	2.79
Olson 1104	<i>B. congesta</i>	14.17	2.43
M-L 424	<i>B. hiriartiae</i>	29.06	24.68
Rojas 23	<i>B. purpusii</i>	23.85	20.94
Rojas 20	<i>B. stricta</i>	32.92	28.07
Olson 1124	<i>B. goldmanii</i>	19.00	2.54
J.C. Montero 1033	<i>B. guatemalensis</i>	16.20	11.26
Cervantes 44	<i>B. pliabilis</i>	18.63	2.96

Beaucarnea congesta posee las papilas con el menor diámetro y longitud mientras que *B. stricta* posee las papilas con el mayor diámetro y longitud.

Se graficaron los datos del diámetro y de la longitud promedio de las papilas con el fin de observar si existía una relación estrecha entre estas variables morfológicas. En la **Figura 23** se muestra la gráfica resultante de la correlación.

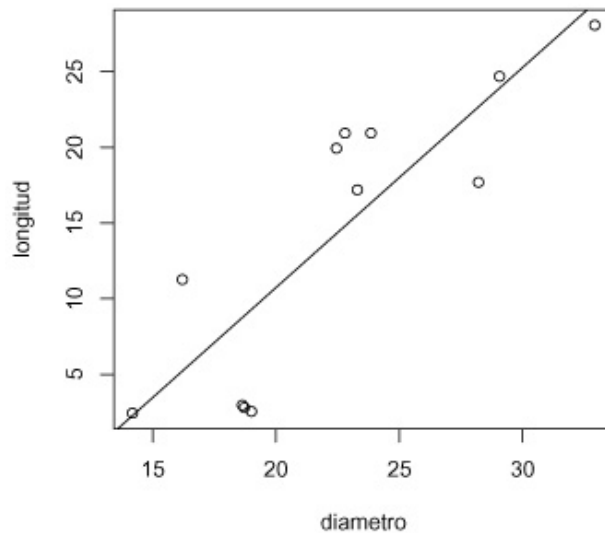


Figura 23. Gráfica que muestra la correlación positiva entre el diámetro y la longitud de las papilas ($r=0.723$).

Existe una correlación positiva entre el diámetro de las papilas y su longitud ($r = 0.723$). Los puntos en el extremo inferior izquierdo corresponden a las especies que no poseen papilas; los puntos en el extremo superior derecho corresponden a las especies que presentan papilas largas.

Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson entre las variables bioclimáticas y el promedio del diámetro y de la longitud de las papilas de todas las muestras por especie con el fin de determinar qué variables se encuentran más relacionadas (**Tabla 8**).

Tabla 8. Valores de correlación entre las variables bioclimáticas de precipitación y temperatura y el diámetro y longitud promedio de las papilas (*= $p < 0.1$, **= $p < 0.05$). PCF = Precipitación en el Cuarto más Frío del año; PCC = Precipitación en el Cuarto más Cálido del año; PPS = Precipitación en el Cuarto más Seco del año; PPL = Precipitación en el Cuarto más Húmedo del año; EP = Precipitación Estacional (Coeficiente de Variación); PA = Precipitación en el Mes más Seco del año; PPLL = Precipitación en el Mes más Húmedo del año; TPA = Precipitación Anual; TPCF = Temperatura Media en el Cuarto más Frío del año; TPCC = Temperatura Media en el Cuarto más Cálido del año; TPCS = Temperatura Media en el Cuarto más Seco del año; TPCLL = Temperatura Media en el Cuarto más Húmedo del año; OAT = Rango Anual de Temperatura (TMPPC-TMPPF); TMPPF = Temperatura Mín del Mes más Frío del año; TMPPC = Temperatura Máx del Mes más Cálido del año; ET = Temperatura Estacional (desviación estándar *100); ISO = Isotermalidad (ODT/OAT) (* 100); ODT = Media del Rango Diurno [Media mensual (temp max – temp mín)]; TA = Temperatura Media Anual (ESRI, 1999). En **negritas** se indica el valor más alto de correlación.

VARIABLE BIOCLIMÁTICA	DIÁMETRO	LONGITUD
PCF	-0.40	** -0.57
PCC	-0.39	** -0.63
PPS	-0.40	** -0.58
PPL	-0.36	* -0.49
EP	0.35	0.40
PA	-0.40	** -0.58
PPLL	-0.41	* -0.53
TPA	-0.46	** -0.61
TPCF	-0.32	* -0.56
TPCC	-0.27	* -0.49
TPCS	-0.37	** -0.58
TPCLL	-0.37	** -0.58
OAT	*0.54	**0.59
TMPPF	*-0.53	** -0.70
TMPPC	0.08	-0.10
ET	0.01	0.04
ISO	0.16	0.17
ODT	**0.68	**0.73
TA	-0.34	** -0.58

Las correlaciones más significativas se obtuvieron entre la mayoría de las variables bioclimáticas y la longitud de las papilas. El valor de correlación más alto estuvo entre la media mensual del rango diurno de temperatura (ODT) y la

longitud de las papilas ($p < 0.05$). Existe una relación positiva entre estas variables, es decir, a medida que ODT aumenta, aumenta la longitud de las papilas. La variable OAT también se correlacionó positivamente con la longitud de las papilas mientras que el resto de las variables significativas se correlacionaron negativamente.

D. MÉTODO COMPARATIVO Y FILOGENIA

El método comparativo se llevó a cabo únicamente con una variable ambiental y una variable morfológica debido a que el fin del análisis era explorar si existía una relación entre el ambiente y las papilas, es decir, realizamos un sondeo preliminar con estas variables para estudios posteriores.

- VARIABLE MORFOLÓGICA VS VARIABLE BIOCLIMÁTICA

Se correlacionaron los datos de la longitud de las papilas vs los datos de la variable bioclimática, ODT (media mensual del rango diario de temperatura), para observar si la variable morfológica variaba sistemáticamente con respecto a los valores de ODT. Es decir, si al aumentar ODT aumentaba la longitud de las papilas, o viceversa. En la **Figura 24** se muestra la gráfica que representa dicha correlación.

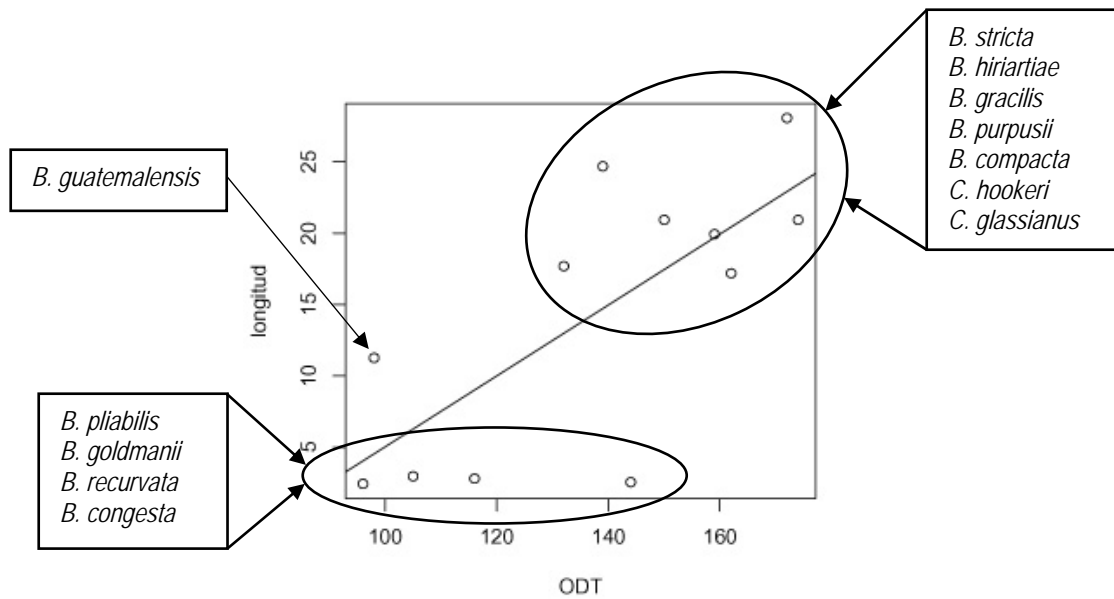
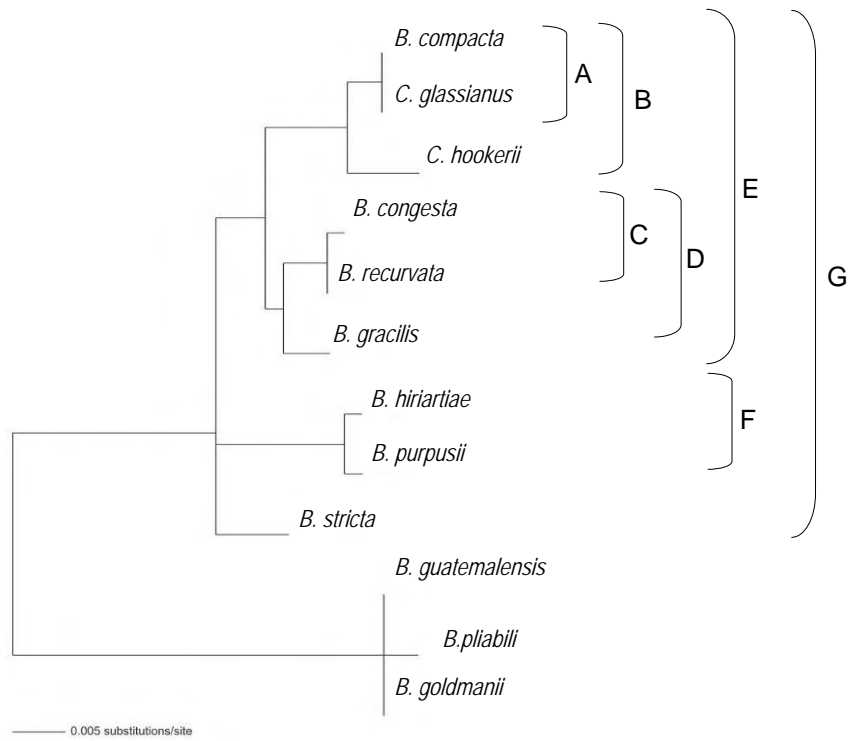


Figura 24. Gráfica que muestra la correlación positiva entre la media mensual del rango diurno de temperatura (ODT) y la longitud de las papilas ($r = 0.7023$). Los puntos dentro del círculo superior derecho corresponden a las especies con papilas y que poseen valores de ODT >120. Los puntos dentro del círculo inferior corresponden a las especies que carecen de papilas y poseen valores de ODT <120 (excepto *Beaucarnea goldmanii*). El punto fuera del círculo corresponde a *B. guatemalensis*, quién posee dientes en mucho menor longitud que el resto de las especies que los presentan.

- VARIABLES DE CLADO

Una vez obtenidas las hipótesis filogenéticas del clado, se eligió la topología que mejor resolviera las relaciones de parentesco entre las especies para generar las variables de clado o dummies. A continuación se muestra el filograma de MV y se indica con letra capital las especies pertenecientes a cada uno de los dummies (**Figura 25**).



Especies	A	B	C	D	E	F	G
<i>B. compacta</i>	1	1	0	0	1	0	1
<i>C. glassianus</i>	1	1	0	0	1	0	1
<i>C. hookerii</i>	0	1	0	0	1	0	1
<i>B. gracilis</i>	0	0	0	1	1	0	1
<i>B. recurvata</i>	0	0	1	1	1	0	1
<i>B. congesta</i>	0	0	1	1	1	0	1
<i>B. hiriartiae</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>B. purpusii</i>	0	0	0	0	0	1	1
<i>B. stricta</i>	0	0	0	0	0	0	1
<i>B. goldmanii</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. guatemalensis</i>	0	0	0	0	0	0	0
<i>B. pliabilis</i>	0	0	0	0	0	0	0

Figura 25. Filograma de MV mostrando cada variable indicadora de clado (dummie) con letra mayúscula. En la tabla se encuentran los integrantes de cada una de las variables indicadoras de clado representadas por una letra capital. Con el número "1" se indican las especies que integran una dummie y con el "0" a las especies ausentes del dummie en cuestión.

Se evaluó la significancia de cada una de las variables. En todos los casos la variable independiente fue significativa ($p < 0.01$, $p < 0.05$), y en ninguno de los casos la variable indicadora de clado fue significativa ($p > 0.1$) (**Tabla 9**). La membresía en cada clado no nos ayuda a explicar la correlación entre ODT y la longitud de las papilas, es decir, no existe efecto filogenético asociado al carácter morfológico y a la variable climática en cuestión. De lo anterior podemos inferir que entre mayor es la oscilación de temperatura a lo largo del día (climas más extremos), más largas son las papilas de la periferia de los surcos estomáticos, independientemente de la historia compartida entre las especies; lo que nos sugiere que el carácter morfológico es un rasgo adaptativo relacionado con esta variable ambiental.

Tabla 9. Regresiones múltiples para la variable de respuesta (longitud), la variable independiente (ODT) y cada variable de clado (dummie). Dummie A (*B.compacta-C.glassianus*), dummie B (*B.compacta-C.glassianus-C.hookerii*), dummie C (*B.recurvata-B.congesta*), dummie D (*B.gracilis- B.recurvata-B.congesta*), dummie E (*B.compacta-C.glassianus-C.hookerii- B.gracilis- B.recurvata-B.congesta*), dummie F (*B.hiriartiae-B.purpusii*), dummie G (*B.compacta-C.glassianus-C.hookerii-B.gracilis-B.recurvata-B.congesta-B.hiriartiae-B.purpusii-B.stricta*).

	COEFICIENTE ESTIMADO	ERROR ESTÁNDAR	Pr(> t)
intercepto	-21.039	11.162	0.092
ODT	0.259	0.082	*0.012
dummie A	-2.122	5.930	0.728
r^2 ajustada: 0.4448, $F_{(2,9)}$: 5.407, $p = 0.02869$			
	COEFICIENTE ESTIMADO	ERROR ESTÁNDAR	Pr(> t)
intercepto	-23.908	12.163	0.081
ODT	0.285	0.093	*0.014
dummie B	-3.799	5.773	0.527
r^2 ajustada: 0.4628, $F_{(2,9)}$: 5.737, $p = 0.02475$			
	COEFICIENTE ESTIMADO	ERROR ESTÁNDAR	Pr(> t)
intercepto	-12.335	12.325	0.343
ODT	0.202	0.085	*0.041
dummie C	-6.440	6.084	0.317
r^2 ajustada: 0.4993, $F_{(2,9)}$: 6.484, $p = 0.01803$			
	COEFICIENTE ESTIMADO	ERROR ESTÁNDAR	Pr(> t)
intercepto	-17.418	12.826	0.207
ODT	0.234	0.087	*0.025
dummie D	-1.807	5.389	0.745
r^2 ajustada: 0.4439, $F_{(2,9)}$: 5.39, $p = 0.02892$			
	COEFICIENTE ESTIMADO	ERROR ESTÁNDAR	Pr(> t)
intercepto	-19.088	10.458	0.101
ODT	0.253	0.074	**0.008
dummie E	-2.891	4.007	0.488
r^2 ajustada: 0.4677, $F_{(2,9)}$: 5.833, $p = 0.02374$			
	COEFICIENTE ESTIMADO	ERROR ESTÁNDAR	Pr(> t)
intercepto	-19.293	9.323	0.068
ODT	0.235	0.067	**0.007
dummie F	8.190	4.826	0.124
r^2 ajustada: 0.5734, $F_{(2,9)}$: 8.393, $p = 0.008767$			
	COEFICIENTE ESTIMADO	ERROR ESTÁNDAR	Pr(> t)
intercepto	-18.223	10.113	0.105
ODT	0.206	0.080	*0.031
dummie G	5.675	5.006	0.286
r^2 ajustada: 0.5073, $F_{(2,9)}$: 6.662, $p = 0.0167701677$			

VIII. DISCUSIÓN

A. EL MARCADOR MOLECULAR

La señal filogenética del marcador molecular utilizado en este trabajo fue muy buena. La fácil amplificación y alineamiento de las secuencias obtenidas, así como la alta variación en las regiones ITS y particularmente la congruencia entre las hipótesis filogenéticas obtenidas y la morfología, el ambiente y la geografía de los clados, hicieron evidentes las ventajas del marcador. No existe duda de estar observando sorteo de linajes dada la congruencia antes mencionada y la buena resolución obtenida entre las especies. Tampoco existe temor de haber secuenciado pseudogenes ya que no se obtuvieron *indels* muy largos (el mayor midió 2 pb), ramas largas aisladas o ramas difíciles de colocar, incongruencias en la estructura de las secuencias ni tampoco alteraciones en el contenido de G+C.

B. LA MONOFILIA DEL GRUPO

La monofilia del grupo según los análisis realizados se mantuvo con un fuerte apoyo (BP-MP=99%; BP-MV=95%; PP=0.99). Las topologías obtenidas con los tres análisis y sus respectivas medidas de confiabilidad resultaron muy semejantes. Diversos autores citan que las medidas de confiabilidad de parsimonia y de máxima verosimilitud se desempeñan más pobremente que las probabilidades posteriores bayesianas (cf. Alfaro *et al.*, 2003; Kauff y Lutzoni, 2002). Sin embargo, la información de los tres análisis puede ser útil en la interpretación de los árboles filogenéticos.

- CLADO *C. HOOKERII-C. GLASSIANUS-B. COMPACTA*

Las dos especies de *Calibanus* aparecieron completamente anidadas dentro de *Beaucarnea* y una especie de *Beaucarnea* (*B. compacta*) apareció anidada dentro de *Calibanus* (*C. hookerii* y *C. glassianus*), lo cual implica parafilia en ambos géneros. Estas tres especies son endémicas de la Sierra Madre Oriental, son muy semejantes morfológicamente y aparecen como especies hermanas bajo el carácter molecular analizado. El patrón de estructuración presente en el clado, la débil diferenciación entre *Beaucarnea compacta* y *Calibanus glassianus* y la anidación completa de *Calibanus* en *Beaucarnea* nos sugiere el traslado de las especies del género *Calibanus* al género *Beaucarnea*, ya que, si dejamos a *Calibanus* como un género monofilético (incluyendo a *Beaucarnea compacta*) implicaría descomponer al clado en al menos tres géneros distintos: 1) uno compuesto por *Calibanus hookeri*, *C. glassianus* y *Beaucarnea compacta*; 2) otro compuesto por *Beaucarnea gracilis*, *B. congesta*, *B. recurvata*, *B. hiriartiae*, *B. purpusii* y *B. stricta* 3) y otro más compuesto por *Beaucarnea goldmanii*, *B. guatemalensis* y *B. pliabilis* (**Figuras 19 Y 20**). Esta decisión no nos parece la más adecuada ya que no simplificaríamos el estudio de las especies. Por lo anterior, proponemos la incorporación de las especies del género *Calibanus* en el género *Beaucarnea*.

- CLADO *B. GRACILIS-B. RECURVATA/B. CONGESTA*

Beaucarnea gracilis y el clado constituido por *B. recurvata* y *B. congesta* aparecen como hermanos bajo los modelos de MV y PP. Las diferencias geográficas entre *Beaucarnea gracilis* y el clado *B. recurvata* - *B. congesta* y su estatus como especies hermanas sugiere que la diferenciación morfológica no se relaciona con la historia filogenética sino muy probablemente, con factores ambientales como la disponibilidad de agua y/o la temperatura. Entre *Beaucarnea recurvata* y *B. congesta*, el hábitat, los caracteres foliares y los caracteres moleculares fueron

muy semejantes. No encontramos diferencias importantes para considerarlas como especies distintas por lo que sugerimos tratar a *Beaucarnea congesta* como *B. recurvata*.

- CLADO *B. HIRIARTIAE*-*B. PURPUSII*

Morfológicamente hablando y en términos de hábitat, *Beaucarnea hiriartiae* es más parecida a *B. stricta* que a *B. purpusii*. Mientras que *Beaucarnea hiriartiae* y *B. stricta* poseen bases cónico-globosas más bien reducidas, corteza lisa o casi lisa, cáudice esbelto que ramifica desde la base y ramas débiles (**Figura 2b,d**), y habitan bosques tropicales deciduos entre los 250 y los 1000 m s.n.m., en laderas abruptas o cañadas; *Beaucarnea purpusii* posee bases y cáudices más bien robustos, ramas gruesas, corteza bien desarrollada (**Figura 2c**) y habita entre los 1700 y los 2200 m s.n.m en bosques de roble o matorrales xerófitos en las áreas más altas del Valle de Tehuacán, en Oaxaca y Puebla. La diferenciación morfológica y ambiental entre *Beaucarnea hiriartiae* y *B. purpusii* y la semejanza en ambos aspectos entre *B. stricta* y *B. hiriartiae* sugiere que el ambiente ejerce una presión de selección sobre la morfología de los individuos “determinando” el tamaño y forma del cáudice así como la complejidad de la corteza, entre otras. Las hojas de las tres especies poseen dientes en la periferia de los surcos estomáticos (**Láminas 5, 6 y 7, Anexo 4**), y son, en términos generales, muy similares.

- CLADO *B. GOLDMANII*-*B. GUATEMALENSIS*-*B. PLIABILIS*

Beaucarnea goldmanii, *B. guatemalensis* y *B. pliabilis* son muy similares, habitan regiones tropicales del SE del país y Guatemala, y las tres carecen de papilas en la periferia de los surcos estomáticos, a excepción de unas cuantas en *B. guatemalensis*. Los patrones morfológicos de estas especies son congruentes con su filogenia molecular y con la filogenia de Hernández (1993a) utilizando caracteres morfológicos. En cuanto al hábitat que ocupa cada especie,

Beaucarnea pliabilis es quién ocurre a menor altitud, pues se encuentra entre los 0 y los 500 m s.n.m. habitando bosques tropicales deciduos y subdeciduos (Hernández, 1993). *Beaucarnea goldmanii* le sigue en altitud, ya que habita laderas escarpadas y riscos de roca caliza entre los 600 y los 1000 m s.n.m., y finalmente *B. guatemalensis* ocurre entre los 1000 y los 1500 m s.n.m. en bosques de roble y en bosques tropicales deciduos sobre laderas inclinadas de roca caliza o ígnea.

Hernández (1993a) menciona que los eventos tectónicos que dieron lugar a la Sierra de los Cuchumatanes en Guatemala, debieron fragmentar la distribución ancestral de las poblaciones, dando lugar a *Beaucarnea goldmanii* en el norte de la depresión central de Chiapas, en México; *B. guatemalensis* en el sur asociada a la Sierra de las Minas en Guatemala, y en la Península de Yucatán a *B. pliabilis*. El arribo a nuevos nichos altitudinalmente diferenciados y ecológicamente distintos, debió provocar cambios genéticos y reproductivos y finalmente la especiación.

C. EL CARÁCTER PERENNIFOLIO VS ARIDEZ AMBIENTAL:

CORRELACIÓN FORMA-FUNCIÓN Y MÉTODO COMPARATIVO FILOGENÉTICO

Las papilas en la periferia de los surcos estomáticos de las hojas de las especies del clado parecen responder a la precipitación y temperatura ambiental. En los bosques tropicales de Quintana Roo, del sur de Tamaulipas, del Istmo de Tehuantepec y de la Depresión Central de Chiapas, donde se distribuyen *Beaucarnea pliabilis*, *B. recurvata*, *B. congesta* y *B. goldmanii*, la precipitación en el cuarto más frío, más cálido y más húmedo del año, así como la precipitación en el mes más húmedo y la precipitación anual, son más altas que en las localidades del resto de las especies. La temperatura mínima en el mes más frío del año en estas localidades es también más alta. En su conjunto, la alta precipitación y el que la temperatura no descienda demasiado en la época de frío, podría estar explicando la ausencia de papilas en los surcos estomáticos de las especies que habitan bajo estas condiciones ambientales.

Por el otro lado, en los bosques deciduos de la Cuenca del Balsas en Guerrero, del Valle de Tehuacan en Oaxaca y Puebla, de la Sierra Gorda en Guanajuato y de San Luís Potosí, donde se distribuyen *Beaucarnea hiriartiae*, *B. gracilis*, *B. stricta*, *B. purpusii*, *B. compacta*, *Calibanus glassianus* y *C. hookerii*, la precipitación en el cuarto más frío, más seco y más húmedo del año, así como la precipitación en el mes más seco y en general, la precipitación anual, es más baja. La temperatura mínima en el mes más frío del año es también muy baja en las localidades de estas especies, llegando a los 4°C en el caso de *Calibanus hookerii*. Las bajas temperaturas y precipitación podrían estar explicando la presencia de papilas en las especies que habitan bajo estas condiciones ambientales.

En la localidad de *Beaucarnea guatemalensis*, la temperatura media en el cuatro más cálido del año es la más baja, así como el rango anual de temperatura y la temperatura estacional. Sin embargo, la precipitación anual es la más alta con respecto al resto de las especies, así como la precipitación en el cuarto y en el mes más húmedo del año. En este caso, las bajas temperaturas podrían estar determinando la presencia de papilas, pero la alta precipitación anual podría estar limitando su presencia, y es por ello que observamos papilas en las hojas de esta especie, pero en mucho menor cantidad que el resto de las especies que las presentan.

La correlación negativa entre la longitud de las papilas y la temperatura indica que, a menor temperatura, más largas son las papilas, lo que podría explicar la correlación positiva entre la media mensual del rango diurno de temperatura (ODT) y la longitud de las papilas, ya que en las zonas más áridas se alcanzan temperaturas altas durante el día y bajas durante la noche, mientras que en las zonas más húmedas, la oscilación de temperatura es mucho menor. Esto podría resultar en medias (\bar{x}) altas en el primer caso, y medias (\bar{x}) más bajas en el segundo. De esta forma, ODTs altas podrían estar explicando longitudes mayores de papilas (respondiendo a las bajas temperaturas) mientras que ODTs bajas, papilas de menor longitud, o la ausencia de éstas.

No obstante, nos quedó la inquietud sobre el efecto filogenético en estos caracteres. No obtuvimos una correlación significativa entre las variables de clado y las variables ambientales y morfológicas. Sospechamos que si elimináramos a *Beaucarnea recurvata* y a *B. congesta* de nuestro análisis, obtendríamos una correlación significativa. Lo anterior lo debido a que estas dos especies carecen de papilas y aparecen dentro del clado en el cual se encuentran todas las especies que poseen papilas en las hojas y habitan climas más áridos (**Figuras 19 y 20**). Suponemos que *Beaucarnea recurvata* y *B. congesta* perdieron las papilas y que este hecho podría sesgar los análisis de correlación múltiple por clado. Por lo

anterior, realizamos un análisis piloto de correlación múltiple entre las variables ambientales y morfológicas, y cada variable de clado excluyendo a estas dos especies. El resultado fue significativo para la variable indicadora de clado E ($p < 0.05$), es decir, para el que incluye a todas las especies excepto a las sureñas (*Beaucarnea goldmanii*, *B. guatemalensis* y *B. pliabilis*). De lo anterior podríamos concluir que al truncar los datos provocamos una relación significativa. Lo que significa que nuestro método es capaz de detectar efecto filogenético cuando está presente.

CARACTERES ADICIONALES

Observamos que la densidad de las papilas también varía de una especie a otra e incluso entre individuos de una misma especies. Las plantas cultivadas en el Jardín Botánico y los individuos creciendo en el campo presentan diferencias en la cantidad de papilas. Esto podría relacionarse con la disponibilidad de agua en la localidad de cada individuo. Para comprobarlo habría que hacer estudios sobre la densidad de las papilas de varios individuos por especie de distintas localidades y sus variables bioclimáticas.

Hernández (1993) había observado distintos patrones en los “tricomas” o “papilas” de las hojas, dándoles distintas denominaciones como tricomas “entrelazados”, “no entrelazados”, con forma de “cremallera” u hojas “glabras” si carecían de tricomas. Analizando las microfotografías de M.E.B. de las especies silvestres y las que habitan en el Jardín Botánico, nos parece que la forma que toman las papilas, la manera en la que se “entrelazan”, la cantidad y longitud de los dientes del margen (**Láminas 20 y 21, Anexo 4**) y la profundidad de los surcos varían en relación a la temperatura y a la disponibilidad de agua, por lo que no parecen ser caracteres diagnósticos.

La morfología de los cáudices, incluyendo su diámetro y las características de los felemas (súber o corcho) parecen ser también objeto de estudio, ya que observamos una construcción más bien angosta y alargada con felemas reducidos de las especies sureñas de hábitat más húmedo en contraste con cáudices robustos con felemas bien desarrollados de la mayoría de las especies que habitan el centro y NE del país (**Láminas 22 y 23, Anexo 4**). Esto ya lo había observado Hernández (1993), quién sugirió que una textura gruesa y tosca de la corteza era posiblemente una adaptación a ambientes áridos, mientras que una corteza lisa parecía ser más bien una adaptación a ambientes más mésicos.

IX. CONCLUSIONES

- La asociación *Beaucarnea-Calibanus* es monofilética pero los géneros son parafiléticos. Se sugiere la eliminación del nombre *Calibanus* y la incorporación de sus especies en el género *Beaucarnea*.
- Existen dos grandes grupos en el clado *Beaucarnea-Calibanus*. Uno conformado por las especies del pacífico, centro y NE del territorio mexicano (clado A), y el otro por las especies del SE de México y Guatemala (clado B). Las especies dentro de cada uno de los grupos son semejantes entre sí en hábito, hábitat y caracteres foliares.
- Las especies del clado A excepto *Beaucarnea recurvata* y *B. congesta* poseen abundantes papilas en la periferia de los surcos estomáticos. Las especies del clado B + *Beaucarnea recurvata* y *B. congesta* carecen de papilas en la periferia de los surcos estomáticos, o los poseen en mucho menor cantidad que las especies que los presentan.
- La precipitación y la temperatura están asociadas a la presencia/ausencia de papilas en la periferia de los surcos estomáticos de las hojas de las especies en estudio. Baja precipitación y baja temperatura se relacionan con la presencia de papilas en las hojas de las especies del clado, mientras que alta precipitación y temperaturas no muy extremas se relacionan con la ausencia de papilas en las hojas de las especies del clado.
- Se sugiere tratar a *Beaucarnea congesta* como *B. recurvata*, ya que no se encontraron diferencias significativas en las secuencias ITS ni en los caracteres morfológicos de la hoja.

XI REFERENCIAS

- ALFARO, M. E.; S. ZOLLER Y F. LUTZZONI. 2003. Bayes or Bootstrap? A simulation study comparing the performance of Bayesian Markov Chain Monte Carlo Sampling and Bootstrapping in assessing phylogenetic confidence. *Molecular Biology and Evolution*. **20**(2): 255-266
- ÁLVAREZ DE ZAYAS, A. 1987. Sistemática y filogenia de la familia Agavaceae Endlicher. Tesis de Doctorado. La Habana, Cuba: Universidad de la Habana.
- ÁLVAREZ, I. Y J. F. WENDEL. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogeny and Evolution*. **29**: 417-434
- APG II (THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP). 2003. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*. **141**: 399-436
- APPELS, R. Y J. DVORAK. 1982. Relative rates of divergence of spacer and gene sequences within the rDNA region of species in the Triticeae: Implications for the maintenance of homogeneity of a repeated gene family. *Theoretical and Applied Genetics*. **63**: 361-365
- ARNHEIM N., M. KRISTAL, R. SCHMICKEL, G. WILSON, O. RYDER Y E. ZIMMER. 1980. Molecular evidence for genetic exchanges among ribosomal genes on nonhomologous chromosomes in man and apes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **77**: 7323-7327
- ARNHEIM, N. 1983. Concerted Evolution of multigene families. En: M. Nei & R.K. Kohen [eds.] *Evolution of genes and proteins*. Sinauer, Sunderland, M.A. pp. 38-61
- BAKER, J. G. 1872. On *Dasyilirion* and *Beaucarnea*. *Journal of Botany*. **10**:233-241
- BAKER, J. G. 1881. A synopsis of Aloineae and Yuccoidae. *Journal of the Linnean Society, Botany*. **13**:209-292

- BALDWIN B. G., M. J. SANDERSON, J. M. PORTER, M. F. WOJCIECHOWSKI, C. S. CAMPBELL Y M. J. DONOGHUE. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. **82**:247-227.
- BAUM, D. A., K. J. SYTSMA Y P. C. HOCH. 1994. A phylogenetic analysis of *Epilobium* (Onagraceae) based on nuclear ribosomal DNA sequences. *Syst. Bot.* **19**: 363-388
- BOGLER, D. J. 1995. Systematics of *Dasyilirion*: Taxonomy and molecular phylogeny. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. **56**: 69-76
- BOGLER, D. 1998. Nolinaceae. Pp. 392-396, En: K. Kubitzki [ed.]. *The Families and Genera of Vascular Plants*. Vol. II. Spriger Verlag, Berlin, Germany.
- BOGLER, D. J. Y B. B. SIMPSON. 1995. A chloroplast DNA study of the Agavaceae. *Systematic Botany*. **20**: 191-205
- BOGLER, D. J. Y B. B. SIMPSON. 1996. Phylogeny of Agavaceae based on ITS rDNA Sequence Variation. *American Journal of Botany*. **83**(9):1225-1235.
- BRAY, W.L. 1903. Tissues of some plants of the Sotol region. *Bulletin Torrey Botanical Club*. p. 30
- BUCKLER, E. S. Y T. P. HOLTSFORD. 1996. *Zea* systematics: Ribosomal ITS evidence. *Molecular Biology*. **13**: 612-622
- BUCKLER, E. S., A. IPPOLITO Y T.P. HOLTSFORD. 1997. The evolution of ribosomal DNA: Divergent paralogus and phylogenetic implications. *Genetics*. **145**: 821-832
- CAMARGO-RICALDE, S. L., S. S. DHILLION, Y C. JIMENEZ-GONZALEZ. Mycorrhizal perennials of the "matorral xerofilo" and the "selva baja caducifolia" communities in the semiarid Tehuacán-Cuicatlan Valley, Mexico. *Department of Biology and Nature Conservation, Agricultural*. University of Norway.
- CAMIN, J. H. Y R. R. SOKAL. 1965. A method for deducting branching sequences in phylogeny. *Evolution*. **19**: 311–326.

- CARDEL, Y., V. RICO-GRAY, J. G. GARCÍA-FRANCO Y L. B. THIEN. 1997. Ecological status of *Beaucarnea gracilis*, an endemic species of the semiarid Tehuacán Valley, Mexico. *Conservation Biology*. **11**(2): 367-374
- CATALÁN, P., E.A. KELLOGG, R.G. OLMSTEAD. 1997. Phylogeny of Poaceae subfamily Pooideae based on chloroplast *ndhF* gene sequences. *Molecular Phylogenetic Evolution*. **8**: 150-166
- CHASE, M.W., D.E. SOLTIS, R.G. OLMSTEAD, D. MORGAN, D.H. LES, B.D. MISHELER, M.R. DUVALL, R. PRICE, H.G. HILLS, Y. QIU, K.A. KRON, J.H. RETTIG, E. CONTI, J.D. PALMER, J.R. MANHART, K.J. SYSTMA, H.J. MICHAELS, W.J. KRESS, K.G. KAROL, W.D. CLARK, M. HEDRÉN, B.S. GAUT, R.K. JANSEN, K. KIM, C.F. WIMPEE, J.F. SMITH, G.F. FURNIER, S.H. STRAUSS, Q. XIANG, G.M. PLUNETT, P.S. SOLTIS, S.M. SWENSEN, S.E. WILLIAMS, P.A. GEDEK, C.J. QUINN, L.E. EGUIARTE, E. GOLENBERG, G.H. LEARN JR., S.W. GRAHAM, S.C.H. BARRETT, S. DAYANADAN, V.A. ALBERT. 1993. Phylogenetics of seed plants: An analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcl*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. **80**: 528-580
- CHASE M. W., M. R. DUVALL, H. G. HILLS, J. G. CONRAN, A. V. COX, L. E. EGUIARTE, J. HARTWELL, M. F. FAY, L. R. CADDICK, K. M. CAMERON Y S. HOOT. 1995. Molecular systematics of Liliaeae. *En*: Rudall, P. J., P. J. Cribb, D. F. Cutler, C. J. Humphries (Eds.). *Monocotyledons: Systematics and Evolution*. London: Royal Botanic Gardens, Kew, 109-137
- CHASE M. W., D. S. SOLTIS, P. S. SOLTIS, P. J. RUDALL, M. F. FAY, W. H. HAHN, S. SULLIVAN, J. JOSEPH, T. GIVNISH, K. J. SYTSMA Y C. PRICE. 2000. Higher-level systematics of the monocotyledons: an assessment of current knowledge and a new classification. *En*: Wilson, K.L. y D. A. Morrison (Eds.). *Monocotyledons: Systematics and Evolution*. Melbourne: CSIRO, 3-16
- CLEGG, M.T. 1993. Chloroplast gene sequences and the study of plant evolution. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the United States of America*. **90**:363-367

- CRACRAFT, J. 1989. SPECIATION AND ITS ONTOLOGY: The empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. *En: Otte, D. y J. A. Endler. Speciation and its consequences.* Sinauer, Sunderland, Mass.
- DAHLGREN, R.M. Y H.T. CLIFFORD. 1982. The monocotyledons: a comparative study. Academic Press, New York, N.Y.
- DAHLGREN, R.M., H.T. CLIFFORD Y P.F. YEO. 1985. The families of the monocotyledons. Sprigeng-Verlag, Berlin.
- DE LUNA, E., J. A. GUERRERO Y T. CHEF-TARACENA. 2005. Sistemática biológica: avances y direcciones en la teoría y los métodos de la reconstrucción filogenética. *Hidrobiológica*. **15**(3): 351-370
- DE QUEIROZ, K. Y M.J. DONOGHUE. 1988. Phylogenetic systematics and species problem. *Cladistics*. **4**: 317-338
- DÍAZ, J. A. 2001-2002. El método comparativo en biología evolutiva. *Etologia*. **19-20**: 37-82
- DOUADY, C. J., F. DELSUC, Y. BOUCHER, W. FORD Y E. J. P. DOUZERY. 2003. Comparison of bayesian and maximum likelihood bootstrap measures. *Molecular Biology and Evolution*. **20**(2): 248-254
- DOUZERY, E. J. P., A. M. PRIDGEON, P. KORES, N.P. LINDER, H. KURZWELL Y M.W. CHASE. 1999. Molecular Phylogenetics of Disease (Orchidaceae): A Contribution from Nuclear Ribosomal ITS Sequences. *American Journal of Botany*. **86**(6): 887-899.
- DOYLE, J. J. Y J. I. DAVIS. 1998. Homology in molecular phylogenetics: a parsimony perspective. Pp. 132-163, *en: D.E. Soltis & P.S. Soltis [Eds.]. Molecular systematics of plants II. DNA sequencing.* Kluwer Academia Publishers.
- DUVALL, M.R., M.T. CLEGG, M.W. CHASE, W.D. CLARK, W.J. KRESS, H.G. HILLS, L.E. EGUIARTE, J.F. SMITH, B.S. GAUT, E.A. ZIMMER Y G.H. LEARN, JR. 1993. Phylogenetic hypothesis for the monocotyledons constructed from *rbcl* gene sequence. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. **80**:607-619.

- EDWARDS, K., C. JOHNSTONE Y C. THOMSON. 1994. A simple method of extraction. *Nucleic Acid Research*. **19**: 1349
- EFRON, B. 1979. Bootstrap methodes: another look at the jackknife. *Annals of Statistics* **7**:1-26
- EGUIARTE, LE. 1995. Hutchinson (Agavales) vs. Huber y Dahlgren (Asparagales): análisis moleculares sobre la filogenia y evolución de la familia Agavaceae *sensu* Hutchinson dentro de las monocotiledóneas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. **56**: 45-56.
- EGUIARTE, L.E., M.R. DUVALL, G.H. LEARN JR Y M.T. CLEGG. 1994. The systematic status of the Agavaceae and the Nolinaceae and related Asparagales in the Monocotyledons: An analysis based on the *rbcL* gene sequence. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. **54**: 35-56
- ELSTROTT, J Y D.J. IRSCHICK. 2004. Evolutionary correlations among morphology, habitat use and clining performances in caribbeaen *Anolis* Lizards. *Biological Journal of the Linnean Society*. **83**: 389-398.
- EPJ, 2005. Estudio previo justificativo para el establecimiento del área natural protegida. Reserva de la Biosfera “Sierra Gorda de Guanajuato”
- ESRI. 1999. ArcView GIS 3.2. ESRI, Redlands, California.
- FARRIS, J. S. 1978. Inferring phylogenetic trees from chromosome inversion data. *Systematic Zoology*. **27**: 275-284.
- FAY, M. F., P. J. RUDALL, S. SULLIVAN, K. L. STOBART, A. Y. BRUIJN, F. QAMARUZ-ZAMAN, W-P, HONG, J. JOSEPH, W. J. HAHN, J. G. CONRAN Y M. W. CHASE. 2000. Phylogenetic studies of Asparagales based on four plstid DNA loci. *En*: Wilson, K.L. y D. A. Morrison (Eds.). *Monocotyledons: Systematics and Evolution*. Melbourne: CSIRO, 360-371
- FELSENSTEIN, J. 1979. Alternative methods of phylogenetic inference and their interrelationship. *Systematic Zoology*. **28**: 49-62.
- FELSENSTEIN, J. 1981. A likelihood approach to character weighting and what it tells us about parsimony and compatability. *Botanical Journal of the Linnean Society*. **16**: 183-196.

- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. **39**: 783-791
- FITCH, W. M. 1971. Toward defining the course of evolution: minimum change for a specified tree topology. *Systematic Zoology*. 20: 406-416.
- FLORES, O. Y P. GEREZ. 1994. *Biodiversidad y conservación en México: Vertebrados, vegetación y uso del suelo*. Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad. UNAM. 439p
- GARCÍA-MENDOZA, A. Y R. GALVÁN. 1995. Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. 1995. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. **56**: 7-24
- GIANNINI, N. P. 2003. Canonical phylogenetic ordination. *Systematic Biology*. **52**(5):684–695.
- GIFFORD, E. M. Y A. S. FOSTER. 1996. *Morphology and Evolution of Vascular Plants*. 3rd. Ed. W. H. Freeman & Co. N. Y.
- GÓMEZ-POMPA, A., R. VILLALOBOS-PIETRINI Y A. CHIMAL. 1971. Studies in the Agavaceae. I. Chromosome morphology and number of seven species. *Madroño*. **21**: 208-221 1971
- GRANT, T. Y A. G. KLUGE. 2004. Transformation series as an ideographic character concept. *En: De Luna E., J.A. Guerrero y T.C.C. Taracena*. 2005. Sistemática Biológica: Avances y Direcciones en la Teoría y los Métodos de la Reconstrucción Filogenética. *Hidrobiológica*. **15**(3): 351-370
- HAMBY, R.K. Y E.A. ZIMMER. 1991. Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematics. p. 5091, *en: Soltis, P.S.; D.E. Soltis & J.J. Doyle*. [eds.]. *Molecular Systematics of Plants*. Chapman and Hall, N.Y.
- HARVEY, P.H. Y A. PURVIS. 1991. Comparative methods for explaining adaptations. *Nature. Review*: 619-623.
- HASEGAWA, M., KISHINO, H Y YANO, T. 1985. Dating the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* **22**:160-174.
- HENNIG, W. 1966. *Phylogenetic Systematics*. University of Illinois Press, Urbana.

- HERNÁNDEZ, L. 1992. Una nueva especie de *Beaucarnea* (Nolinaceae). *Acta Botánica Mexicana*. **18**:25-29
- HERNÁNDEZ, L. 1993a. Cladistic análisis of the american genera of Asparagales and the systematic study of *Beaucarnea* (Nolinaceae) and *Hemiphylacus* (Hyacinthaceae). Ph.D. Dissertation. The University of Texas at Austin, Austin, Texas.
- HERNÁNDEZ, L. 1993b. *Beaucarnea* ¿Un género amenazado?. *Cactáceas y Suculentas de México*. **38**: 11-14
- HERNÁNDEZ, L. 1995. Análisis cladístico de la familia Agavaceae. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. **56**: 57-68
- HERNÁNDEZ, L. 2001. *Beaucarnea sanctomariana* (Nolinaceae), a new micro-endemic species of ponytail palm from the Isthmus of Tehuantepec, Oaxaca, Mexico. *NOVON*. **11**: 50-53
- HERNÁNDEZ, L Y S. ZAMUDIO. 2003. Two new remarkable Nolinaceae from Central Mexico. *Brettonia*. **55**(3): 226-232
- HERNÁNDEZ-SANDOVAL, L., J. TREVIÑO, J. DÍAZ, A. DOMÍNGUEZ, K. MIRANDA, G. CASTILLO, R. ORELLANA, M. PÉREZ, A. VALIENTE-BANUET, P. DÁVILA-ARANDA Y A. MORA. 2001. Estado de conservación de las especies de *Beaucarnea* (Nolinaceae) en México: Conservación y Manejo de Recursos. XV Congreso Mexicano de Botánica. *Sociedad Botánica de México*.
- HIJMANS, R. J., CAMERON, S., PARRA, J. L., JONES, P. G. Y JARVIS, A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for Global land areas. *International Journal of Climatology*. **25**: 1965–1978. Publicado en línea en Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).
- HILLIS, D.M. 1994. Homology in molecular biology. *En*: B.K. Hall (Ed.). 1994. *Homology. The Hierarchical Basis of Comparative Biology*. Academic Press. San Diego, California.
- HILLIS, D.M., C. MORRITZ, C.A. PORTER Y R.J. BAKER. 1991. Evidence of biased gene conversion in concerted evolution of ribosomal DNA. *Science*. **251**: 308-310

- HUELSENBECK, J. P. Y F. RONQUIST. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. **17**: 754-755
- HUELSENBECK, J. P., F. RONQUIST, R. NIELSEN Y J. P. BOLLBACK. 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*. **294**: 2310-2314
- HUTCHINSON, J. 1934. *The families of flowering plants. Vol. II. Monocotyledons*. The Macmillan Co., Londres.
- HUTCHINSON, J. 1959. *The families of flowering plants. Vol. II. Monocotyledons*. 2da Ed. Oxford University Press, Oxford.
- JUKES, T. H. Y C. R. CANTOR, 1969. Evolution of protein molecules. Pp. 21-123 *En*: H. N. Munro, ed. *Mammalian protein metabolism*. Academic Press, New York.
- KAUFF, F. Y F. LUTZONI. 2002. Phylogeny of the Gyalectales and Ostropales (Ascomycota, Fungi): among and within order relationships based on nuclear ribosomal RNA small and large subunits. *Molecular Phylogenetic Evolution*. **25**: 138-156
- KIM, K. J. Y R. K. JANSEN. 1994. Comparisons of phylogenetic hypothesis among different data sets in dwarf dandelions (*Krigia*): Additional information from internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA. *Plant Systematics and Evolution*. **190**: 157-185
- KIMURA, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**:111-120.
- KITA, Y. Y M. ITO. 2000. Nuclear ribosomal ITS sequences and phylogeny in East Asian *Aconitum* subgenus *Acontium* (Ranunculaceae), with special reference to extensive polymorphism in individual plants. *Plant Systematics and Evolution*. **225**:1-13
- KORNET, D. J. Y H. TURNER. 1999. Coding polymorphism for phylogeny reconstruction. *En*: De Luna E., J.A. Guerrero y TC.C. Taracena. 2005. Sistemática Biológica: Avances y Direcciones en la Teoría y los Métodos de la Reconstrucción Filogenética. *Hidrobiológica*. **15**(3): 351-370

- LE QUESNE, W. J. 1972. Further studies based on uniquely derived character concept. *Systematic Zoology*. **21**(3): 281-288.
- LEMAIRE, CH. 1861. Genre nouveau de la Famille de Asparagacées. *Beaucarnea*. *L'illustration horticole* **8**(Misc.): 57, 59.
- LEWIS, P.O. 1998. Maximum likelihood as an alternative to parsimony for inferring phylogeny using nucleotide sequence data. *En: Soltis, D.E. & P.S. Soltis [Eds.]. Molecular systematics of plants II. DNA sequencing*. Kluwer Academia Publishers. Pp. 132-163.
- MABEE, P. M. 1989. Assumptions underlying the use of ontogenetic sequences for determining character state order. *Transactions of the American Fisheries Society*. **118**: 151-158.
- MASSARDO, F. Y G. ANDERSON. 2001. Nominación y clasificación de los seres vivos. Pp. 69-76. *En: Fundamentos de conservación biológica*. Fondo de Cultura Económica. México.
- MADDISON, W. P. 1989. Reconstructing character evolution on polytomous cladograms. *Cladistics*. **5**: 365-377
- MCCLENDON, J. F. 1908. On xerophytic adaptations of leaf structure in Yucas, Agaves and Nolinás. *The American Naturalist*. **42**(497): 308-316
- MORRONE, J. J. 2001. *El lenguaje de la cladística*. Dirección General de Publicaciones y Fomento Editorial. UNAM. México. 109 pp.
- OLMSTEAD, R. G. Y J. D. PALMER. 1994. Chloroplast DNA systematics: A review of methods and data analysis. *American Journal of Botany*. **81**:1205-1224
- OLMSTEAD, R. G. Y P. A. REEVES. 1995. Evidence for the polyphyly of the Scrophulariaceae based on chloroplast *rbcL* and *ndhF* sequences. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. **82**: 176-193
- PAGE, R. D. Y E. C. HOLMES. 1998. *Molecular Evolution. A phylogenetic approach*. Blackwell Science, Oxford, 346 p.
- POSADA, D. Y K. A. CRANDALL. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. **14** (9): 817-818.

- POSADA, D. 2003. Selecting models of evolution. Pp. 256-282, en: *The phylogenetic handbook*. Cambridge University Press.
- POSADA, D. Y K. A. CRANDALL. 2001. Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Systematic Biology*. **50**: 580-601
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2007. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation, Vienna, Austria.
- RAMBAUT, A. 2002. *Se-AI sequence alignment editor*, v2.0a11. Department of Zoology, University of Oxford, Oxford.
- RANNALA, B. Y Z. YANG. 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: A new method of phylogenetic inference. *En: De Luna E., J.A. Guerrero y TC.C. Taracena. 2005. Sistemática Biológica: Avances y Direcciones en la Teoría y los Métodos de la Reconstrucción Filognética. Hidrobiológica. 15(3): 351-370*
- ROGERS, S. O. Y A. J. BENDICH. 1987. Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer. *Plant Molecular Biology*. **9**: 509-520 En: BALDWIN B. G., M. J. SANDERSON, J. M. PORTER, M. F. WOJCIECHOWSKI, C. S. CAMPBELL Y M. J. DONOGHUE. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botany Garden*. **82**:247-227.
- ROSE. 1906. *Contributions from the United States National Herbarium*. **10**:90.
- ROSSI, M.S. 2005. Las herramientas que construyeron el árbol de la vida. *Química Viva*. **2**: 68-73
- ROZZI, R. 2001. Biodiversity and social wellbeing in South Africa. *En: Encyclopedia of Life Support Systems*, en prensa, UNESCO-EOLSS.
- RUDALL, P. J., C. A. FURNESS, M. W. CHASE Y M. F. FAY. 1997. Microsporogenesis and pollen sulcus type in Asparagales (Lilianaes). *Canadian Journal of Botany*. **75**: 408-430
- RUDALL, P. J., E. M. ENGELMAN, L. HANSON Y M. W. CHASE. 1998. Systematics of *Hemiphylacus*, *Anemarrhena* y *Asparagus*. *Systematics and Evolution*. **211**: 181-199

- RUDALL, P. J., J.G. CONRAN Y M. W. CHASE. 2000a. Systematics of Rusceae/Convallariaceae: a combined morphological and molecular investigation. *Botanical Journal of the Linnean Society*. **134**: 73-92
- RUDALL, P. J., W. P. HONG, C. A. FURNESS, J. G. CONRAN, G. KITE, K. L. STOBART Y M. W. CHASE. 2000b. Consider the lilies-systematics of Liliales. *En: Wilson, K. L. D. A. Morrison (Eds.) Monocotyledons: Systematics and Evolution*. Melbourne: CSIRO, 345-355
- RZEDOWSKI J. 1987. *Vegetación de México*. Editorial Limusa, México.
- SANDERSON, J. M. Y J. J. DOYLE. 1992. Reconstruction of organismal evolution, homoplasy, and confidence. *Systematic Biology*. In press.
- SATÔ, D. 1942. Karyotype alteration and phylogeny in the Liliaceae and allied families. *Japanese Journal of Botany*. **12**: 57-161.
- STEARNS, S. C. 1983. The influence of size and phylogeny on patterns of covariation among life-history traits in mammals. *Oikos*. **41**: 173-187.
- STEEL, M Y D. PENNY. 2000. Parsimony, likelihood, and the role of models in molecular phylogenetics. *Molecular Biology and Evolution*. **17**(6): 839-850
- SUH, Y., L.B. THIEN, H.E. REEVE Y E.A. ZIMMER. 1993. Molecular evolution and phylogenetic implications of Internal Transcribed Spacer Sequences of Ribosomal DNA in Winetraceae. *American Journal of Botany*. **80**(9): 1042-1055
- SWOFFORD, D. 2002. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- TAMURA, K., Y M. NEI. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* **10**:512-526.
- THORPE, J. P. Y A. M. SOLE-CAVA. 1994. The use of enzyme electrophoresis in invertebrate systematics. *Zoologica Scripta*. **23**: 3-18
- TRAVARÉ, S. 1986. Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lect. Math. Life. Sci*. **17**: 57-86
- TRELEASE, W. 1911. The desert group Nolinaceae. *Proceedings of the American*

Philosophical Society. **50**: 404-443

- WAGNER, W. J. JR. 1961. Problems in the classification of ferns. In: *Recent advances in Botany*. University of Toronto Press., Montreal: 841-844.
- WILCOX, T. P., D. J. SWICKL, T. A. HEATH Y D. M. HILLIS. 2002. Phylogenetic relationships of the dwarf boas and a comparison of Bayesian and bootstrap measures of phylogenetic support. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **25**: 361-371
- WILEY, E.O., D. SIEGEL-CAUSEY, D.R. BROOKS Y V.A. FUNK. 1991. *The Compleat Cladist: A Primer of Phylogenetic Procedures*. Museum of Natural History. Dyche Hall. The University of Kansas, Lawrence, Kansas. 158 pp.
- WRIGHT, S.I. Y B.S. GAUT. 2004. Molecular Population Genetics and the search for adaptative evolution y plants. *Molecular Biology and Evolution*. **22**(3): 506-519
- YANG, Z. 1996. Phylogenetic analysis using parsimony and likelihood methods. *Journal of Molecular Evolution*. **42**: 294-307
- YANG, Z. 1997. How often do wrong models produce better phylogenetics? *Molecular Biology and Evolution*. **14**:105-108
- ZIMMER, E. A., S. L. MARTIN, S. M. BEVERLY, Y. W. KAN Y A. C. WILSON. 1980. Rapid duplication and loss of genes coding for the alpha chains of hemoglobin. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences of the United States of America*. **77**: 2158-2162
- Zwickl, D. J., 2006. Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph.D. dissertation, The University of Texas at Austin.

X. ANEXOS

ANEXO 1

LISTA DE ESPECIES EN RIESGO (RARAS, AMENAZADAS O EN FRANCO PELIGRO DE EXTINCIÓN) EN MÉXICO, ORDENADAS DE ACUERDO A LA FAMILIA A LA QUE PERTENECEN.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-059-ECOL-1994, que determina las especies y subespecies de flora y fauna silvestres terrestres y acuáticas en peligro de extinción, amenazadas, raras y las sujetas a protección especial, y que establece especificaciones para su protección 16-05-94

Familia AGAVACEAE

Tabla 14. Especies de la Familia Agavaceae en (P) peligro de extinción, (A) amenazadas, (R) raras y (Pr) sujetas a protección especial de acuerdo a la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-059-ECOL-1994. * = Especies endémicas. En **negritas** las especies de *Beaucarnea*.

<i>Agave bracteosa</i>	A	<i>Agave congesta</i>	R	<i>Agave chiapensis</i>	R*
<i>Agave dasylirioides</i>	A*	<i>Agave guiengola</i>	A*	<i>Agave gypsophila</i>	R
<i>Agave impressa</i>	A*	<i>Agave kewensis</i>	R*	<i>Agave lurida</i>	P*
<i>Agave nizandensis</i>	P*	<i>Agave ornithobroma</i>	R	<i>Agave parrasana</i>	R*
<i>Agave parviflora</i>	A	<i>Agave peacockii</i>	R*	<i>Agave polianthiflora</i>	A
<i>Agave titanota</i>	R*	<i>Agave victoria-reginae</i>	P*	<i>Agave vizcainoensis</i>	R*
<i>Beaucarnea goldmanii</i>	A*	<i>Beaucarnea gracilis</i>	A*	<i>Beaucarnea hiriartiae</i>	A*
<i>Beaucarnea pliabilis</i>	A*	<i>Beaucarnea purpusii</i>	A*	<i>Beaucarnea recurvata</i>	A
<i>Beaucarnea stricta</i>	A*	<i>Beschorneria albiflora</i>	R	<i>Beschorneria calcicola</i>	R*
<i>Beschorneria tubiflora</i>	R	<i>Beschorneria wrightii</i>	R*	<i>Dasyllirion longissimum</i>	A
<i>Dasyllirion palaciosii</i>	R*	<i>Furcraea bendinghausii</i>	A*	<i>Furcraea macdougallii</i>	P*
<i>Manfreda brunnea</i>	A	<i>Manfreda guerrensis</i>	R*	<i>Manfreda longiflora</i>	A
<i>Manfreda nanchititlensis</i>	A*	<i>Manfreda planifolia</i>	R*	<i>Manfreda potosina</i>	R*
<i>Polianthes densiflora</i>	R*	<i>Polianthes howardii</i>	R*	<i>Polianthes longiflora</i>	R*
<i>Polianthes palustris</i>	R*	<i>Polianthes platyphylla</i>	R*	<i>Yucca endlichiana</i>	R
<i>Yucca grandiflora</i>	R*	<i>Yucca lacandonica</i>	A	<i>Yucca queretaroensis</i>	R

ANEXO 2

REGISTRO DE COLECTA DE LOS INDIVIDUOS EXAMINADOS

Beaucarnea stricta Lem. MÉXICO: PUEBLA: Carretera Izúcar-Acatlán, entre la desviación a Noria Chica y la desviación a Ahuehuetitla. 18° 13' 34.3'' N, 98° 09' 55.1'' W; 1297 m s. n. m. Bosque tropical caducifolio situado en la ladera de una colina. Abundantes leguminosas, *Dioon*, *Gonolobus*, *Pachycereus* Fecha: 5 de Mayo de 2004. Colector: Mark E. Olson con Angélica Cervantes y Ken Olsen.

Beaucarnea hiriartae L. Hern. MÉXICO: GUERRERO: Mpio Eduardo Neri: ladera empinada al SO de Puente La Cañada sobre la carretera México-Acapulco, ca 1 km al N de Venta Vieja. 17°49'23.3"N, 99°33'52.18"W, 650 msnm. Abundante en bosque tropical caducifolio con *Bursera*, *Ceiba*, *Ziziphus*, *Opuntia*, *Plumeria*, *Pseudosmodium*, *Hechtia*, varias leguminosas, etc. Fecha: 5 de Mayo de 2005. Colector: Mark E. Olson con Julieta Rosell y Frank Ewers.

Beaucarnea goldmanii Rose. MÉXICO: UNAM: CU: Instituto de Biología: Jardín Botánico Exterior. 19° 19 08.6 N, 99° 11 08.4 W. 2345 m s.n.m. Individuo de 3 m de altura que ramifica a partir de los 30 cm. Meristemos separados por 1-1.5 m. Hojas lisas verde-oscuro con forma rizada de ~1.5 m de largo y 2-2.5 cm de ancho en la porción media-baja. Grosor > *Beaucarnea gracilis*. Tronco agrietado, ancho y amorfo. Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. N.v. "Corcho Coyolillo". Fecha: 13 Marzo 2006. Colector y número: Vanessa Rojas 2.

Beaucarnea recurvata Lem. MÉXICO: UNAM: CU: Instituto de Biología: Jardín Botánico Exterior. 19° 19 09 N, 99° 11 07 W. 2331 m. Individuo de 1.5 m de altura que ramifica a partir de una protuberancia redondeada que emerge de la base amorfa y agrietada. Tallo delgado y completamente cubierto por hojas viejas. Hojas aserradas verde-amarillentas, no-rizadas. Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. N.v. "Pata de Elefante", "Sayate", "Monjita". Fecha: 13 Marzo 2006. Colector y número: Vanessa Rojas 3.

Beaucarnea hiriartiae L. Hern. MÉXICO: UNAM: CU: Instituto de Biología: Jardín Botánico Exterior: Jardín Botánico Exterior. 19° 19 07.9 N, 99° 11 37.6 W. 2330 m. Individuo de 2 m de altura, hojas aserradas, verdes, no rizadas, de ~ 1 m (máx), hojas nuevas de la mitad del meristemo hacia arriba, hojas viejas de la mitad hacia abajo (marcada diferencia). Tronco muy agrietado. Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 13 Marzo 2006. Colector y número: Vanessa Rojas 4.

Calibanus hookerii (Lem) Trel. MÉXICO: UNAM: CU: Instituto de Biología: Jardín Botánico Exterior: Jardín Botánico Exterior. 19° 19' 08.7 N, 99° 11' 37.7 W. 2318 m. Tronco globoso prácticamente subterráneo, sobresale una porción de unos 10 cm. Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 17 Marzo 2006. Colector y número: Vanessa Rojas 5.

Beaucarnea stricta Lem. MÉXICO: UNAM: CU: Instituto de Biología: Jardín Botánico Exterior: Jardín Botánico Exterior. 19° 19' 07.8 N, 99° 11' 37.1 W. 2326 m. Individuo de 1 m de altura. Hojas aserradas no rizadas, verde-claro. Tronco cubierto por hojas viejas, agrietado en hexágonos, sin ramificación, meristemos salen directamente de la base, el principal es apical. Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 17 Marzo 2006. N.v. Estrella. Colector y número: Vanessa Rojas 6.

Beaucarnea gracilis Lem. MÉXICO: UNAM: CU: Instituto de Biología: Jardín Botánico Exterior: Jardín Botánico Exterior. 19° 19' 08.2 N, 99° 11' 36.1 W. 2324 m. Individuo de 3 m de altura, ramificaciones largas y muchas; hojas verde-grisáceo, aserradas y delgadas, máx. 0.5 m de longitud. Tronco agrietado. Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 17 Marzo 2006. Colector y número: Vanessa Rojas 7.

Beaucarnea pliabilis (Baker) Rose. MÉXICO: UNAM: CU: Instituto de Biología: Jardín Botánico Exterior: Jardín Botánico Exterior. 19° 19' 09.3 N, 99° 11' 37.2 W. 2330 m. Individuo de 1 m de altura. Hojas lisas no rizadas, verde-amarillento. Tronco con base redondeada no muy agrietado, textura más bien lisa; ramifica en el ápice. N.v. "Despeinada", "Tzipil". Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 17 Marzo 2006. Colector y número: Vanessa Rojas 8.

Beaucarnea gracilis Lem. MÉXICO: PUEBLA: Tehuacán: Meseta de San Lorenzo. Antes de entrar a la ciudad de Tehuacán. 18° 28' 45 N, 99° 26' 51 W. 1726m. T.V.: Matorral xerófilo crasicuale. Individuo de 8 m de altura, ramifica a partir de 2.5 m aprox. Tres ramas principales largas de donde emergen ramas secundarias cortas; base agrietada formando hexágonos longitudinales largos. Hojas de ~ 28 cm de longitud y 0.25 cm de ancho a la mitad de la hoja, verde-grisáceas, no-rizadas. Muy pocos individuos, todos longevos. Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 07 de Agosto de 2006. Colector y número Vanessa Rojas 9 con Medina Lemos.

Beaucarnea gracilis Lem. MÉXICO: PUEBLA: Zapotitlán. 18° 28' 76 N, 97° 26' 85 W. 1729 m. T.V. Matorral Xerófilo Crasicuale. Individuo de 8 m de alto, ramifica a partir de dos ramas principales largas, ramas secundarias cortas; base agrietada longitudinalmente. Hojas de ~ 47 cm de longitud y de ~ 0.5 cm de ancho, verde-grisáceas, no-rizadas. En la localidad muy pocos individuos, todos longevos. Se colectó inflorescencia y material de respaldo para trabajo

molecular. Fecha: 07 de Agosto de 2006. Colector y número: Vanessa Rojas 10 con Medina Lemos.

Beaucarnea gracilis Lem. MÉXICO: PUEBLA: Zapotitlán: Terracería a Los Reyes Chazumba. 18° 15' 57 N, 97° 29' 59 W. 1677 m. T.V.: Matorral Xerófilo Crasicaule. Individuo de ~7 m de altura, ramifica a partir de una rama principal larga; base agrietada formando hexágonos longitudinales largos. Hojas de ~ 46 cm de longitud y de ~ 0.45 cm de ancho, verde-grisáceas, no-rizadas. Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 07 de Agosto de 2006. Colector y número: Vanessa Rojas 11 con Medina Lemos.

Beaucarnea gracilis Lem. MÉXICO: PUEBLA: Zapotitlán: Terracería a Los Reyes Chazumba. 18° 19' 25 N; 97° 30' 56 W. 1518 m. T.V.: Matorral Xerófilo Crasicaule. Individuo de ~8 m de altura, ramifica a partir de dos ramas principales largas; base agrietada formando hexágonos longitudinales largos. Hojas de ~ 57 cm de longitud y de ~ 0.5 cm de ancho, verde-grisáceas, no-rizadas. Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 07 de Agosto de 2006. Colector y número: Vanessa Rojas 12 con Medina Lemos.

Beaucarnea gracilis Lem. MÉXICO: PUEBLA: Zapotitlán: Terracería a Los Reyes Chazumba. 18° 15' 93 N, 97° 30' 06 W. 1526 m. T.V.: Matorral Xerófilo Crasicaule. Individuo de ~9 m de altura, ramifica a partir de tres ramas principales largas; base agrietada longitudinalmente. Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 07 de Agosto de 2006. Colector y número: Vanessa Rojas 13 con Medina Lemos.

Beaucarnea purpusii Rose. MÉXICO: PUEBLA: Zapotitlán: Carr. 125. Límite entre Puebla y Oaxaca 18° 13' 11 N, 97° 36' 73 W. 2014 m. T.V. Bosque Tropical Caducifolio Secundario. Individuo de ~8 m de alto, ramifica a partir de los 2 m aprox. Corteza agrietada formando rectángulos largos. Hojas ~ 38 cm de longitud y de ~ 1.1 cm de ancho, verdes, no-rizadas. Las hojas viejas permanecen en el tronco. En la localidad muy pocos individuos. Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 08 de Agosto de 2006. Colector y número: Vanessa Rojas 14 con Medina Lemos.

Beaucarnea purpusii Rose. MÉXICO: PUEBLA: Zapotitlán: Carr. 125. Límite entre Puebla y Oaxaca. 18° 12' 68 N, 97° 38' 03 W. 2026 m. T.V. Bosque Tropical Caducifolio. Individuo de ~ 8m de altura, ramifica a partir de los 2 m aprox. Corteza agrietada formando rectángulos largos. Hojas ~ 68 cm de longitud y de ~ 1.0 cm de ancho a la mitad de la hoja, verdes, no-rizadas. Las hojas viejas permanecen en el tronco. En la localidad muy pocos individuos. Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 09 de Agosto de 2006. Colector y número: Vanessa Rojas 15 con Medina Lemos.

Beaucarnea purpusii Rose. MÉXICO: PUEBLA: Zapotitlán: Carr. 125. Límite entre Puebla y Oaxaca. 18° 12' 61 N, 97° 38' 31 W. 2035 m. T.V. Bosque tropical caducifolio. Individuo de ~ 7m de altura, ramifica a partir de los 2 m aprox. Corteza agrietada formando rectángulos largos. Hojas ~ 48 cm de longitud y de ~ 1.0 cm de ancho a la mitad de la hoja, verdes, no-rizadas. Las hojas viejas permanecen en el tronco. En la localidad muy pocos individuos. Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 09 de Agosto de 2006. Colector y número: Vanessa Rojas 16 con Medina Lemos.

Beaucarnea gracilis Lem. MÉXICO: PUEBLA: Tehuacán: Carr. 125. 1 km antes de San Antonio Texcala. 18° 12' 68 N, 97° 38' 31 W. 2026 m. T.V. Matorral xerófilo, perturbado. Individuo de ~8 m de alto. Rosetas foliares abundantes con hojas largas y con hojas viejas. Base agrietada longitudinalmente. Hojas de ~ 46 cm de longitud y ~ 0.47 cm de ancho, verdes, no-rizadas. Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 09 de Agosto de 2006. Colector y número: Vanessa Rojas 17 con Medina Lemos.

Beaucarnea gracilis Lem. MÉXICO: OAXACA: Huajuapán: A 1km de la entrada a San Sebastián Frontera. 18° 15' 57 N, 97° 29' 59 W. 1677 m. T.V. Matorral xerófilo. Individuo de ~9 m de alto. Rosetas foliares abundantes con hojas largas y con hojas viejas. Base agrietada longitudinalmente. Hojas de ~ 61 cm de longitud y ~ 0.47 cm de ancho, verdes, no-rizadas. Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 09 de Agosto de 2006. Colector y número Vanessa Rojas 18 con Medina Lemos.

Beaucarnea gracilis Lem. MÉXICO: OAXACA: Huajuapán. Entrada a Santiago Chazumba. 18° 12' 20 N, 97° 40' 25 W. 1962 m. T.V. Matorral xerófilo. Individuo de ~8 m de alto. Semejante a *B. gracilis* excepto por un crecimiento foliar mucho más abundante y largo, manteniendo las hojas viejas. Base agrietada longitudinalmente. Hojas de ~ 62 cm de longitud y ~ 0.55 cm de ancho, verdes, no-rizadas. Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 09 de Agosto de 2006. Colector y número: Vanessa Rojas 19 con Medina Lemos.

Beaucarnea stricta Lem. MÉXICO: OAXACA: Cuicatlán. A 60 km de la Ciudad de Oaxaca. Entre San Juan Tonaltepec y Santiago Dominguillo. 17° 52' 51 N, 97° 43' 36 W. 1762 m. T.V. Bosque tropical caducifolio, perturbado. Individuo de ~4 m de alto, ramifica desde la base. Base agrietada formando hexágonos pequeños. Hojas de ~64 cm de longitud y de ~1.1 cm de ancho, verdes, no-rizadas, duras y puntiagudas. Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. N.V. "Soyate de Tehuantepec". Fecha: 11 de Agosto de 2006. Colector y número: Vanessa Rojas 20 con Medina Lemos.

Beaucarnea stricta Lem. MÉXICO: OAXACA: Cuicatlán. A 60 km de la Ciudad. de Oaxaca. Entre San Juan Tonaltepec y Santiago Dominguillo. 17° 52' 51 N, 97° 43' 36 W. 1762 m T.V. Bosque tropical caducifolio, perturbado. Individuo de ~ 5 m de alto, ramifica desde la base. Base agrietada formando hexágonos pequeños. Hojas de ~57 cm de longitud y de ~0.95 cm de ancho, verdes, no-rizadas, duras y puntiagudas. Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. N.V. "Soyate de Tehuantepec". Fecha: 11 de Agosto de 2006. Colector y número: Vanessa Rojas 21 con Medina Lemos.

Beaucarnea stricta Lem. MÉXICO: OAXACA: Cuicatlán. A 60 km de la Cd. de Oaxaca. Entre San Juan Tonaltepec y Santiago Dominguillo. 17° 52' 51 N, 97° 43' 36 W. 1762 m. T.V. Bosque tropical caducifolio, perturbado. Individuo de ~ 7 m de alto, ramifica desde la base. Base agrietada formando hexágonos pequeños. Hojas de ~73 cm de longitud y de ~1.7 cm de ancho, verdes, no-rizadas, duras y puntiagudas. Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. N.V. "Soyate de Tehuantepec". Fecha: 11 de Agosto de 2006. Colector y número: Vanessa Rojas 22 con Medina Lemos.

Beaucarnea purpusii Rose. MÉXICO: OAXACA: Cuicatlán: Terracería a San Pedro Jocotipac. 17° 35' 74 N, 96° 57' 04 W. 1506m. T.V. Bosque tropical caducifolio. Individuo de ~ 7 m de alto. Base agrietada longitudinalmente. Hojas de ~ 62 cm de longitud y ~ 0.6 cm de ancho, verdes, no-rizadas. Coexistiendo con *B. gracilis*. Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 11 de Agosto de 2006. Colector y número: Vanessa Rojas 23 con Medina Lemos.

Beaucarnea purpusii Rose. MÉXICO: OAXACA: Cuicatlán: Terracería a San Pedro Jocotipac. 17° 35' 74 N, 96° 57' 04 W. 1506m. T.V. Bosque tropical caducifolio. Individuo de ~ 7 m de alto. Base agrietada longitudinalmente. Hojas de ~ 62 cm de longitud y ~ 0.6 cm de ancho, verdes, no-rizadas. Coexistiendo con *B. gracilis*. Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 11 de Agosto de 2006. Colector y número: Vanessa Rojas 24 con Medina Lemos.

Beaucarnea gracilis Lem. MÉXICO: OAXACA: Cuicatlán: Terracería a San Pedro Jocotipac. 17° 35' 74 N, 96° 57' 04 W. 1506m. T.V. Bosque tropical caducifolio. Individuo de ~5.5 m de alto, ramifica. Base agrietada formando hexágonos longitudinales largos. Hojas de ~50 cm de longitud y de ~0.46 cm de ancho, verde-grisáceas, no-rizadas. Individuos coexistiendo con *B. purpusii*. Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 11 de Agosto de 2006. Colector y número: Vanessa Rojas 25 con Medina Lemos.

Beaucarnea purpusii Rose. MÉXICO: OAXACA: Cuicatlán: Terracería a San Pedro Jocotipac. 17° 35' 74 N, 96° 57' 04 W. 1506m. T.V. Bosque tropical caducifolio. Ramifica Base agrietada. Hojas de ~69 cm de longitud y de ~0.5 cm de ancho, verdes, no-rizadas, duras y puntiagudas.

Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 11 de Agosto de 2006. Colector y número: Vanessa Rojas 26 con Medina Lemos.

Calibanus hookerii (Lem) Trel. MÉXICO: GUANAJUATO: a 1.7 km de la frontera con S.L.P. 21° 36' 00 N, 100° 45' 06.7 W. 1958 m. T.V. Matorral Xerófilo. Individuo creciendo en grietas de roca volcánica. Muy pocos individuos. Coexistiendo con *Jatropha spathulata*, *Commelinaceas*, *Euphorbia*, *Ferocactus*, *Dodonaea viscosa*, *Stenocactus*, *Penstemon*, *Acacia farnesiana*, *Prosopis laevigata*, *Tecoma stans*. Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 04 de Septiembre de 2006. Colector y número: Vanessa Rojas 27 con M. Olson.

Beaucarnea recurvata Lem. MÉXICO: TAMAULIPAS: Antiguo Morelos: Carr. 80. A 8.5 km de A. Morelos. 22° 33' 00 N, 99° 09' 45.5 W. 310 m s.n.m. T.V. Selva Mediana Subperennifolia. Individuo de ~ 7.5 m de altura y 4.4 m de diámetro. Base agritada. Hojas verdes rizadas. Individuos longevos, no se observaron juveniles. Coexistiendo con *Palicourea*, *Cnidocolus*, *Randia*, *Zanthoxylum*, *Malpighiaceas*, *Croton*, leguminosas, Rubiaceas. Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 08 de Septiembre de 2006. Colector y número: Vanessa Rojas 28 con M. Olson.

Beaucarnea recurvata Lem. MÉXICO: TAMAULIPAS: Antiguo Morelos: Carr. 80. A 8.5 km de A. Morelos. 22° 33' 17 N, 99° 09' 30.2 W. 488 m s.n.m. T.V. Selva Mediana Subperennifolia. Individuo de ~ 7 m de altura y 4 m de diámetro. Base agrietada. Hojas verdes rizadas. Individuos longevos, no se observaron juveniles. Coexistiendo con *Paliourea*, *Cnidocolus*, *Rambdia*, *Zanthoxylum*, *Malpighiaceas*, *Croton*, leguminosas, Rubiaceas. Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 08 de Septiembre de 2006. Colector y número Vanessa Rojas 29 con M. Olson.

Beaucarnea recurvata Lem. MÉXICO: TAMAULIPAS: Antiguo Morelos: Carr. 85.: Cueva del Abra: A 9 km de A. Morelos. 22° 36' 33.5 N, 99° 01' 27.4 W. 307 m s.n.m. T.V. Selva Mediana Subperennifolia. Individuo de ~ 7 m de altura y 5 m de diámetro. Base agrietada. Hojas verdes rizadas, aserradas, suaves y con alto grado de herbivoría. Individuos longevos, no se observaron juveniles. Coexistiendo con *Sergania*, *Bursera simaruba*, *Ficus*, *Pseudobombax*, leguminosas. Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 08 de Septiembre de 2006. Colector y número Vanessa Rojas 30 con M. Olson.

Beaucarnea compacta L. Hern & Zamudio. MÉXICO: GUANAJUATO: Xichú: Terracería Atarjea a San Luis de la Paz. 21° 19' 25 N, 99° 57' 38.6 W. 1152 m s.n.m. T.V. Matorral Xerófilo. Individuo de ~ 15 cm de altura. Base globosa y agritada. Inflorescencia de ~ 2 m de longitud. Hojas azul-verdosas. *Myrtillocactus geometrizans*, *Prosopis laevigata*, *Ipomoea*, *Jatropha spatulata*, *Cordia*, *Tecoma*, *Fouquieria splendens subsp campanulata*. N.v. "Saca

Mecate". Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 10 de Septiembre de 2006. Colector y número Vanessa Rojas 31 con M. Olson.

Beaucarnea compacta L. Hern & Zamudio. MÉXICO: GUANAJUATO: Xichú: Terracería Atarjea a San Luis de la Paz. 21° 19' 25 N, 99° 57' 38.6 W. 1152 m s.n.m. T.V. Matorral Xerófilo. Individuo de ~ 13 cm de altura. Base globosa y agrietada. Inflorescencia de ~ 2.5 m de longitud. Hojas azul-verdosas. *Myrtillocactus geometrizans*, *Prosopis laevigata*, *Ipomoea*, *Jatropha spatulata*, *Cordia*, *Tecoma*, *Fouquieria splendens subsp campanulata*. N.v. "Saca Mecate". Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 10 de Septiembre de 2006. Colector Vanessa Rojas 32 con M. Olson.

Beaucarnea compacta L. Hern & Zamudio. MÉXICO: GUANAJUATO: Xichú: Terracería Atarjea a San Luis de la Paz. 21° 19' 25 N, 99° 57' 38.6 W. 1152 m s.n.m. T.V. Matorral Xerófilo. Individuo de ~ 15 cm de altura. Base globosa y agrietada. Inflorescencia de ~ 2 m de longitud. Hojas azul-verdosas. Coexistiendo con *Stenocereus queretaroensis*, *S. dumortieri*, *Bursera morelensis*, *Mirtilocactus geometrizans*, *Prosopis laevigata*, *Ipomoea*, *Jatropha spatulata*, *Cordia*, *Tecoma*, *Fouquieria splendens subsp campalunata*. Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. N.v. "Saca Mecate". Sin flores ni frutos, material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 10 de Septiembre de 2006. Colector y número: Vanessa Rojas 33 con M. Olson.

Calibanus glassianus L. Hern & Zamudio. MÉXICO: GUANAJUATO: Xichú: Terracería Guamuchil a Xichú: Pueblo Yanetes. 21° 20' 54.6 N, 99° 58' 16.6 W. 932 m s.n.m. T.V. Matorral Xerófilo. Muy similar a *Beaucarnea compacta*. Base globosa y agrietada. Inflorescencia de ~ 1.5 m de longitud. Hojas verdes no-rizadas. Creciendo en ladera rocosa muy inclinada de piedra caliza, junto a un río. Coexistiendo con *Bursera morelensis*, *Fouquieria splendens*, *Hechtia*, *Agave*, *Mortilia*, *Jatropha*. Material de respaldo para trabajo molecular. N.v. "Saca Mecate". Fecha: 10 de Septiembre de 2006. Colector y número: Vanessa Rojas 34 con M. Olson.

Calibanus glassianus L. Hern & Zamudio. MÉXICO: GUANAJUATO: Xichú: Terracería Guamuchil a Xichú: Pueblo Yanetes. 21° 20' 55.1 N, 99° 58' 18.8 W. 973 m s.n.m. T.V. Matorral Xerófilo. Muy similar a *Beaucarnea compacta*. Base globosa y agrietada. Inflorescencia de ~ 1.3 m de longitud. Hojas verdes no-rizadas. Creciendo en ladera rocosa muy inclinada de piedra caliza, junto a un río. Coexistiendo con *Bursera morelensis*, *Fouquieria splendens*, *Hechtia*, *Agave*, *Mortilia*, *Jatropha*. N.v. "Saca Mecate". Material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 10 de Septiembre de 2006. Colector y número: Vanessa Rojas 35 con M. Olson.

Calibanus glassianus L. Hern & Zamudio. MÉXICO: GUANAJUATO: Xichú: Terracería Guamuchil a Xichú: Pueblo Yanetes. 21° 20' 59.6 N, 99° 58' 10.2 W. 973 m s.n.m. T.V. Matorral Xerófilo. Muy similar a *Beaucarnea compacta*. Base globosa y agrietada. Inflorescencia de ~ 1.5 m de longitud. Hojas verdes no-rizadas. Creciendo en ladera rocosa muy inclinada de piedra caliza, junto a un río. Coexistiendo con *Bursera morelensis*, *Fouquieria splendens*, *Hechtia*, *Agave*, *Mortilia*, *Jatropha*. N.v. "Saca Mecate". Material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 10 de Septiembre de 2006. Colector y número: Vanessa Rojas 36 con M. Olson.

Beaucarnea hiriartiae L. Hern. MÉXICO: GUERRERO: Cañón del Zopilote. 17° 36' 42.7 N, 99° 33' 57.2 W. 1310 m s.n.m. T.V. Bosque Tropical Caducifolio. Individuo de ~ 2 m de altura y 60 cm de diámetro. Coexistiendo con *Bursera sp.*, *Neobuxbaumia mezcalensis*. Material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 23 de Agosto de 2006. Colector y número: R. Medina Lemos E-424

Beaucarnea hiriartiae L. Hern MÉXICO: GUERRERO: Cañón del Zopilote. 17° 36' 42.7 N, 99° 33' 57.2 W. 1310 m s.n.m. T.V. Bosque Tropical Caducifolio. Individuo de ~ 2 m de altura y 50 cm de diámetro. Coexistiendo con *Bursera sp.*, *Neobuxbaumia mezcalensis*. Material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 23 de Agosto de 2006. Colector y número Rosalinda Medina Lemos E-425

Beaucarnea hiriartiae L. Hern MÉXICO: GUERRERO: Cañón del Zopilote. 17° 36' 42.7 N, 99° 33' 57.2 W. 1310 m s.n.m. T.V. Bosque Tropical Caducifolio. Individuo de ~ 2 m de altura y 50 cm de diámetro. Coexistiendo con *Bursera sp.*, *Neobuxbaumia mezcalensis*. Material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 23 de Agosto de 2006. Colector y número Rosalinda Medina Lemos E-426

Beaucarnea pliabilis (Baker) Rose. MÉXICO: QUINTANA ROO: 12 km al NE de Tulum considerando como km 0 el super San Francisco de Asis de Tulum, sobre la carretera Tulum – Xel-Há, 4 km antes de Xel-Há. 20° 17' 21.5" N; 87° 23' 07.8" W; Alt: 5 m.s.n.m. T.V. Bosque tropical subdeciduo. Coexistiendo con leguminosas, orquídeas y *Agave sp.* Pequeña población de ~ 20 individuos de 6 m de altura situados a los costados del camino de terracería que va al Cenote Yaxmuul. Material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 29 de diciembre de 2006. Colector y número: A. Cervantes 44

Beaucarnea guatemalensis Rose. MÉXICO: GUATEMALA; Jardín de Mario Véliz. Colectado originalmente en el Volcán Jumay. 89° 59' 34" N ,14° 41' 37" W. Material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 31 de Enero de 2007. Colector y número: J. Carlos Montero-Castro, Laura Trejo y Mario Véliz 1004.

Beaucarnea guatemalensis Rose. MÉXICO: GUATEMALA: km 196 de la carretera Guatemala-Cobán, 1/2 km al N de la aldea Chicoyoj. 90° 25.356' N, 15° 22.034' W. 1336 msnm. Material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 5 de Febrero de 2007. Colector y número: J. Carlos Montero-Castro y Laura Trejo 1033.

Beaucarnea goldmanii Rose. MÉXICO: GUATEMALA: Alta Verapaz: 3 Km a partir de la desviación a Lanquín. Km. 51 de la carretera a Cobán, 57 Km. a Fray Bartolome de las Casas. 15° 35.946' N; 90° 02.778' W. 1025 m. Material de respaldo para trabajo molecular. Fecha: 05 de febrero de 2007. Colector y número: Laura Trejo 5

Beaucarnea goldmanii Rose. MÉXICO: CHIAPAS: 15 km en línea recta al SSO de Comitán: camino asfaltado que va a Muninjao, 3 km del entronque con el camino al S de Tzimol; el entronque se encuentra a 7 km al S (por carretera) de Tzimol. 16°07'12.4"N, 92°10'45.5"W, 194 m.s.n.m. T.V. Bosque tropical caducifolio seco. Árboles de hasta 7 m localmente muy abundante. Muchas plantas con frutos. Creciendo en bosque muy perturbado sobre tierra caliza con pendiente mínima. Coexistiendo con *Pedilanthus*, *Plumeria*, *Acacia* y muchas otras leguminosas, compuestas y gramíneas. Fecha: 14 de Mayo de 2007. Colector y número. Mark E. Olson Zunica 1103 junto con Julieta A. Rosell García.

Beaucarnea congesta L. Hern. MÉXICO: OAXACA: Ixtaltepec: Juchitán: Nizanda, Cerro Verde. 16°39'55.7"N, 95°00'23.4"W, 172 msnm. Árboles de hasta 10 m de altura y de circunferencia, con muchos individuos en varias etapas de desarrollo, incluyendo individuos pequeños. Laderas calcareas creciendo con *Cephalocereus*, *Pachycereus*, *Bursera*, *Plumeria*, *Cnidioscolus*, *Agave*, *Hechtia*, *Pseudobombax*, etc. Fecha: 20 de Mayo de 2007. Colector y número: Mark E. Olson Zunica 1124 junto con Julieta A. Rosell García.

ANEXO 3

**MATRIZ CON LA ALINEACIÓN DE LA REGIÓN
ITS UTILIZADA PARA LOS ANÁLISIS
FILOGENÉTICOS DEL ESTUDIO.**

410 420 430 440 450 460 470 480 490 500

B. recurvata Tamps GCGTCACGCCCTCGCGTCGCTCCGCACGCCCTGCCCCCGGACC-GGGAGGTGGCGGGCGCGGATGCGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
B. recurvata JB GCGTCACGCCCTCGCGTCGCTCCGCACGCCCTGCCCCCGGACC-GGGAGGTGGCGGGCGCGGATGCGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
B. inermis Oax GCGTCACGCCCTCGCGTCGCTCCGCACGCCCTGCCCCCGGACC-GGGAGGTGGCGGGCGCGGATGCGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
B. hiriartiae Gro GCGTCACGCCCTCGCGTCGCTCCGCCTGCCCTGCCCCCGGATC-GGGAGGTGGCGGGCGCGGATGCGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
B. hiriartiae JB GCGTCACGCCCTCGCGTCGCTCCGCACGCCCTGCCCCCGGATC-GGGAGGTGGCGGGCGCGGATGCGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
B. compacta 1 GCGTCACGCCCTCGCGTCGCTCCGCACGCCCTGCCCCCGGACC-GGGAGGTGGCGGGCGCGGATGCGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
B. compacta 2 GCGTCACGCCCTCGCGTCGCTCCGCACGCCCTGCCCCCGGACC-GGGAGGTGGCGGGCGCGGATGCGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
B. compacta 3 GCGTCACGCCCTCGCGTCGCTCCGCACGCCCTGCCCCCGGACC-GGGAGGTGGCGGGCGCGGATGCGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
C. glassianus 1 GCGTCACGCCCTCGCGTCGCTCCGCACGCCCTGCCCCCGGACC-GGGAGGTGGCGGGCGCGGATGCGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
C. glassianus 2 GCGTCACGCCCTCGCGTCGCTCCGCACGCCCTGCCCCCGGACC-GGGAGGTGGCGGGCGCGGATGCGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
C. glassianus 3 GCGTCACGCCCTCGCGTCGCTCCGCACGCCCTGCCCCCGGACC-GGGAGGTGGCGGGCGCGGATGCGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
C. glassianus 4 GCGTCACGCCCTCGCGTCGCTCCGCACGCCCTGCCCCCGGACC-GGGAGGTGGCGGGCGCGGATGCGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
C. glassianus 5 GCGTCACGCCCTCGCGTCGCTCCGCACGCCCTGCCCCCGGACC-GGGAGGTGGCGGGCGCGGATGCGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
C. hookerii Gto GCGTCACGCCCTCGCGTCGCTCCGCACGCCCTGCCCCCGGATC-GGGAGGTGGCGGGCGCGGATGCGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
B. guatemalensis 1 GCGTCACGCCCTCCCGTCGCTCCTTGCA-CCCTCGCCCCCGGACCAGGGAGGTGGCGGGTGC GGATGCGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
B. guatemalensis 2 GCGTCACGCCCTCCCGTCGCTCCTTGCA-CCCTCGCCCCCGGACCAGGGAGGTGGCGGGTGC GGATGCGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
B. guatemalensis 3 GCGTCACGCCCTCCCGTCGCTCCTTGCA-CCCTCGCCCCCGGACCAGGGAGGTGGCGGGTGC GGATGCGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
B. goldmanii JB GCGTCACGCCCTCCCGTCGCTCCTTGCA-CCCTCGCCCCCGGACCAGGGAGGTGGCGGGTGC GGATGCGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
B. goldmanii Chil1 GCGTCACGCCCTCCCGTCGCTCCTTGCA-CCCTCGCCCCCGGACCAGGGAGGTGGCGGGTGC GGATGCGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
B. goldmanii Chi2 GCGTCACGCCCTCCCGTCGCTCCTTGCA-CCCTCGCCCCCGGACCAGGGAGGTGGCGGGTGC GGATGCGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
B. pliabilis QRoo GCGTCACGCCCTCCCGTCGCTCCTTGCA-CCCTCGCCCCCGGACCAGGGAGGTGGCGGGTGC GGATGCGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
B. pliabilis JB GCGTCACGCCCTCCCGTCGTTCTTGCA-CCCTCGCCCCCGGACCAGGGAGGTGGCGGGTGC GGATGCGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
B. stricta Oax GCGTCACGCCCTCGCGTCGCTCCGCAGCCCCCGGACC-GGGAGGTGGCAGGCGCGGATGCGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
B. stricta Pue GCGTCACGCCCTCGCGTCGCTCCGCAGCCCCCGGACC-GGGAGGTGGCGGGCGCGGATGCGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
B. stricta JB GCGTCACGCCCTCGCGTCGCTCCGCAGCCCCCGGACC-GGGAGGTGGCGGGCGCGGATGCGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
B. gracilis Oax GCGTCACGCCCTCGCGTCGCTCCGCACGCCCTGCCCCCGGACC-GGGAGGTGGCGGGCGCGGATGCGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
B. gracilis Pue GCGTCACGCCCTCGCGTCGCTCCGCACGCCCTGCCCCCGGACC-GGGAGGTGGCGGGCGCGGATGCGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
B. gracilis JB GCGTCACGCCCTCGCGTCGCTCCGCACGCCCTGCCCCCGGACC-GGGAGGTGGCGGGCGCGGATGCGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
B. purpusii Oax GCGTCACGCCCTCGCGTCGCTCCGCCTGCCCTGCCCCCGGACC-GGGAGGTGGCGGGCGCGGATGCGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
N. nelsonii GB NNNNNNNNNNTCGCGTCGCTCCGCAGCCCC-GCCCCCAGCTCGGGGAGGCG-CG--TGCG-ATGCGGAGATTGGCCCCCGTGCTAGCGGTGCGGCG
N. lindheimerianaGB NNNNNNNNNNTCGCGTCGCTCCGCAGCCCC-GCCCCCAGCTCGGGGAGGCG-CG--TGCG-ATGCGGAGATTGGCCCCCGTGCTAGCGGTGCGGCG
D. berlandieri GB NNNNNNNNNNTCAGTCGCTCCGAGCAGCCCC-GCCCCCTGGATCGGGGAGGTGGCGGGCGCGGAT-CGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
D. longissimum GB NNNNNNNNNNTCAGTCGCTCCGAGCAGCCCC-GCCCCCTGGATCGGGGAGGTGGCGGGCGCGGAT-CGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
D. wheeleri GB NNNNNNNNNNTCAGTCGCTCCGAGCAGCCCC-GCCCCCTGGATCGGGGAGGTGGCGGGCGCGGAT-CGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG
D. texanum GB NNNNNNNNNNTCAGTCGCTCCGAGCAGCCCC-GCCCCCTGGATCGGGGAGGTGGCGGGCGCGGAT-CGGAGACTGGCCCCCGTGCTCGCGGTGCGGCG

510 520 530 540 550 560 570 580 590 600

B. recurvata Tamps GGCTGAAGTGAGGGCCCGCGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGACACGAACGGCGCTCAGCGTTGCCTCCGCCCCCGATCCTAGCGGCCAT
B. recurvata JB GGCTGAAGTGAGGGCCCGCGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGACACGAACGGCGCTCAGCGTTGCCTCCGCCCCCGATCCTAGCGGCCAT
B. inermis Oax GGCTGAAGTGAGGGCCCGCGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGACACGAACGGCGCTCAGCGTTGCCTCCGCCCCCGATCCTAGCGGCCAT
B. hiriartiae Gro GGCTGAAGTGAGGGCTGCCGGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGACACGAACGGCGCTCAGCGTTGCCTCCGCCCCCGATCCTAGCGGCCAT
B. hiriartiae JB GGCTGAAGTGAGGGCTGCCGGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGACACGAACGGCGCTCAGCGTTGCCTCCGCCCCCGATCCTAGCGGCCAT
B. compacta 1 GGCTGAAGTGAGGGCCCGCGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGACACGAACGGCGCTCAGCGTTGCCTCCGCCCCCGATCCTAGCGGCCAT
B. compacta 2 GGCTGAAGTGAGGGCCCGCGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGACACGAACGGCGCTCAGCGTTGCCTCCGCCCCCGATCCTAGCGGCCAT
B. compacta 3 GGCTGAAGTGAGGGCCCGCGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGACACGAACGGCGCTCAGCGTTGCCTCCGCCCCCGATCCTAGCGGCCAT
C. glassianus 1 GGCTGAAGTGAGGGCCCGCGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGACACGAACGGCGCTCAGCGTTGCCTCCGCCCCCGATCCTAGCGGCCAT
C. glassianus 2 GGCTGAAGTGAGGGCCCGCGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGACACGAACGGCGCTCAGCGTTGCCTCCGCCCCCGATCCTAGCGGCCAT
C. glassianus 3 GGCTGAAGTGAGGGCCCGCGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGACACGAACGGCGCTCAGCGTTGCCTCCGCCCCCGATCCTAGCGGCCAT
C. glassianus 4 GGCTGAAGTGAGGGCCCGCGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGACACGAACGGCGCTCAGCGTTGCCTCCGCCCCCGATCCTAGCGGCCAT
C. glassianus 5 GGCTGAAGTGAGGGCCCGCGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGACACGAACGGCGCTCAGCGTTGCCTCCGCCCCCGATCCTAGCGGCCAT
C. hookerii Gto GGCTGAAGTGAGGGCCCGCGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGACACGAACGGCGCTCAGCGTTGCCTCCGCCCCCGATCCTAGCGGCCAT
B. guatemalensis 1 GGCTGAAGTGCGGGCCCGCGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGATACGAACGGCGCTCAGCGTTGCCTCCGCCCCCGACCCCTAGCGGCCAT
B. guatemalensis 2 GGCTGAAGTGCGGGCCCGCGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGATACGAACGGCGCTCAGCGTTGCCTCCGCCCCCGACCCCTAGCGGCCAT
B. guatemalensis 3 GGCTGAAGTGCGGGCCCGCGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGATACGAACGGCGCTCAGCGTTGCCTCCGCCCCCGACCCCTAGCGGCCAT
B. goldmanii JB GGCTGAAGTGCGGGCCCGCGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGATACGAACGGCGCTCAGCGTTGCCTCCGCCCCCGACCCCTAGCGGCCAT
B. goldmanii Chil1 GGCTGAAGTGCGGGCCCGCGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGATACGAACGGCGCTCAGCGTTGCCTCCGCCCCCGACCCCTAGCGGCCAT
B. goldmanii Chi2 GGCTGAAGTGCGGGCCCGCGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGATACGAACGGCGCTCAGCGTTGCCTCCGCCCCCGACCCCTAGCGGCCAT
B. pliabilis QRoo GGCTGAAGTGCGGGCCCGCGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGATACGAACGGCGCTCAGCGTTGCCTCCGCCCCCGACCCCTAGCGGCCAT
B. pliabilis JB GGCTGAAGTGCGGGCCCGCGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGATACGAACGGCGCTCAGCGTTGCCTCCGCCCCCGACCCCTAGCGGCCAT
B. stricta Oax GGCTGAAGTGAGGGCCCGCGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGACACGAACGGCGCTCAGCGTTGCCTCCGCCCCCGATCCTAGCGGCCAT
B. stricta Pue GGCTGAAGTGAGGGCCCGCGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGACACGAACGGCGCTCAGCGTTGCCTCCGCCCCCGATCCTAGCGGCCAT
B. stricta JB GGCTGAAGTGAGGGCCCGCGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGACACGAACGGCGCTCAGCGTTGCCTCCGCCCCCGATCCTAGCGGCCAT
B. gracilis Oax GGCTGAAGTGAGGGCCCGCGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGACACGAACGGCGCTCAGCGTTGCCTCCGCCCCCGATCCTAGCGGCCAT
B. gracilis Pue GGCTGAAGTGAGGGCCCGCGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGACACGAACGGCGCTCAGCGTTGCCTCCGCCCCCGATCCTAGCGGCCAT
B. gracilis JB GGCTGAAGTGAGGGCCCGCGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGACACGAACGGCGCTCAGCGTTGCCTCCGCCCCCGATCCTAGCGGCCAT
B. purpusii Oax GGCTGAAGTGAGGGCTGCCGGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGACACGAACGGCGCTCAGCGTTGCCTCCGCCCCCGATCCTAGCGGCCAT
N. nelsonii GB GGCCGAAGTGCGGGCCCGCGTCTGGGACGGACGGACGCGGCGAGTGGTGGACGGACACGTACGGCGCTCAGCGCCGCGGATGCCCTC - GGGCCAGCAGCCAT
N. lindheimerianaGB GGCCGAAGTGCGGGCCCGCGTCTGGGACGGACGGACGCGGCGAGTGGTGGACGGACACGTACGGCGCTCAGCGCCGCGGATGCCCTC - GGGCCAGCAGCCAT
D. berlandieri GB GGCTGAAGTGCGGGCTGCCGGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGACACGTACGGCGCTCAGCGTCGCTTTTGCCCCCGATCCCAGTGGCCAT
D. longissimum GB GGCTGAAGTGCGGGCTGCCGGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGACACGTACGGCGCTCAGCGTCGCTTTTGCCCCCGATCCCAGTGGCCAT
D. wheeleri GB GGCTGAAGTGCGGGCTGCCGGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGACACGTACGGCGCTCAGCGTCGCTTTTGCCCCCGATCCCAGTGGCCAT
D. texanum GB GGCTGAAGTGCGGGCTGCCGGTCTGGGACGGATGCGGCGAGTGGTGGACGGACACGTACGGCGCTCAGCGTCGCTTTTGCCCCCGATCCCAGTGGCCAT

610 620 630 640

B.recurvata Tamps -CAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCGTGCCCTCGGAACA
B.recurvata JB -CAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCGTGCCCTCGGAACA
B.inermis Oax -CAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCGTGCCCTCGGAACA
B.hiriartiae Gro -CAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCGTGCCCTCGGAACA
B.hiriartiae JB -CAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCGTGCCCTCGGAACA
B.compacta 1 -CAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCGTGCCCTCGGAACA
B.compacta 2 -CAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCGTGCCCTCGGAACA
B.compacta 3 -CAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCGTGCCCTCGGAACA
C.glassianus 1 -CAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCGTGCCCTCGGAACA
C.glassianus 2 -CAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCGTGCCCTCGGAACA
C.glassianus 3 -CAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCGTGCCCTCGGAACA
C.glassianus 4 -CAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCGTGCCCTCGGAACA
C.glassianus 5 -CAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCGTGCCCTCGGAACA
C.hookerii Gto -CAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCGTGCCCTCGGAACA
B.guatemalensis 1 GCAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCTTGCCCTCGGAACA
B.guatemalensis 2 GCAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCTTGCCCTCGGAACA
B.guatemalensis 3 GCAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCTTGCCCTCGGAACA
B.goldmanii JB GCAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCTTGCCCTCGGAACA
B.goldmanii Chil GCAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCTTGCCCTCGGAACA
B.goldmanii Chi2 GCAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCTTGCCCTCGGAACA
B.pliabilis QRoo GCAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCTTGCCCTCGGAACA
B.pliabilis JB GCAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCTTGCCCTCGGAACA
B.stricta Oax -CAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCGTGCCCTCGGAACA
B.stricta Pue -CAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCGTGCCCTCGGAACA
B.stricta JB -CAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCGTGCCCTCGGAACA
B.gracilis Oax -CAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCGTGCCCTCGGAACA
B.gracilis Pue -CAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCGTGCCCTCGGAACA
B.gracilis JB -CAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCGTGCCCTCGGAACA
B.purpusii Oax -CAAGGAACCCATGCCGTCGGGCAAGCGTGCCCTCGGAACA
N.nelsonii GB GCAAGGAACCCACGCCGTCGGGCGGTGCGCCCCCTCGGAACA
N.lindheimerianaGB GCAAGGAACCCATGCTGTCGGGCGCACGCGCCCCCTCGGAACA
D.berlandieri GB GCAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCGTGCCCTCGGAACA
D.longissimum GB GCAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCGTGCCCTCGGAACA
D.wheeleri GB GCAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCGTGCCCTCGGAACA
D.texanum GB GCAAGGAACCCATGCCGTCGGGCGAGCGTGCCCTCGGAACA

ANEXO 4

**LÁMINAS CON LAS IMAGENES DE M.E.B. DE LAS
HOJAS DE LAS ESPECIES DE *Beaucarnea* Y
Calibanus EN ESTADO SILVESTRE.**

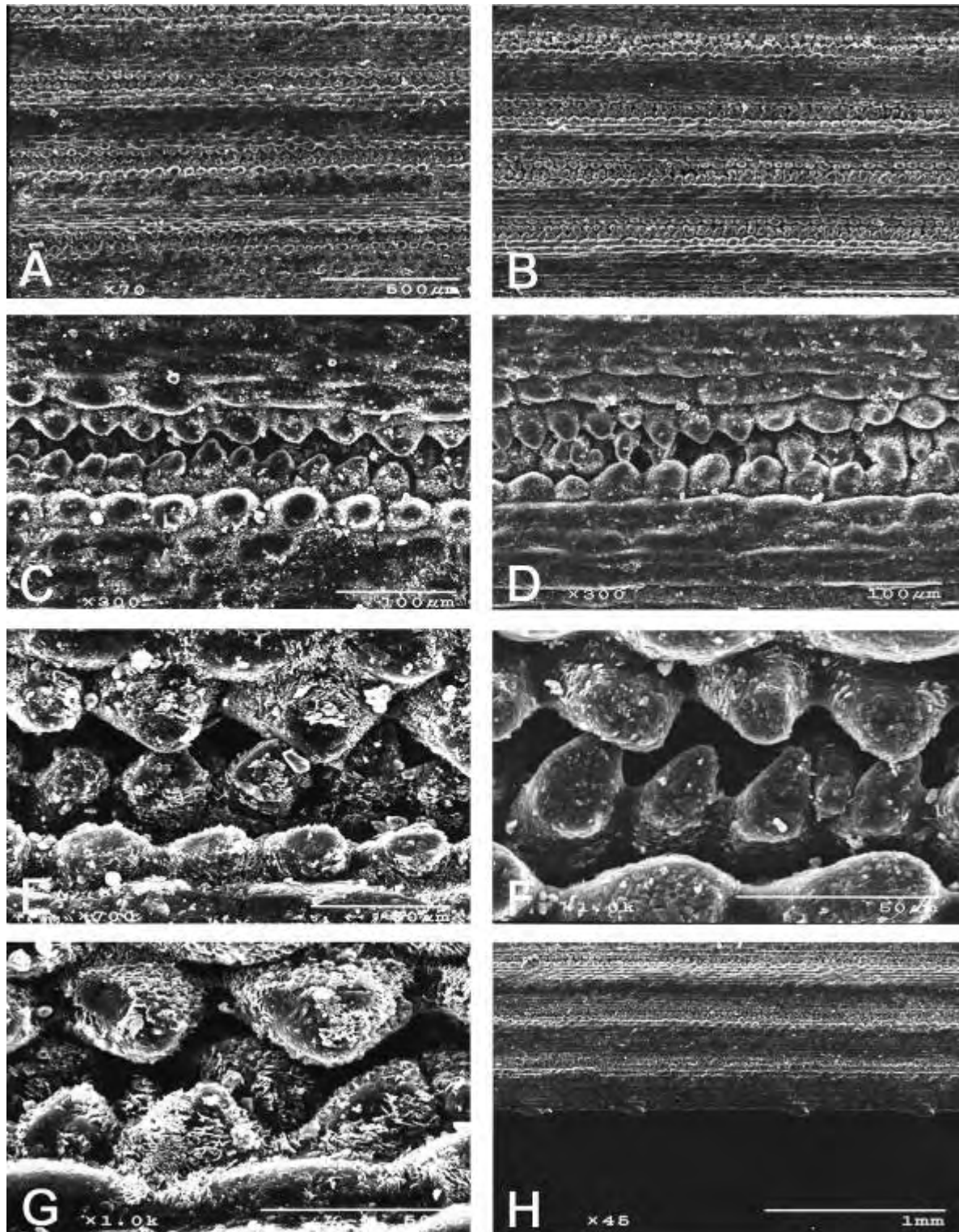


Lámina 1. Superficie foliar de *Beaucarnea gracilis*, Puebla. Rojas 11. A, C, E y G. Envés de la hoja. B, D y F. Haz de la hoja. H. Márgen de la hoja.

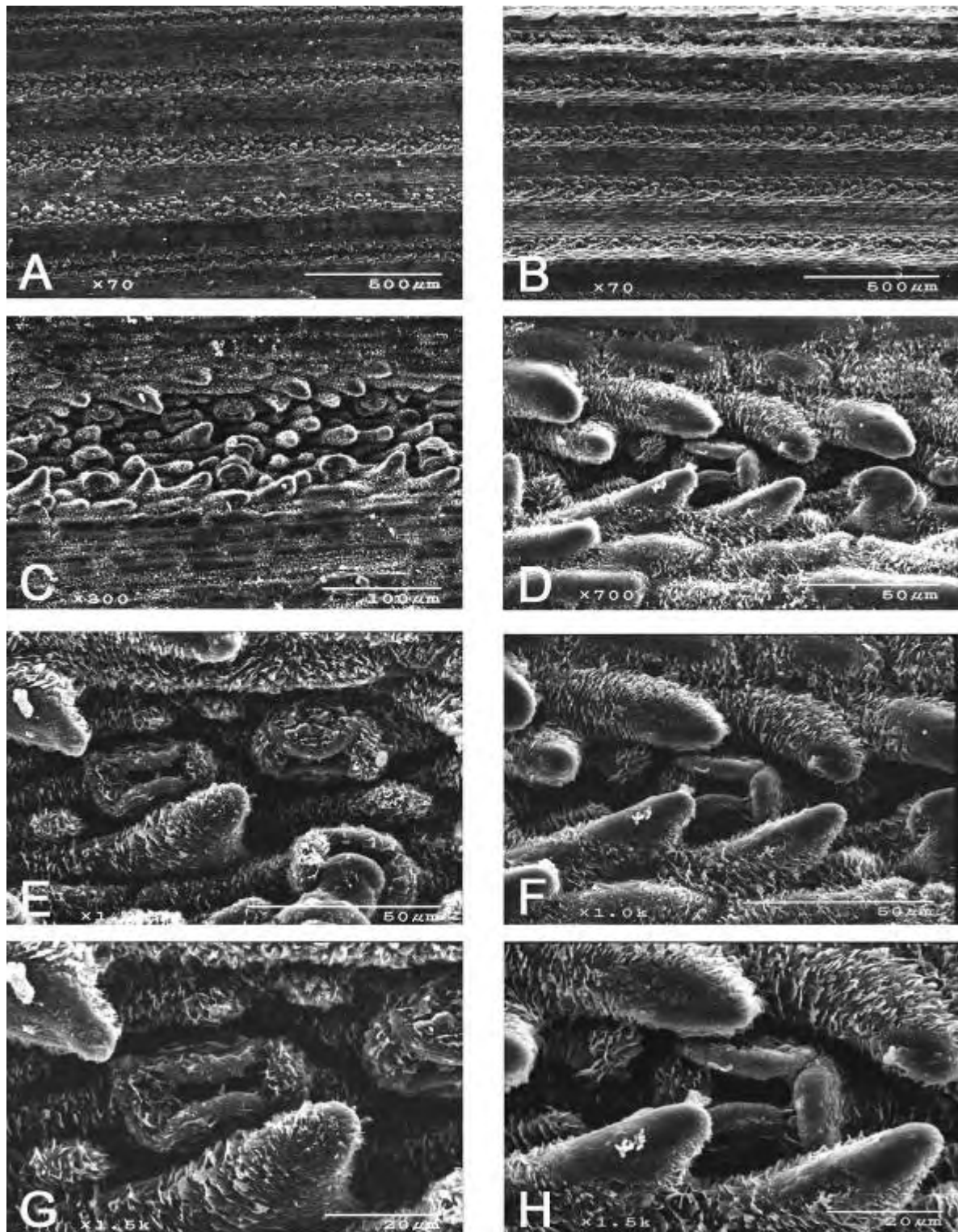


Lámina 2. Superficie foliar de *Beaucarnea hirtariae*, Guerrero. Imágenes de M.E.B. Medina-Lemos E-424. A, C, E y G. Envés de la hoja. B, D, F y H. Haz de la hoja.

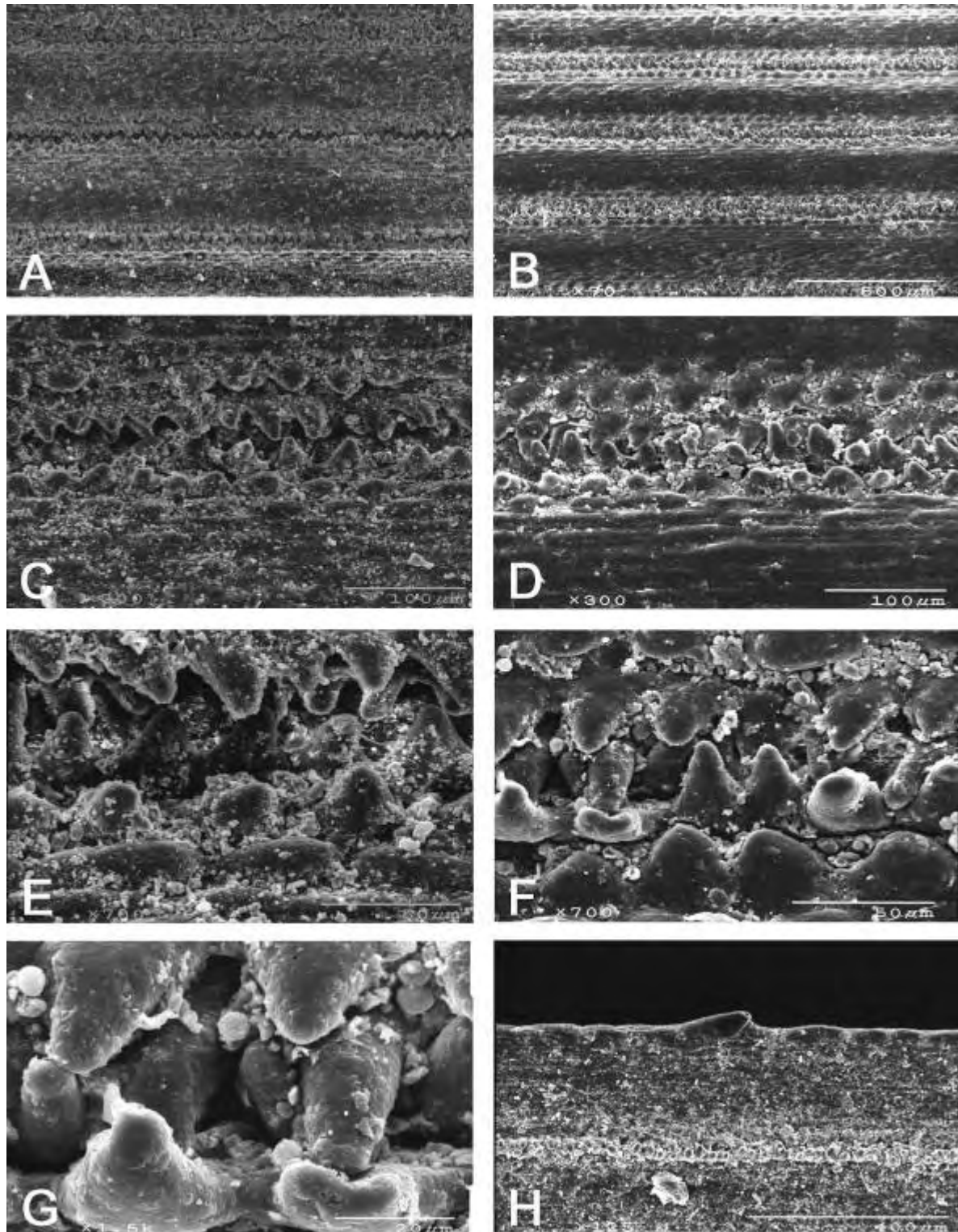


Lámina 3. Superficie foliar de *Beaucarnea purpusii*, Puebla. Imágenes de M.E.B. Rojas 16. A, C, E y G. Envés de la hoja. B, D y F. Haz de la hoja. H. Márgen de la hoja.

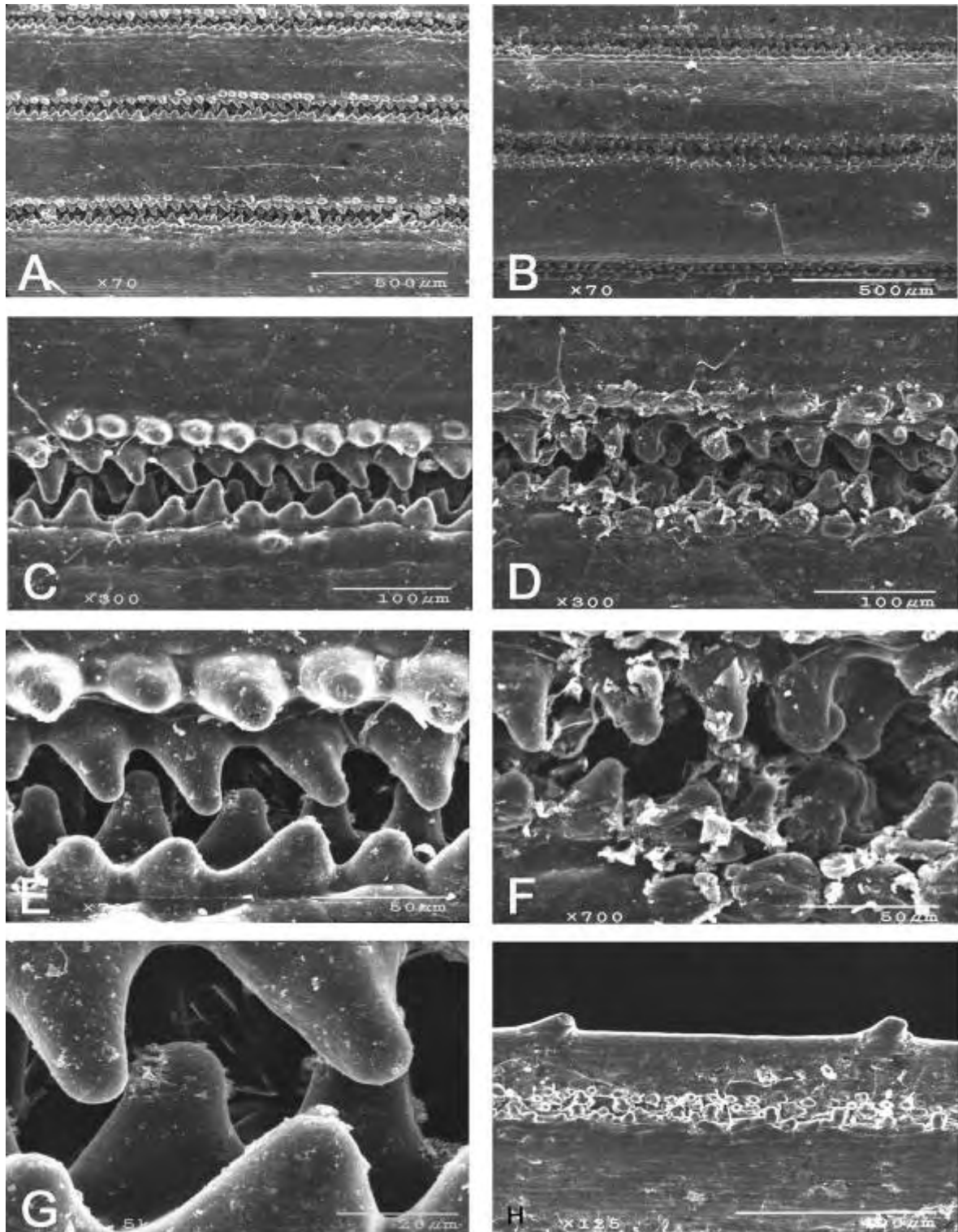


Lámina 4. Superficie foliar de *Beaucarnea stricta*, Oaxaca. Imágenes de M.E.B. Rojas 22
 A, C, E y G. Envés de la hoja. B, D y F. Haz de la hoja. H. Margen de la hoja.

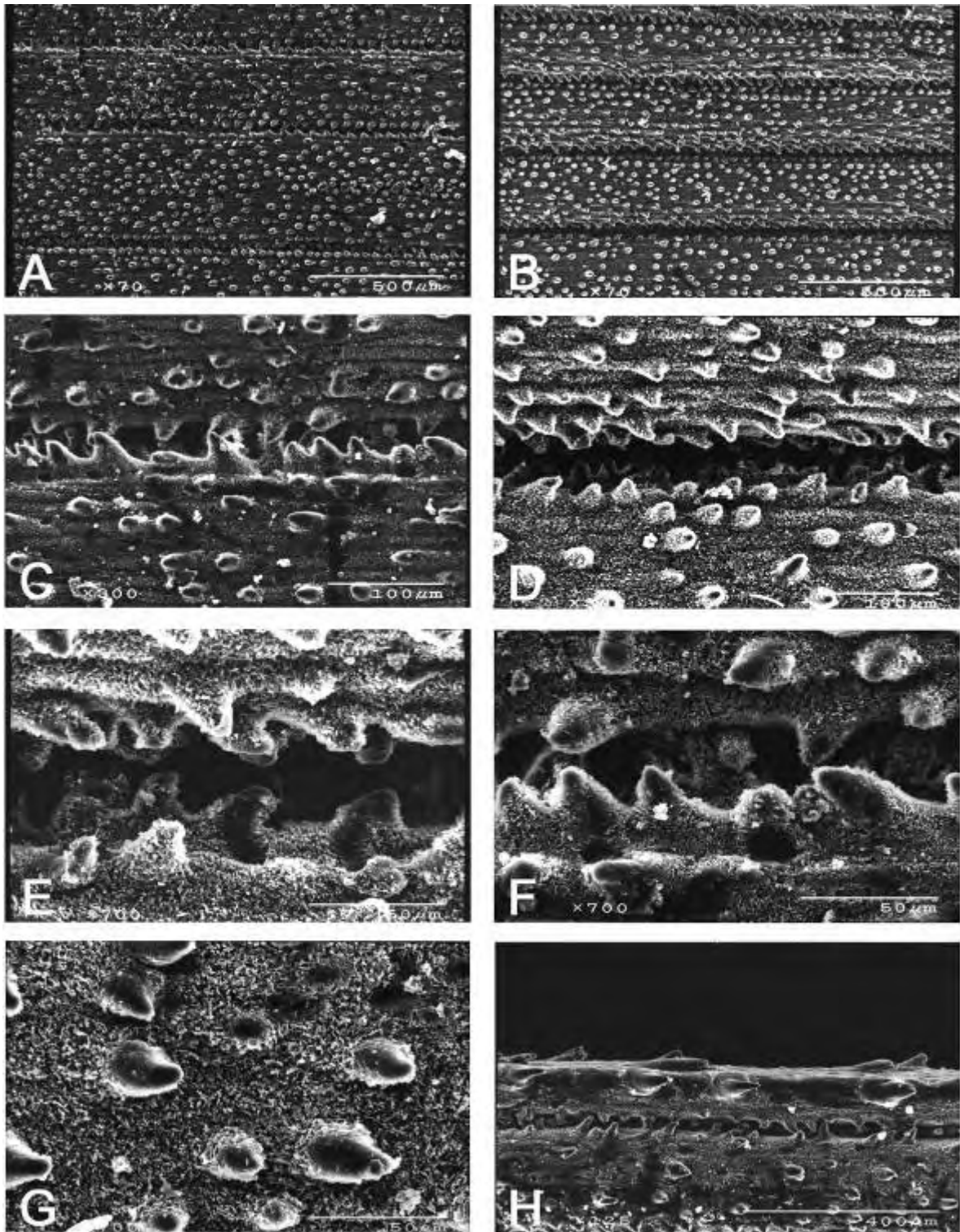


Lámina 5. Superficie foliar de *Beaucarnea compacta*, Guanajuato. Fotografías de M.E.B Rojas 33. A,C,E y G. Envés de la hoja. B, D y F. Haz de la hoja. H. Márgen de la hoja.

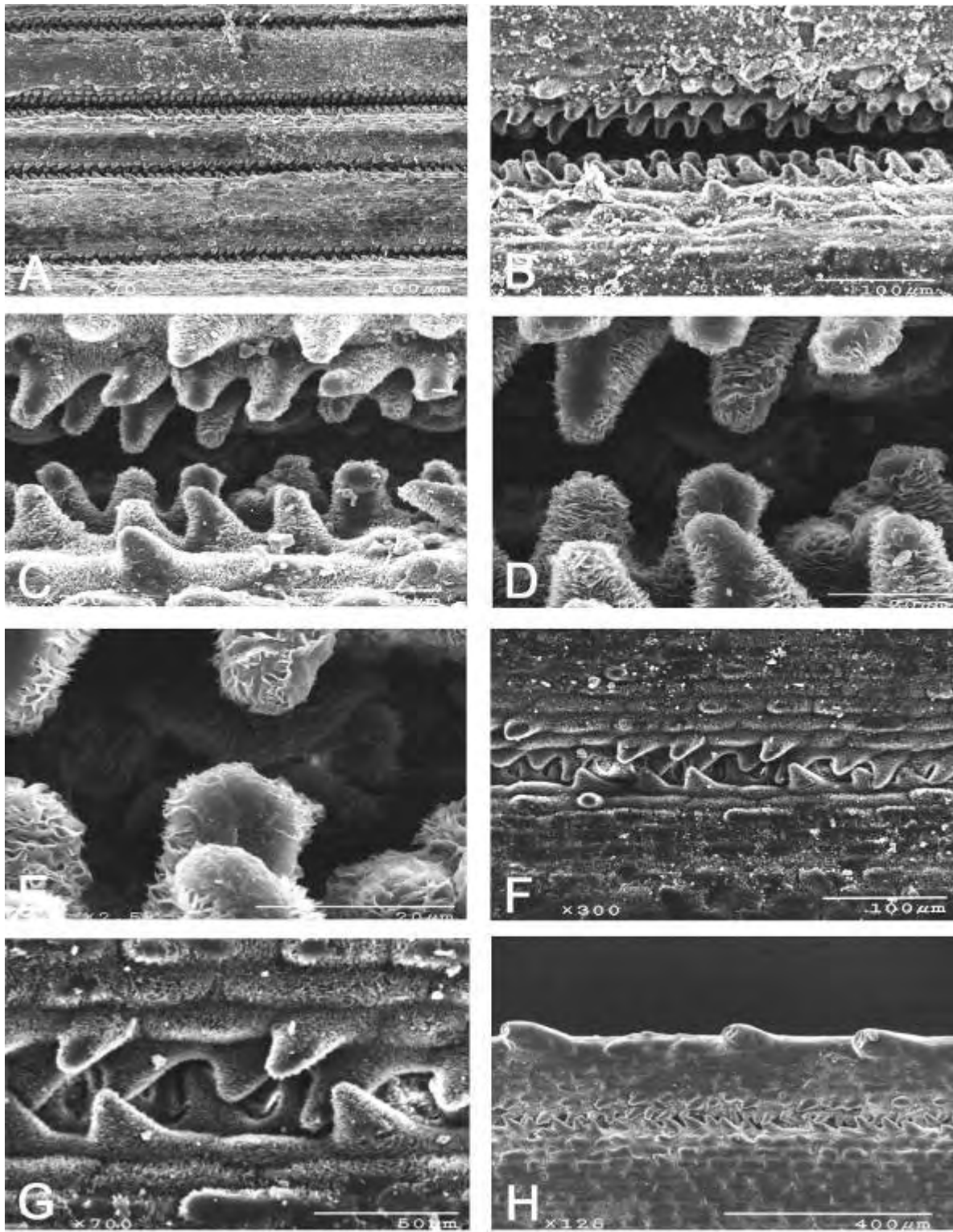


Lámina 6. Superficie foliar de *Calibanus glassianus*, Guanajuato. Imágenes de M.E.B. Rojas 36. A, C, E y G. Envés de la hoja. B, D y F. Haz de la hoja. H. Márgen de la hoja.

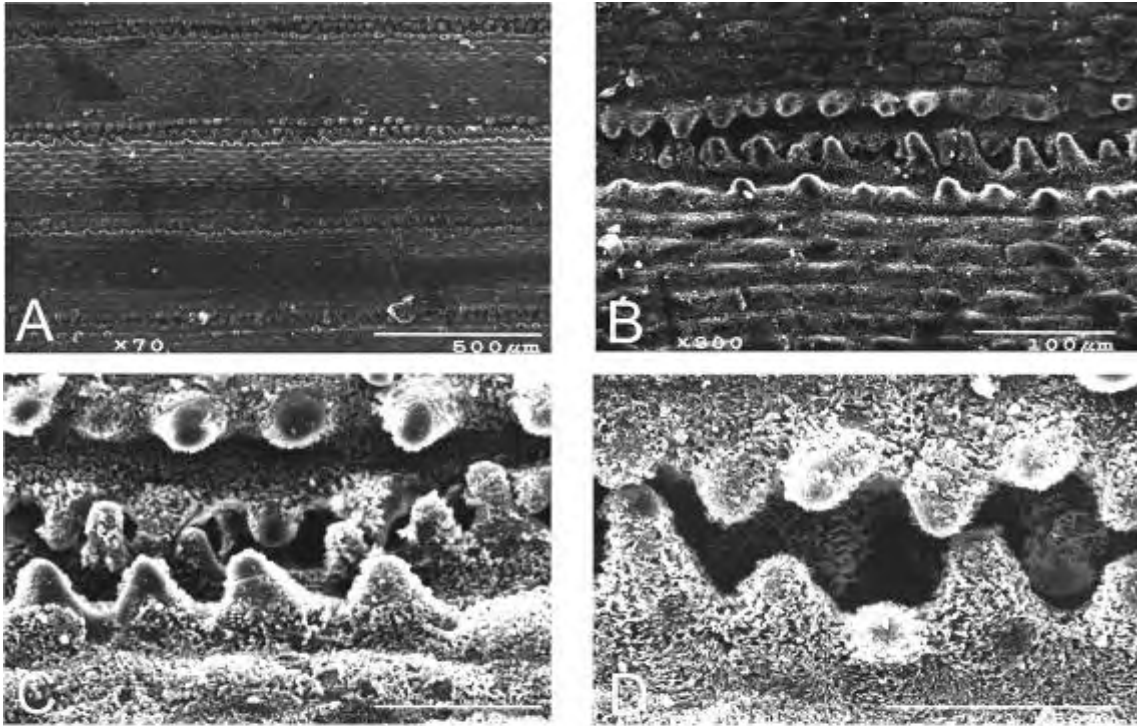


Lámina 7. Superficie foliar de *Caliabanus hookerii* de Guanajuato. Imágenes de M.E.B.

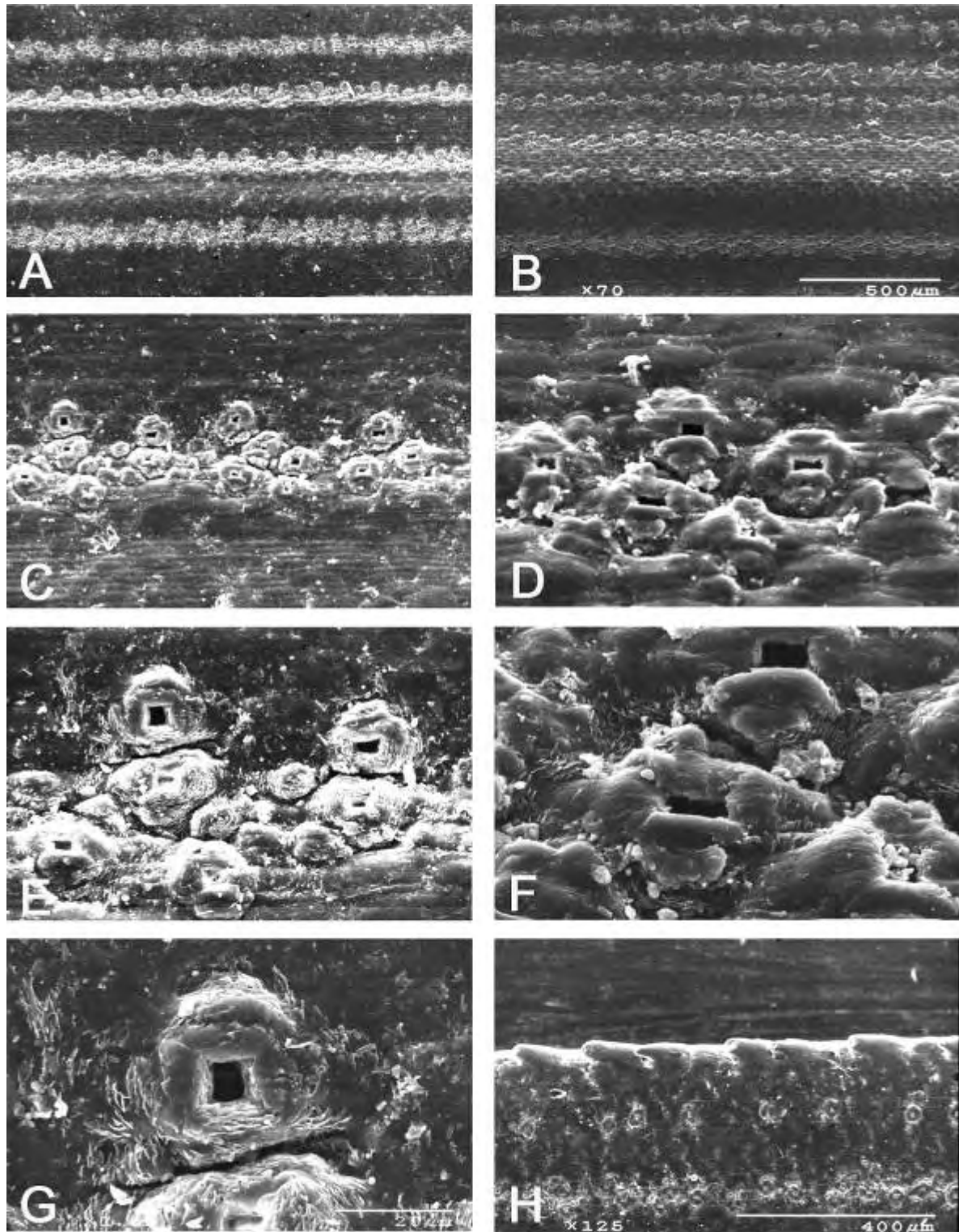


Lámina 8. Imágenes de M.E.B. de *Beaucarnea recurvata* de Tamaulipas. A, C, E y G, Haz de la hoja. B, D, F y H. Envés de la hoja.

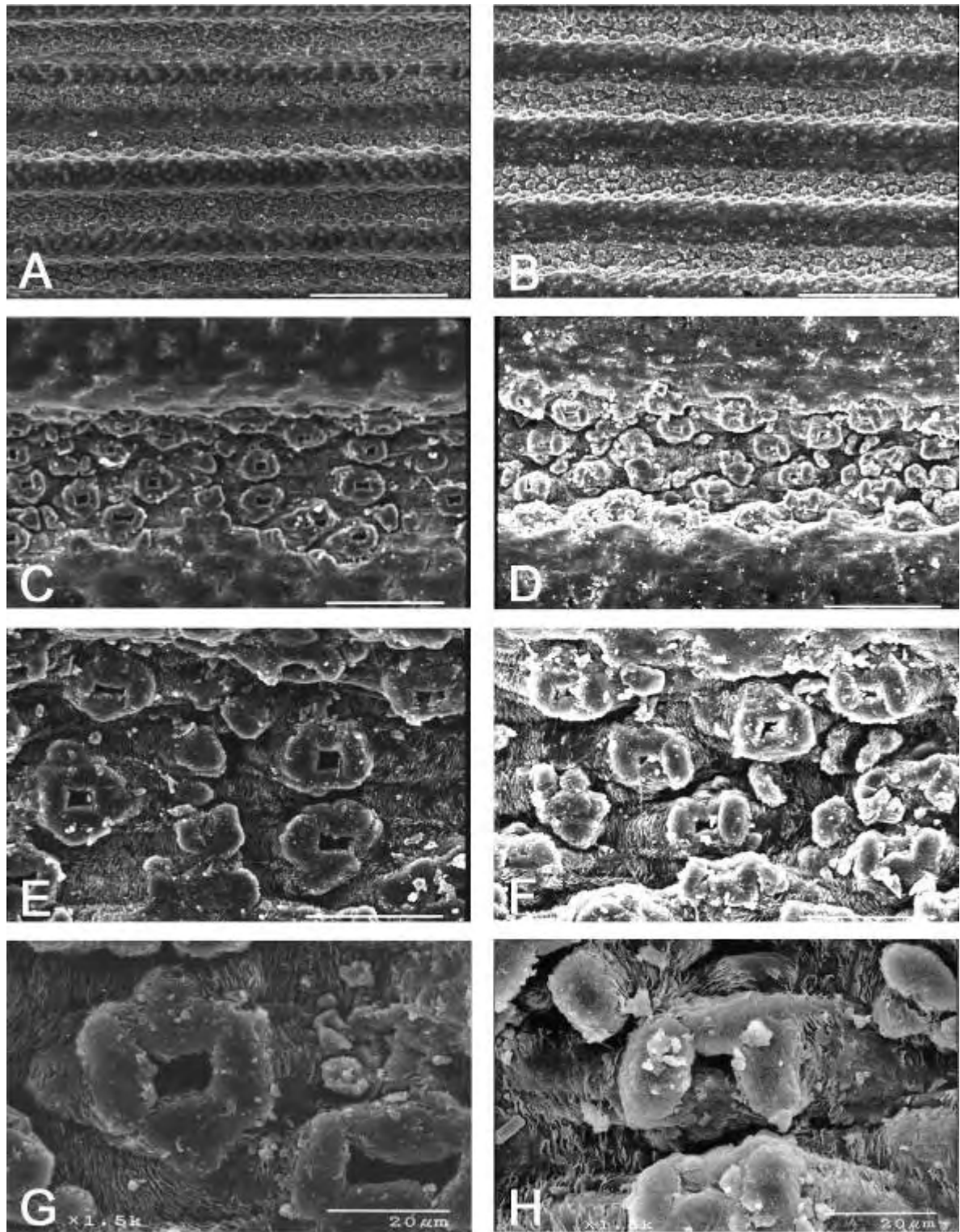


Lámina 9. Imágenes de M.E.B. de *Beaucarnea congesta* de Oaxaca. A, C, E y G, Envés de la hoja. B, D, F y H. Haz de la hoja

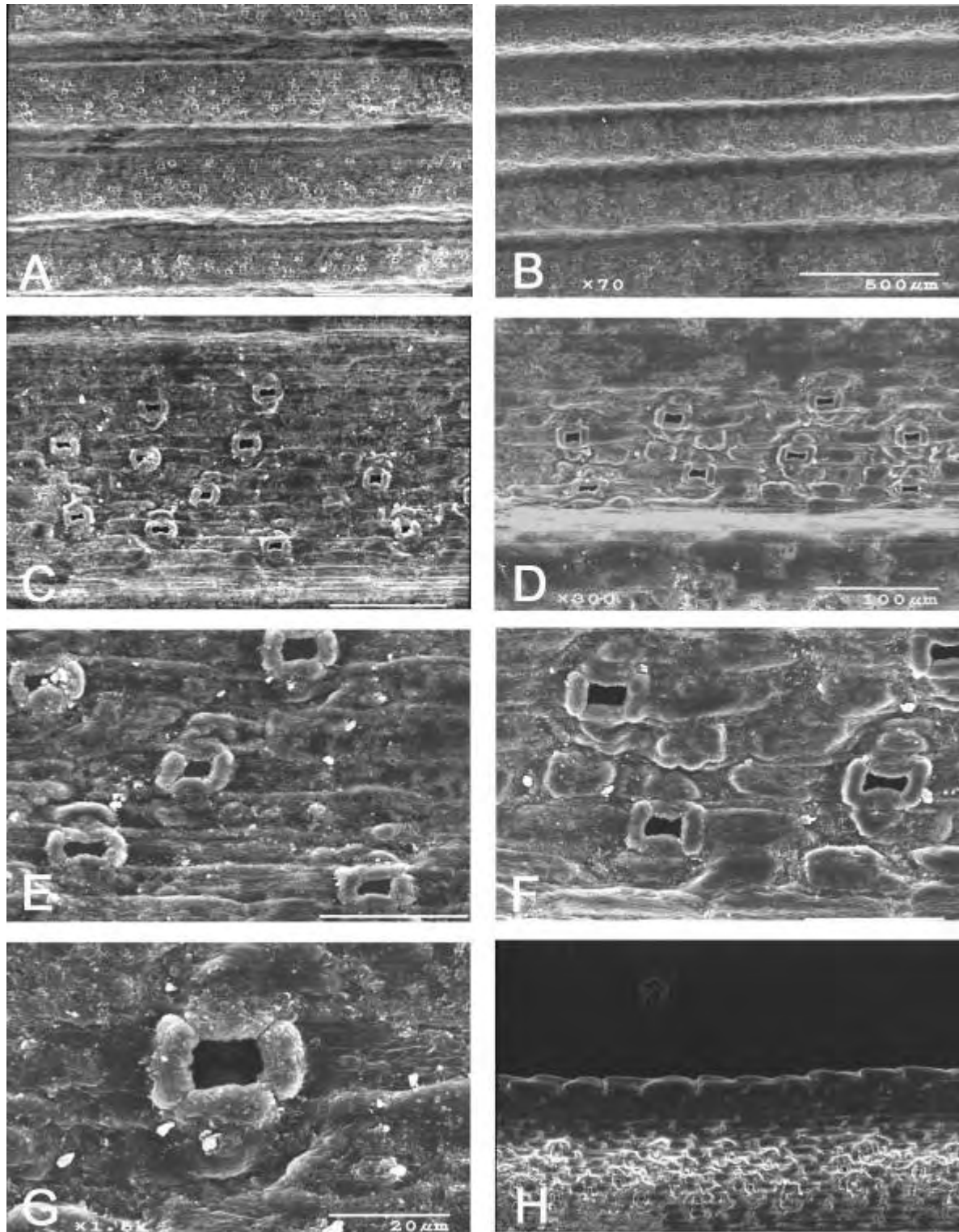


Lámina 10. Imágenes de M.E.B. de *Beaucarnea goldmanii* de Chiapas. A, C, E y G, Envés de la hoja. B, D, F y H. Haz de la hoja.

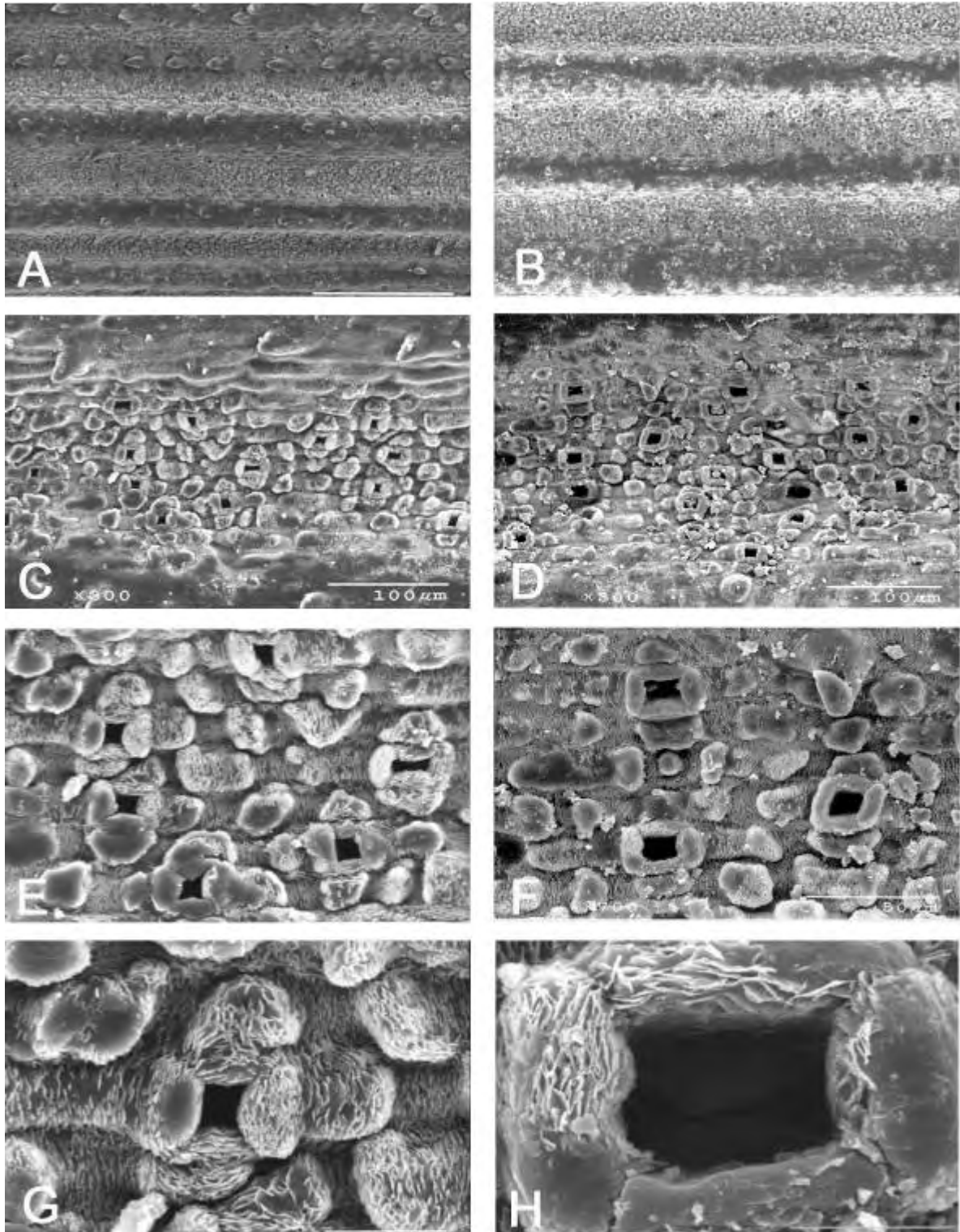


Lámina 11. Imágenes de M.E.B. de *Beaucarnea guatemalensis* de Guatemala. A, C, E y G, Haz de la hoja. B, D, F y H. Envés de la hoja.

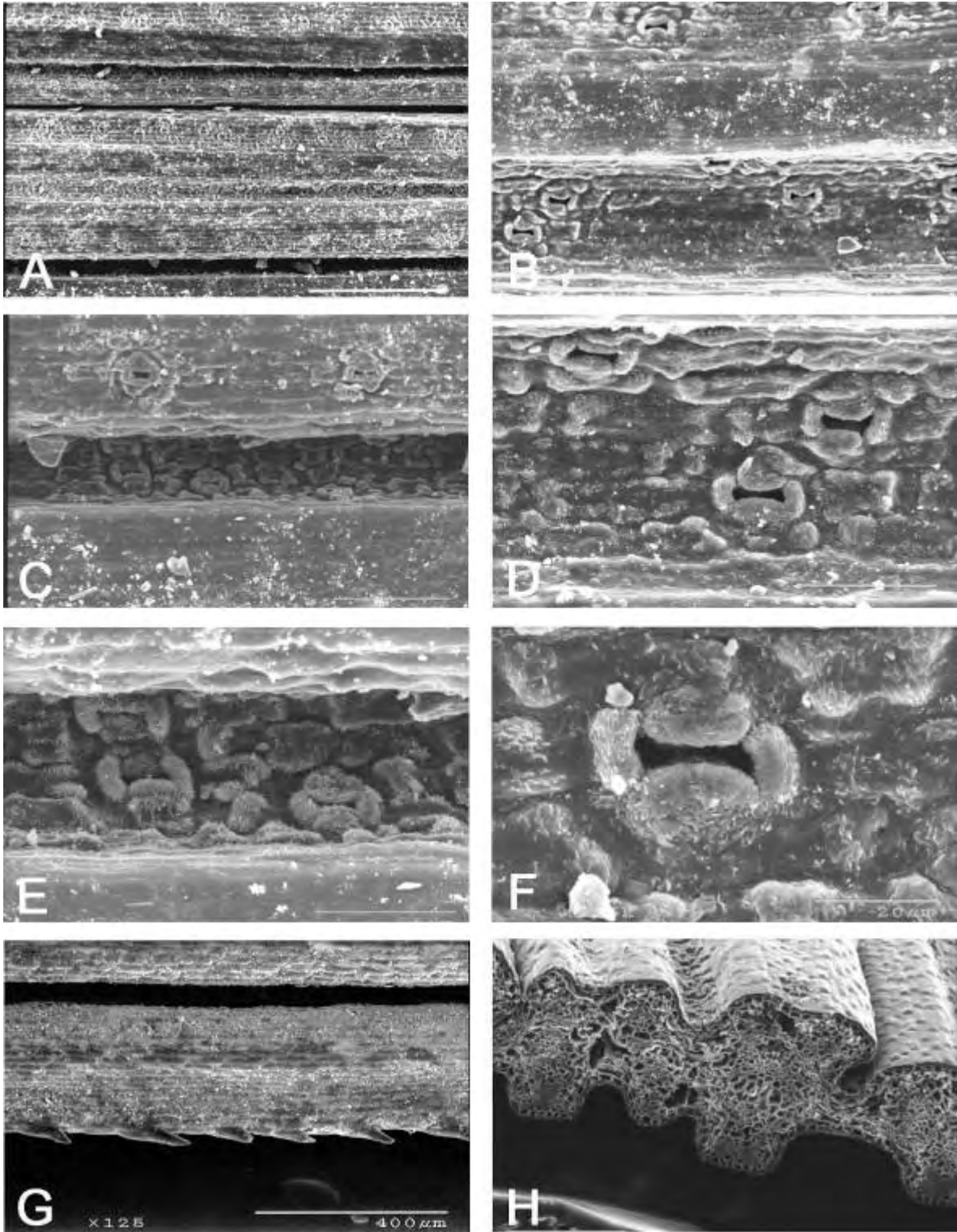


Lámina 12. Imágenes de M.E.B. de *Beaucarnea pliabilis* de Quintana Roo. A, C y E, Haz de la hoja. G. Margen de la hoja. B, D, F y H. Envés de la hoja.

ANEXO 4. *Continuación*

**LÁMINAS CON LAS IMAGENES DE M.E.B. DE LAS
HOJAS DE LAS ESPECIES DE *Beaucarnea* Y
Calibanus CULTIVADAS EN EL JARDÍN
BOTÁNICO, IBUNAM.**

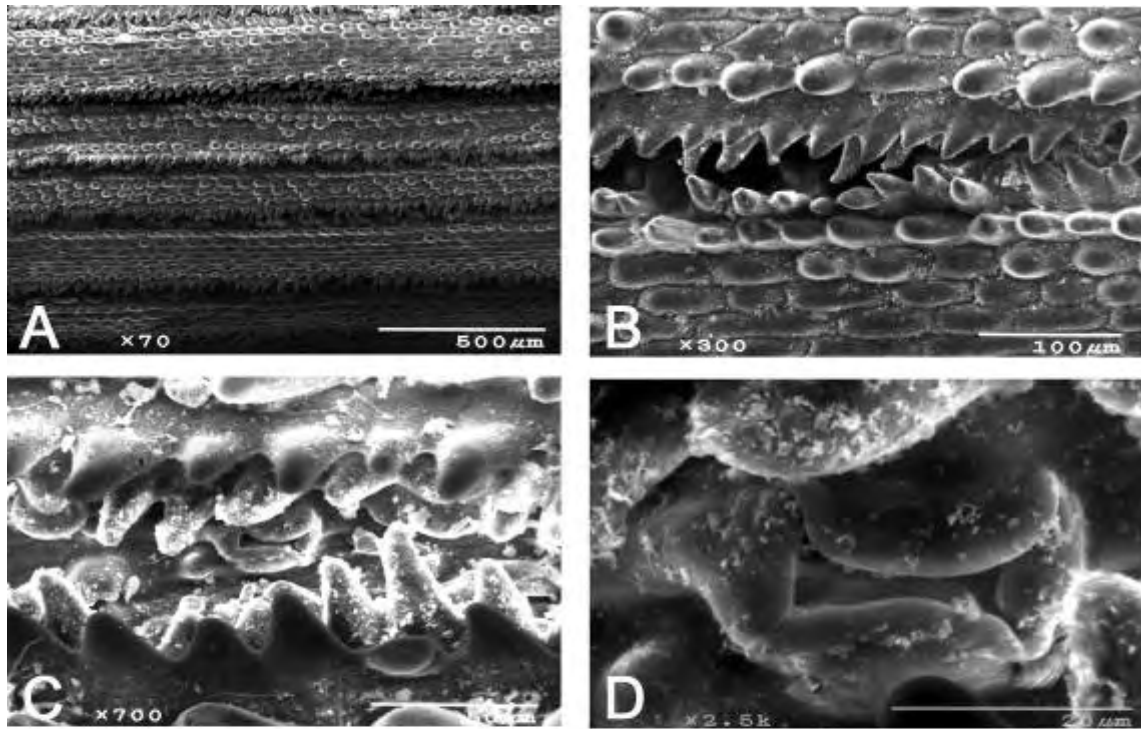


Lámina 13. Imágenes de M.E.B. de la superficie foliar de *Beaucarnea gracilis* del Jardín Botánico (IBUNAM).

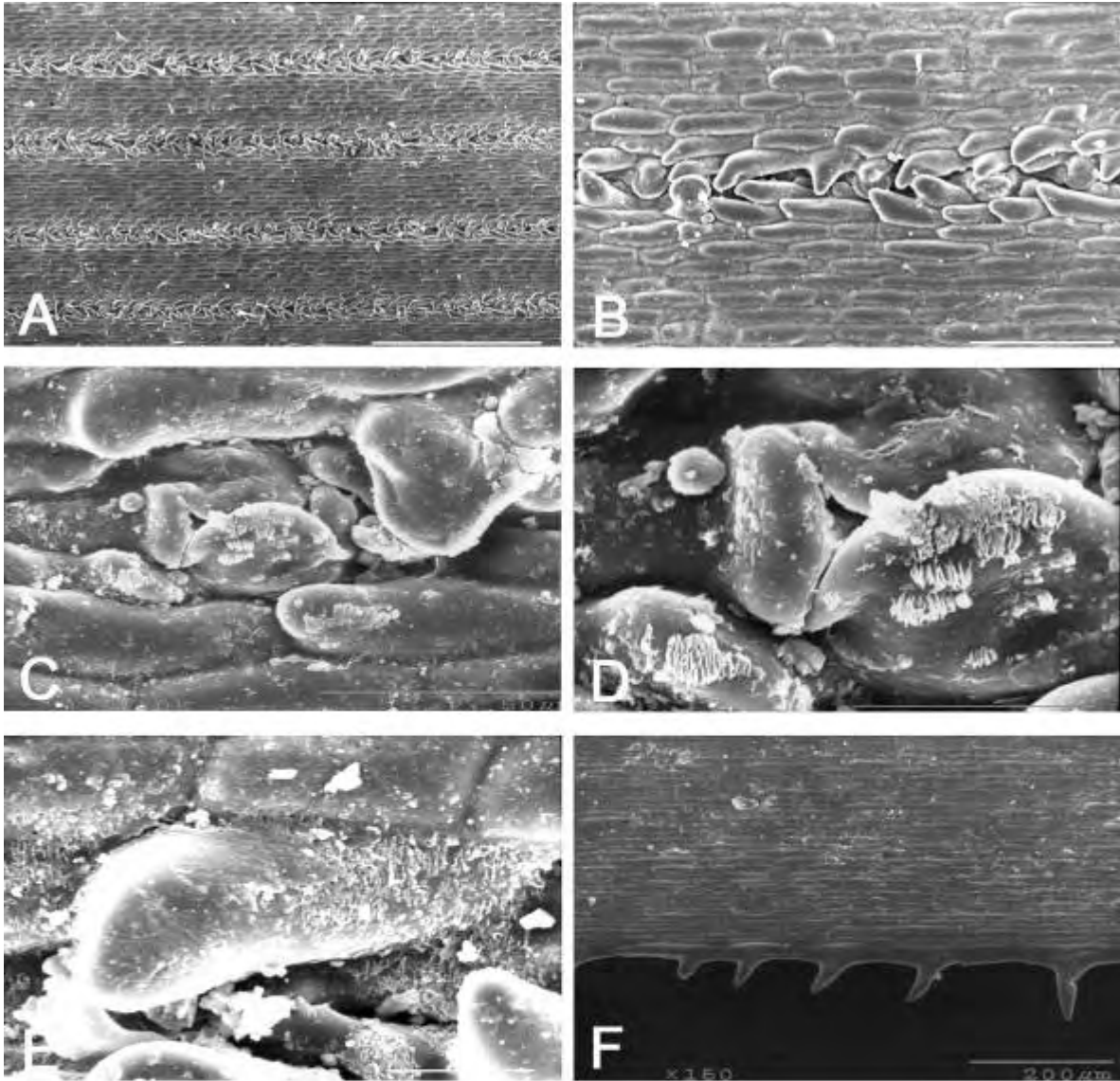


Lámina 14. Superficie foliar de *Beaucarnea hiriartiae* del Jardín Botánico (IBUNAM).
Imágenes de M.E.B.

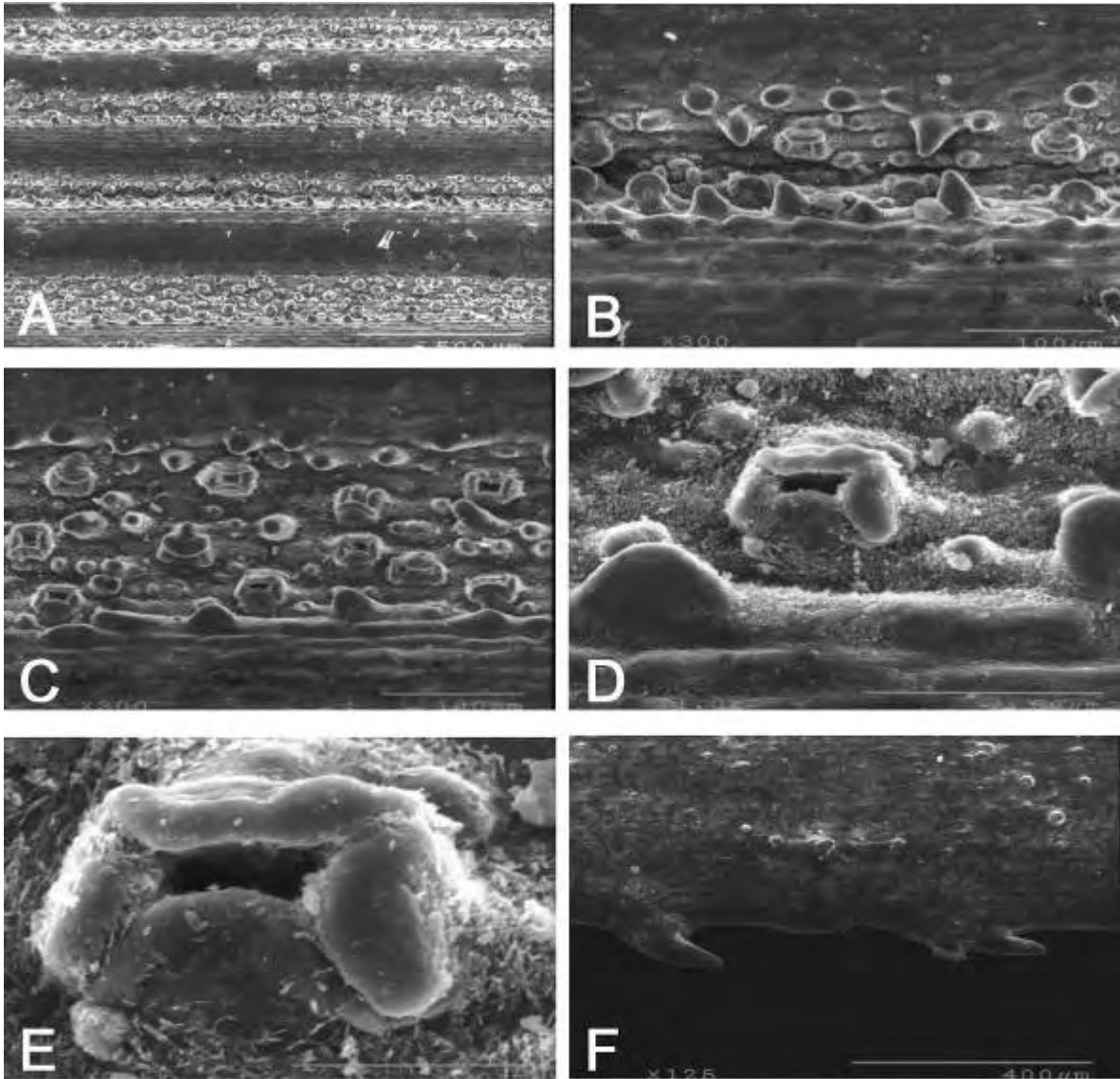


Lámina 15. Superficie foliar de *Beaucarnea stricta* del Jardín Botánico (IBUNAM).
Imágenes de M.E.B.

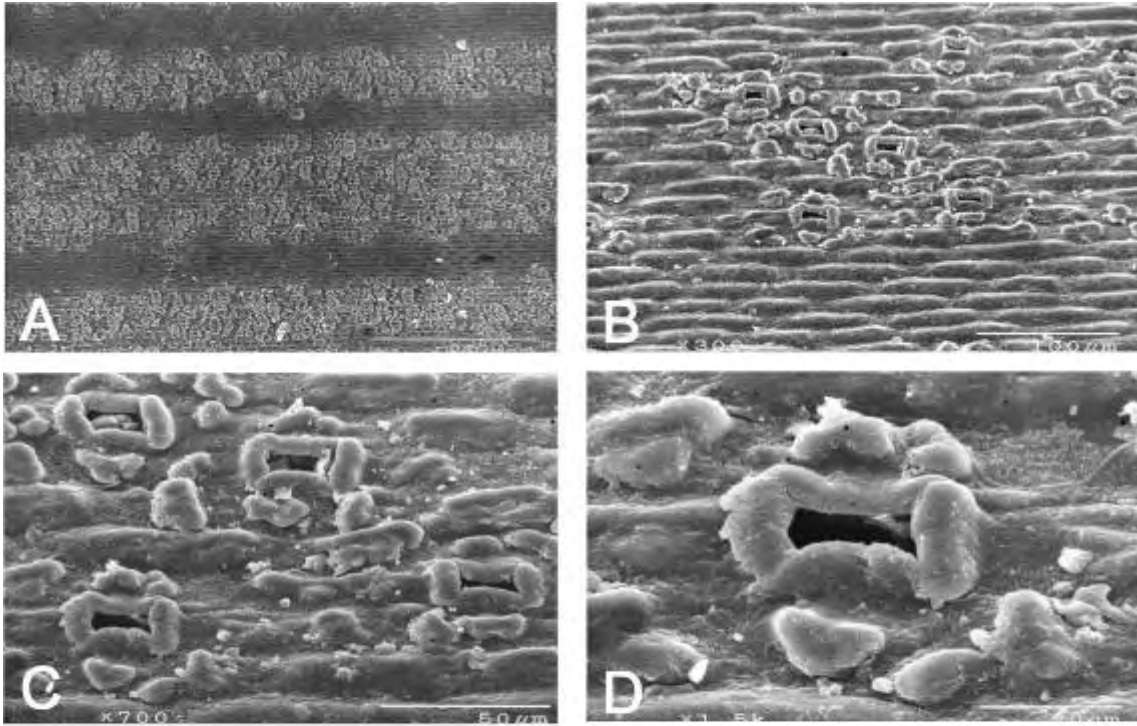


Lámina 16. Imágenes de M.E.B. de la superficie foliar de *Beaucarnea goldmanii* del Jardín Botánico (IBUNAM).

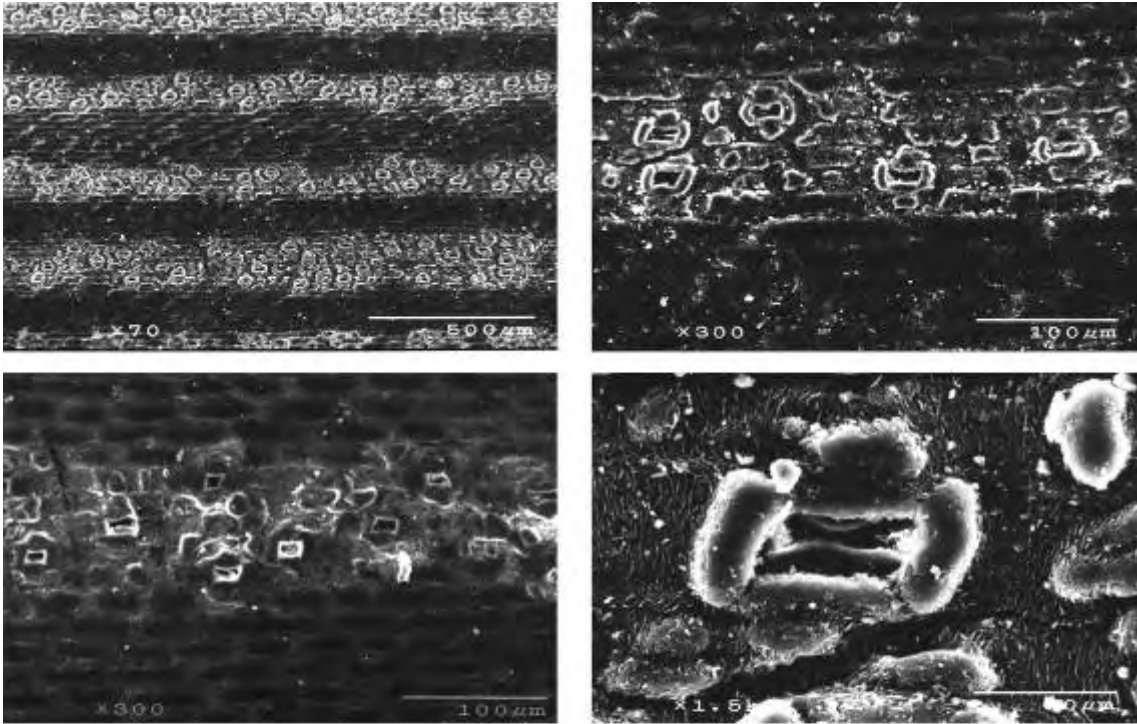


Lámina 17. Imágenes de M.E.B. de la superficie foliar de *Beaucarnea pliabilis* del Jardín Botánico (IBUNAM).

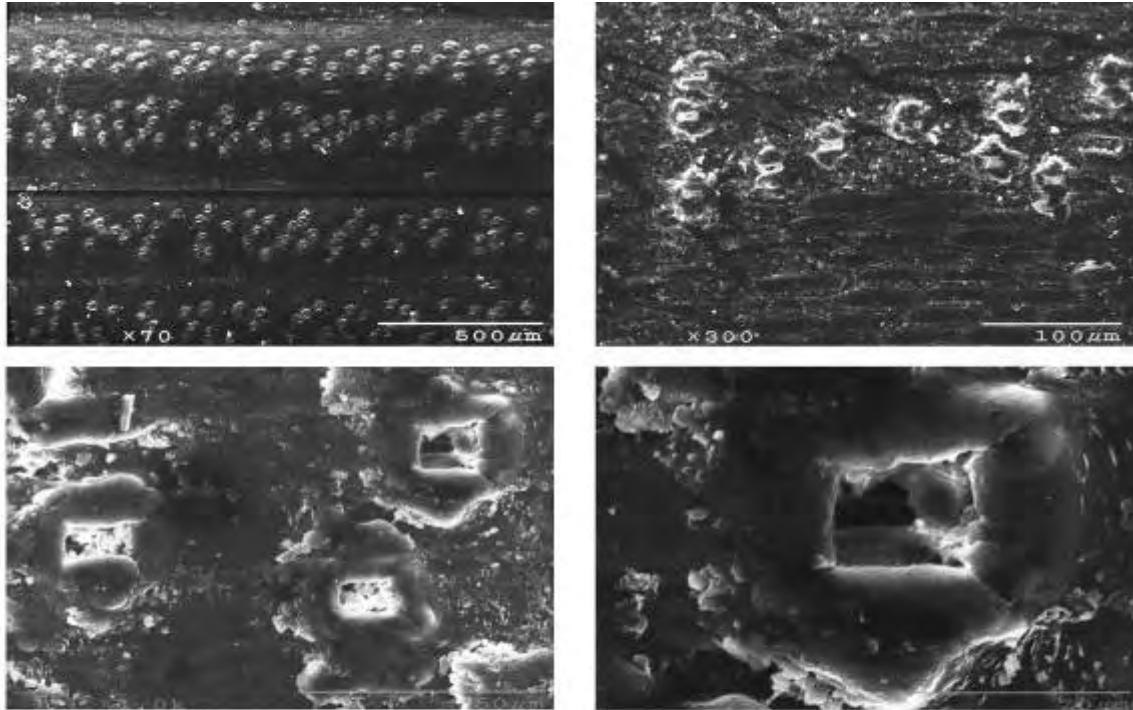


Lámina 18. Imágenes de M.E.B. de la superficie foliar de *Beaucarnea recurvata* del Jardín Botánico (IBUNAM).

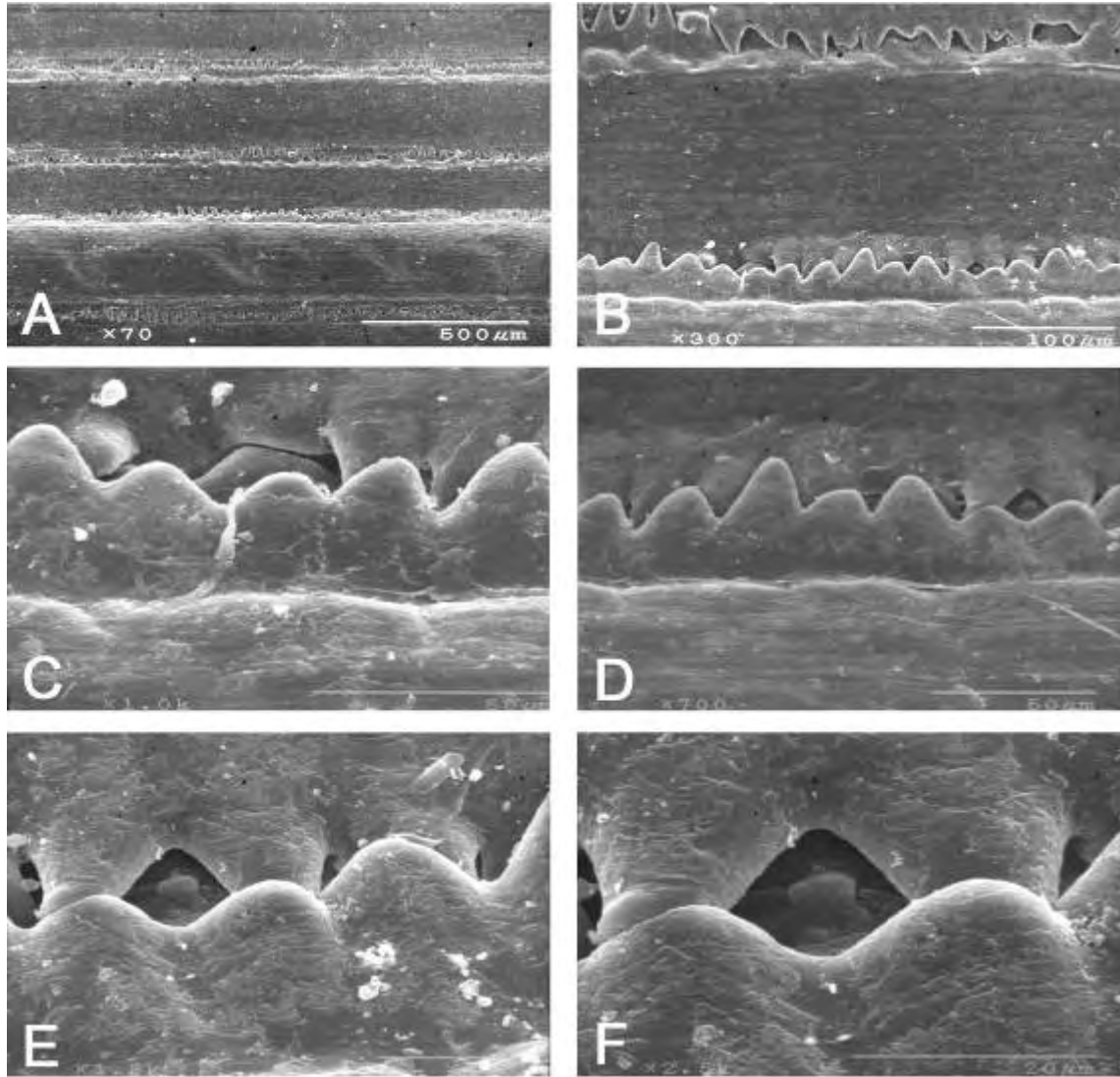


Lámina 19. Superficie foliar de *Calibanus hookeri* del Jardín Botánico (IBUNAM).
Imágenes de M.E.B.

ANEXO 4. *Continuación*

**LÁMINAS CON LAS IMAGENES DE M.E.B. DEL
MARGEN DE LAS HOJAS DE LAS ESPECIES DE
Beaucarnea Y *Calibanus* EXAMINADAS.**

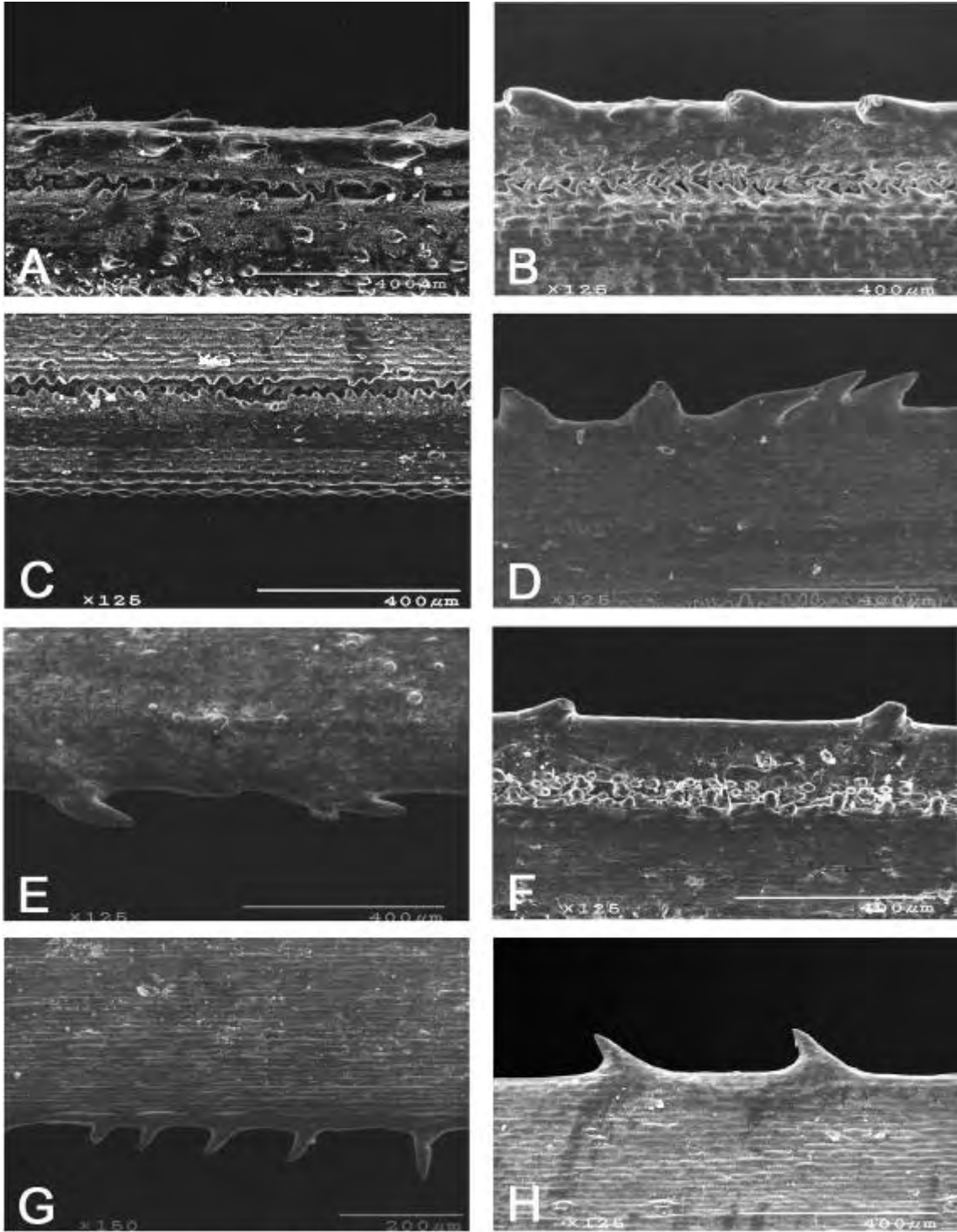


Lámina 20. Imágenes de M.E.B. Márgenes de las hojas de A. *Beaucarnea compacta* (Gto.), B. *Calibanus glassianus* (Gto.), C. *C. hookerii* (Gto.), D. *C. hookerii* (JB), E. *B. stricta* (JB), F. *B. stricta* (Pue.), G. *B. hiriartiae* (JB) y H. *B. recurvata* (JB).

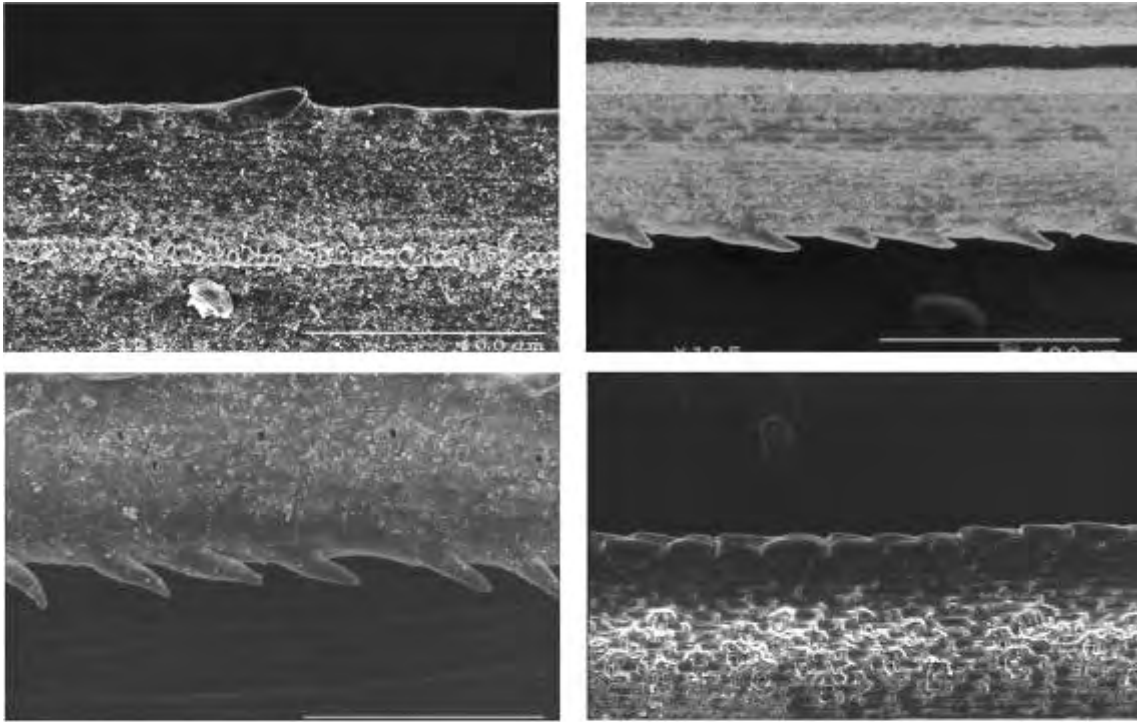


Lámina 21. Imágenes de M.E.B. Márgenes de las hojas de A. *Beaucarnea purpusii* (Pue.), B. *B. pliabilis* (QRoo.), C. *B. guatemalensis* (Guat.) y D. *B. goldmanii* (Chiap.).

ANEXO 4. *Continuación*

**LÁMINAS CON IMAGENES DE FELEMA DE LAS
ESPECIES DE *Beaucarnea* Y *Calibanus*
EXAMINADAS.**

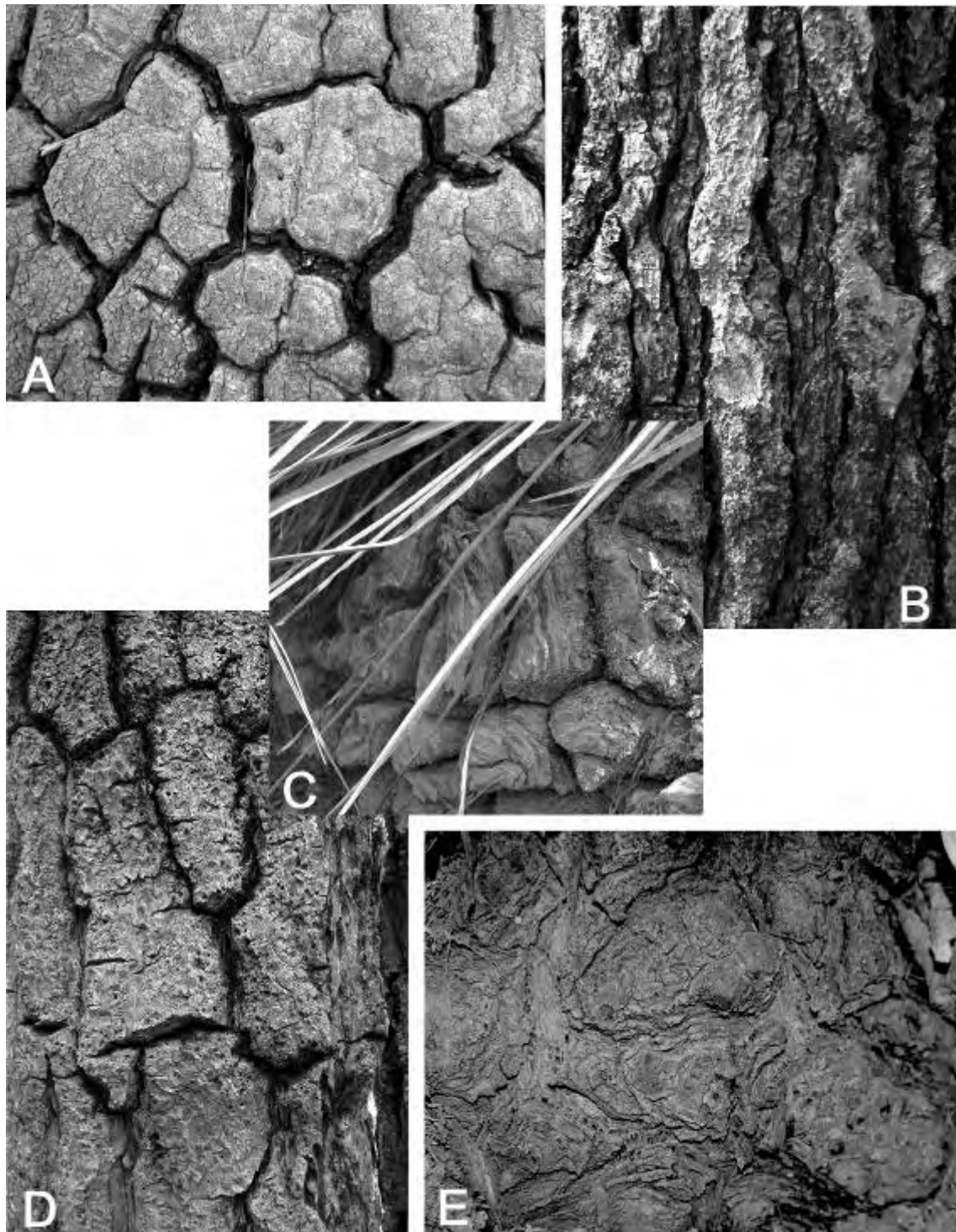


Lámina 22. Imágenes de felema de A. *Beaucarnea stricta*, B. *Beaucarnea gracilis*, C. *Calibanus glassianus*, D. *Beaucarnea purpusii* y E. *Beaucarnea compacta*.

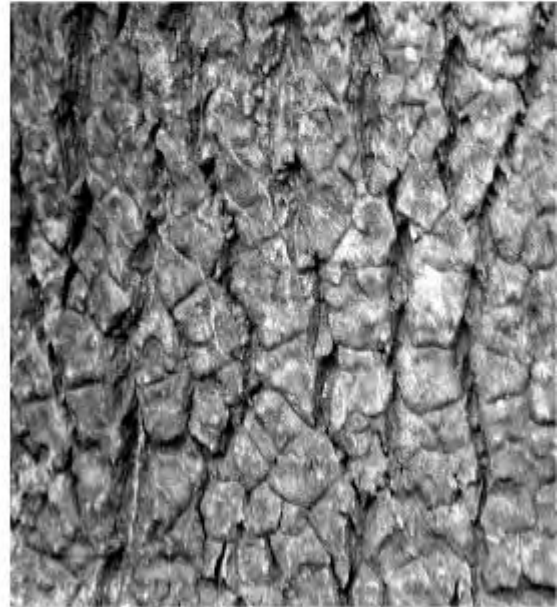


Lámina 23. Imágenes del felema de A. *Beaucarnea hiriartiae*, B. *Beaucarnea pliabilis*, C. *Beaucarnea recurvata* y D. *Beaucarnea goldmanii*.