



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOLOGÍA
SISTEMÁTICA

Tamaño corporal, escalamiento anatómico y diversificación morfológica en las especies mexicanas de *Manihot* (Euphorbiaceae)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

MARÍA ANGÉLICA CERVANTES ALCAYDE

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. MARK EARL OLSON ZUNICA

INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. CÉSAR AUGUSTO DOMÍNGUEZ PÉREZ TEJADA

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 2016



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.



Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité por Campo de Conocimiento de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 24 de Agosto de 2015, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna CERVANTES ALCAYDE MARIA ANGELICA con número de cuenta 91228291 con la tesis titulada: "Tamaño corporal, escalamiento anatómico y diversificación morfológica en las especies mexicanas de Manihot (Euphorbiaceae)", realizada bajo la dirección del DR. MARK EARL OLSON:

Presidente:	DR. JUAN SERVANDO NUÑEZ FARFAN
Vocal:	DR. GERARDO ADOLFO SALAZAR CHAVEZ
Secretario:	DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS
Suplente:	DR. ALEJANDRO GONZALEZ VOYER
Suplente	DR. VICTOR WERNER STEINMANN

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx, a 13 de septiembre de 2016.

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, dentro del cual realicé los estudios de doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca de doctorado No. 171050 y por su apoyo a los proyectos de investigación No. 46475 y No. 132404.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (UNAM) por su apoyo al proyecto No. IN228707.

A los miembros de mi Comité Tutorial, el Dr. César Augusto Domínguez Pérez Tejada, el Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns y el Dr. Mark Earl Olson Zunica, quienes supervisaron el desarrollo de esta tesis e hicieron comentarios indispensables para el mejoramiento de los trabajos incluidos en la misma.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A los miembros del jurado, Dr. Juan Servando Núñez Farfán, Dr. Gerardo Adolfo Salazar Chávez, Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns, Dr. Alejandro González Voyer y Dr. Victor Werner Steinmann, por sus comentarios a esta tesis, que resultaron fundamentales para su mejoramiento.

A la Dra. María de los Ángeles Herrera Campos y al Dr. Martín García Varela, responsables del Posgrado en Ciencias Biológicas en el Instituto de Biología de la UNAM, por la gran orientación y el apoyo brindados para cumplir con los requisitos solicitados por el posgrado.

A Rocío González Acosta, por su indispensable orientación y gran paciencia para explicar a los estudiantes cómo llevar a término los trámites.

A los miembros del comité evaluador de la Candidatura al Grado de Doctor, Dr. Juan Enrique Fornoni Agnelli, Dr. Horacio Armando Paz Hernández, Dr. Pedro Guillermo Ángeles Álvarez, Dr. Víctor Luis Barradas Miranda y Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns, por su invaluable orientación para llevar a cabo el proyecto de doctorado.

A la M. en C. Laura Margarita Márquez Valdelamar, por su indispensable ayuda para obtener las secuencias de varios marcadores empleados en este trabajo.

A la Dra. Lidia Irene Cabrera Martínez, por toda la asistencia brindada para la utilización de los laboratorios de Biología Molecular.

Al Dr. Calixto León Gómez, por su invaluable apoyo para obtener las preparaciones anatómicas utilizadas en esta investigación.

A la M. en C. María Berenit Mendoza Garfias, cuya ayuda fue fundamental para llevar a cabo las mediciones anatómicas necesarias para concluir esta tesis.

A la M. en C. Claudia Gabriela Montes Cartas, por su inmensa ayuda para aprender a usar los programas de medición de variables anatómicas y SPSS.

Al Dr. Leonardo Osvaldo Alvarado Cárdenas, por su indispensable ayuda para realizar los análisis de distribución potencial incluidos en uno de los capítulos de la tesis.

A la Bió. Yareli Joselin Cadena Rodríguez, gracias a la cual pude realizar las extracciones de las variables bioclimáticas correspondientes a los puntos de colecta.

Al Bió. Matiss Castorena Salaks, por su indispensable ayuda para llevar a cabo las pruebas de señal filogenética y los contrastes independientes en R.

A Juan Frausto Rodríguez, por su gran ayuda para la realización de las figuras incluidas en uno de los capítulos de la tesis.

A Virginia Villalobos, quien me dio varios consejos esenciales para usar el microscopio y los programas asociados.

A mis amigos del labo y del instituto, Julieta Rosell, Leonardo Alvarado, Laura Trejo, Vanessa Rojas, Gabriela Montes, Matiss Castorena, Roberto "Osiño" Gómez, Diana Soriano, Alberto Echeverría y Jorge Calónico, por toda su ayuda y tantos agradables días pasados en muy buena compañía.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
1. Introducción	
1.1 Patrones evolutivos del tamaño corporal	5
1.2 Efectos del tamaño corporal comunes a todos los organismos	5
1.2.1 Efectos del tamaño corporal en los animales	7
1.2.2 Efectos del tamaño corporal en las plantas	8
1.3 Tamaño corporal y <i>trade-offs</i> o disyuntivas	9
1.4 Tamaño corporal y disyuntivas en plantas: los grandes ausentes en la anatomía ecológica de maderas	10
1.5 Utilidad de las especies mexicanas de <i>Manihot</i> para el estudio de la evolución del tamaño corporal	12
2. Artículo requisito	15
3. Hallazgo de una posible nueva especie de <i>Manihot</i> (Euphorbiaceae) afín a <i>M. oaxacana</i> en Guerrero	38
4. Análisis de la correlación entre el tamaño corporal, 31 variables anatómicas y 19 variables bioclimáticas en las especies norteamericanas de <i>Manihot</i> (Euphorbiaceae)	47
5. Discusión	
5.1 Existencia de señal filogenética sobre el tamaño corporal y las variables anatómicas.....	76
5.2 Correlación entre el tamaño corporal y las variables bioclimáticas.....	76
5.3 Correlación entre el tamaño corporal y las variables anatómicas y correlaciones entre dichas variables	77
5.4 Correlaciones entre las variables anatómicas y las variables bioclimáticas	
5.4.1 GPV y otras variables relacionadas	79
5.4.2 % Par. Axial y % Par. Radial	80
5.4.3 Longitud de las fibras y atributos relacionados	81
6. Conclusiones	82
Literatura citada	83
Apéndice 1. Artículo de revisión. Restricciones ontogenéticas.....	89
Apéndice 2. Artículo de revisión. Optimalidad y método comparativo	103

RESUMEN

Uno de los atributos que exhibe mayor variabilidad en los seres vivos es el tamaño, que abarca más de 21 órdenes de magnitud. El tamaño impacta prácticamente todos los aspectos de la morfología y de la fisiología de los organismos, lo que ha sido considerado de manera explícita en numerosos estudios evolutivos llevados a cabo con animales. Por el contrario, la relevancia de dicho atributo sobre la evolución de ciertos caracteres de las plantas ha sido relativamente subestimada. Tal es el caso de los caracteres anatómicos, cuya relación con las condiciones ambientales es a menudo analizada sin que se evalúe su posible relación con el tamaño de las plantas. El estudio de grupos monofiléticos que exhiben gran diversidad de tamaños corporales asociada a condiciones ambientales distintas es particularmente deseable para evaluar las interacciones existentes entre el tamaño y los atributos anatómicos.

El género *Manihot* (Euphorbiaceae) es nativo del Nuevo Mundo y cuenta con alrededor de 100 especies. Aproximadamente 80 de ellas habitan en Sudamérica, la más conocida de las cuales es *M. esculenta*, una de cuyas subespecies (*M. esculenta* subsp. *esculenta*) constituye una de las principales fuentes de carbohidratos en numerosos países del Tercer Mundo. En Norteamérica pueden encontrarse 20 *taxa*, 16 de los cuales son endémicos de México. Las especies encontradas en nuestro país exhiben cinco formas de crecimiento muy distintas, habiendo desde hierbas tuberosas hasta árboles de mediana altura. Lo anterior hace que este grupo constituya un modelo prometedor para el estudio de la evolución de dichas formas de crecimiento.

Como parte de este trabajo fue elaborada una hipótesis filogenética de las especies norteamericanas de *Manihot* a fin de someter a prueba su monofilia, evaluar la relación de las especies que lo conforman con *M. esculenta* subsp. *esculenta* y evaluar si los diversos hábitos de crecimiento evolucionaron de manera convergente o no. Para hacer dicha hipótesis, fueron llevados a cabo análisis bayesianos y análisis de máxima verosimilitud de una matriz de 3,662 pb conformada por dos marcadores de cloroplasto (*psbA-trnH*, *trnL-trnF*) y tres marcadores de núcleo (*PEPC* y dos copias parálogas de *G3pdh*). De acuerdo con los resultados obtenidos, las especies norteamericanas de *Manihot* constituyen un clado

cuyos miembros están sólo distantemente relacionados con *M. esculenta* subsp. *esculenta*, sugiriendo que no tuvieron participación en el desarrollo de esta subespecie. Dentro de dicho clado, tres o cuatro de las formas de crecimiento evolucionaron convergentemente.

Los resultados previamente mencionados indican que el clado de especies norteamericanas de *Manihot* constituye un modelo conveniente para el estudio de la evolución morfológica. Más aún, este grupo de especies parece ser apropiado para el estudio de la evolución del tamaño corporal porque sus formas de crecimiento tienen tallas muy diversas. Adicionalmente, el tamaño en estos *taxa* está correlacionado positivamente con la homogeneidad de la temperatura, temperaturas superiores en la parte más fría del año y mayores precipitaciones, lo que brinda apoyo adicional a la hipótesis de que el tamaño evolucionó de manera adaptativa.

Por lo tanto, fue evaluada la relación entre la circunferencia en la base del tallo y 31 variables anatómicas en 19 de las especies que conforman este clado. La circunferencia y ocho de dichas variables presentan señal filogenética y 15 de las variables anatómicas están relacionadas con la circunferencia y correlacionadas entre sí. Cuatro de tales variables están relacionadas con el número de vasos y el área del lumen de los elementos de vaso, tres con el número de radios, el número de hileras que constituye cada radio y el área transversal de las células de los radios y cuatro con el parénquima axial. Sólo dos de las variables relacionadas con la circunferencia involucran atributos de las fibras. El área transversal de los elementos de vaso, la proporción de radios con más de una hilera de células, el área transversal de las células de los radios y la proporción del área transversal del tallo ocupada por los tres tipos de parénquima axial están positivamente relacionadas entre sí. A su vez, tales atributos están negativamente relacionados con el número de vasos y el número de radios. Finalmente, los atributos anatómicos antes mencionados están correlacionados con las mismas variables bioclimáticas que la circunferencia, mientras que dichos atributos y otros no vinculados con el tamaño están correlacionados con variables bioclimáticas con las que la circunferencia no necesariamente lo está.

Lo mencionado en el párrafo anterior sugiere que cualquier inferencia respecto a la relevancia adaptativa de los atributos anatómicos debe ser efectuada tomando en consideración tanto las relaciones filogenéticas entre los organismos como el tamaño corporal de los mismos.

ABSTRACT

One of the most variable features among living beings is size, which spans more than 21 orders of magnitude. Size is related to virtually all aspects of the morphology and physiology of organisms, such as it has been explicitly acknowledged by several animal evolutionary studies. On the contrary, the relevance of this feature for the evolution of certain characters in plants has been relatively underestimated. Such is the case of anatomical features, whose relationship to environmental conditions is often analyzed without any assessment of their possible link to the size of plants. Studying monophyletic groups showing great diversity of body sizes associated to distinct environmental conditions is particularly desirable to assess the interactions between size and anatomical features.

The genus *Manihot* (Euphorbiaceae) is native to the New World and has around 100 species. Approximately 80 of them inhabit South America, being *M. esculenta* the most well-known of them because one of its subspecies (*M. esculenta* subsp. *esculenta*) is one of the main carbohydrates source in numerous countries of the Third World. In North America there are 20 species, 16 of which are endemic to Mexico. The species found in our country have five very distinct growth forms, from tuberous herbs to trees of middle size. This variety of forms makes this group of species a promising model for the study of evolution of such growth forms.

As part of this work, a phylogenetic hypothesis was made of the North American species of *Manihot* to prove their monophyly, to assess the relationship of its species to *M. esculenta* subsp. *esculenta* and to evaluate whether its diverse growth forms evolved convergently. To obtain such hypothesis, Bayesian and maximum likelihood analyses of 3,662 bp matrix made up of two plastid (*psbA-trnH*, *trnL-trnF*) and three nuclear markers (*PEPC* and two paralogous copies of *G3pdh*) were carried out. According to the results, North American species of *Manihot* make up a clade whose members are only distantly related to *M. esculenta* subsp. *esculenta*, suggesting they were not involved in the development of this subspecies. Within this clade, three or four of the growth forms evolved convergently.

Previously mentioned results indicate that the North American *Manihot* clade is a convenient model for studying morphological evolution. Even more, this group of species seems suitable for the study of the evolution of body size because its growth forms have very diverse sizes. Additionally, the size of these species is positively correlated to temperature homogeneity, higher temperatures during the coldest part of the year and higher precipitations, which reinforces the hypothesis that the size has evolved adaptively.

Therefore, it was evaluated the relationship between circumference and 31 anatomical variables in 19 of the species of this clade. The circumference and eight of such variables show phylogenetic signal, and 15 of the anatomical variables are related to the circumference and correlated to each other. Four of such variables are related to the number of vessels and the lumen area of vessel elements; three to the number of rays, the number of rows per ray, and the cross area of ray cells, and four to the axial parenchyma. Only two of the variables related to the circumference are features from the fibers. The cross area of vessel elements, the proportion of rays with more than one row, the cross area of ray cells and the proportion of stem cross area occupied by the three kinds of axial parenchyma are positively related to each other. In turn, such features are negatively related to the number of vessels and the number of rays. Finally, these anatomical features are correlated to the same bioclimatic variables that circumference, whereas such features and other anatomical attributes not related to the body size are correlated to bioclimatic variables with which circumference is not necessarily correlated to.

The aforementioned results suggest that any inference on the adaptive relevance of anatomical features in plants should be carried out explicitly considering both phylogenetic relationships among organisms and their body sizes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Patrones evolutivos del tamaño corporal

Una de las características más sobresalientes de los organismos es la heterogeneidad en las tasas evolutivas de sus caracteres. Mientras que algunas características exhiben una alta variabilidad (para conocer un ejemplo de labilidad morfológica, ver el Capítulo 2), otras exhiben una relativa constancia en el tiempo evolutivo. Esto ha sido atribuido por algunos autores a la acción de la selección natural y por otros a la existencia de restricciones ontogenéticas (para profundizar en el tema de restricciones ontogenéticas, ver el Apéndice 1).

Uno de los atributos que exhibe mayor variabilidad es el tamaño, que abarca más de 21 órdenes de magnitud (West *et al.*, 2000). La regla de Cope, según la cual existe una tendencia al incremento en el tamaño corporal en el tiempo evolutivo, es uno de los patrones más evidentes que se ha obtenido al examinar el registro fósil. Este patrón no involucra la ausencia de organismos de talla pequeña o un incremento progresivo en el tamaño promedio de los organismos, sino un incremento en el rango de tamaño (Enquist, 2003) o en los tamaños máximos alcanzados por los mismos (Rosell, 2002). Así, el volumen corporal máximo se incrementó en alrededor de 16 órdenes de magnitud en los últimos 3.5 billones de años. Este incremento ocurrió episódicamente, con aumentos pronunciados de unos 6 órdenes de magnitud a la mitad del Paleoproterozoico (hace unos 1.9 billones de años) y hace 600-450 millones de años, en congruencia con los dos principales eventos de aumento en la concentración de oxígeno atmosférico (Payne *et al.*, 2009). Una de las consecuencias de este proceso es la diferencia de 12 órdenes de magnitud existente en la masa corporal de las plantas terrestres actuales (Enquist, 2003).

1.2 Efectos del tamaño corporal comunes a todos los organismos

El tamaño impacta prácticamente todos los aspectos de la morfología y de la fisiología de los organismos, habiendo sido documentadas las siguientes relaciones:

1) Relación positiva entre la fuerza de las estructuras encargadas del sostén de los organismos o de sus partes (*e.g.* las extremidades de un animal o el tallo de las plantas) y el peso de los mismos.

Esta relación es resumida en la expresión (Bonner, 2006):

$$\text{Fuerza} \propto \text{Peso}^{2/3}$$

2) Relación positiva entre la extensión de las superficies a través de las cuales tienen lugar la difusión de oxígeno, de alimento y de calor entre los organismos y el peso de los éstos.

Dicha relación es expresada como (Bonner, 2006):

$$\text{Superficie} \propto \text{Peso}^{2/3}$$

3) Relación positiva entre la complejidad de los organismos (expresada como el número de tipos celulares) y su tamaño.

Aunque esta relación es relativamente imprecisa y aproximada (Bonner, 2006; McCarthy y Enquist, 2005) es apropiadamente ejemplificada por los rotíferos, en los que una disminución en el tamaño corporal alteró la estructura del aparato digestivo. Las especies más grandes de rotíferos tienen un intestino sencillo que corre de la boca al ano, mientras que en ciertas especies muy pequeñas el intestino fue reemplazado por un saco de citoplasma continuo que forma vacuolas al final de la boca y expulsa el contenido de éstas en el extremo anal (Bonner y Horn, 2000).

4) La tasa metabólica está negativamente correlacionada con el tamaño corporal (Bonner, 2006).

El tamaño impacta también, de manera determinante, aspectos de la conducta, la historia de vida y la adecuación de los organismos (Kingsolver y Huey, 2008; Payne *et al.*, 2009; Wikelski, 2005). El valor de este atributo está inversamente relacionado con el número de individuos que habita una cierta área (Bonner, 2006; Brown *et al.*, 2000), estando también correlacionado negativamente con el tiempo de desarrollo de los organismos, su fecundidad y sus tiempos generacionales (Kingsolver y Huey, 2008). Dado que los organismos con tamaños corporales reducidos exhiben menores tiempos generacionales y se reproducen a edades más tempranas, exhibirán las siguientes características (Aarsen *et al.*, 2006):

(1) Una mayor tasa de generación de nuevas variantes genéticas producidas por recombinación.

(2) Requerimientos inferiores de recursos ambientales para producir descendencia (numerosas observaciones apoyan la idea de que los tamaños pequeños son favorecidos en ambientes con disponibilidad irregular de recursos).

(3) Mayor potencial para producir un número dado de descendientes por unidad de tiempo.

Para concluir, es necesario mencionar que, aunque desde el punto de vista evolutivo ha habido una tendencia hacia el incremento del tamaño máximo en el tiempo geológico, dicho incremento no ha sido seleccionado siempre, sino sólo en aquellos casos en los que presumiblemente confiere ventajas y promueve el incremento de la adecuación. Así, en algunos linajes han sido seleccionados disminuciones en el tamaño de los organismos, como ha sucedido en las poblaciones insulares de mamíferos (cuyo tamaño corporal se reduce respecto al exhibido por los miembros de las poblaciones ancestrales –Biewener, 2000; Wikelski, 2005) o en las diminutas angiospermas pertenecientes a los géneros *Lemna* y *Wolffia* (Bonner, 2006).

El tamaño corporal tiene efectos adicionales que dependen del tipo de organismos considerados. Dichos efectos se mencionan en las siguientes secciones.

1.2.1 Efectos del tamaño corporal en los animales

Uno de los aspectos sobre los cuales el tamaño corporal incide de manera más obvia es la disponibilidad de presas. Así, por ejemplo, el tamaño de las serpientes tigre de Australia (*Notechis*) ha experimentado cinco disminuciones independientes como respuesta a la colonización de nuevas islas. Aparentemente, estos cambios han sido incentivados por el tamaño de las especies de las que se alimentan (Wikelski, 2005).

El tamaño corporal también está relacionado con el éxito reproductivo de los organismos. En las iguanas marinas de las islas Galápagos el número de cópulas está relacionado positivamente con el tamaño de los machos, pero el tamaño corporal es seleccionado negativamente en periodos de escasez de alimentos (Wikelski, 2005).

El tamaño influye de manera determinante en la locomoción de animales de las más diversas tallas. Así, cuando los pelos ubicados en las extremidades de animales acuáticos o insectos voladores son cortos debido al tamaño de los organismos, el número de moléculas que atraviesa entre ellos es reducido, por lo que las extremidades funcionan como remos no porosos. En contraste, en animales más grandes la porosidad de tales apéndices peludos se incrementa, lo que disminuye su capacidad locomotora y

los hace adecuados para funcionar como tamices filtradores u órganos sensoriales (*e.g.* apéndices filtradores del *krill* o branquias externas de los peces pulmonados) (Koehl, 2000). Asimismo, los insectos de la familia Gerridae (Hemiptera) sólo son capaces de sostenerse y moverse sobre el agua aprovechando la tensión superficial si no exceden cierto tamaño (Koehl, 2000).

El tamaño de los organismos también determina el efecto de la forma de sus cuerpos sobre su aerodinamismo o hidrodinamismo. Los cuerpos aerodinámicos o hidrodinámicos lo son porque su parte posterior es larga y se adelgaza al acercarse a su punta, lo que genera estelas menores. Este efecto es sólo significativo para organismos relativamente grandes porque en éstos el arrastre es mucho mayor que la fricción. Por otro lado, la forma “óptima” de las alas (*i.e.* la que maximiza la distancia cubierta por los animales planeadores) depende del tamaño de los organismos, siendo ancha y corta en los animales pequeños y larga y estrecha en los animales grandes (Koehl, 2000).

Finalmente, el tamaño corporal determina la capacidad de los animales para evitar a los depredadores, capturar presas (incrementando la velocidad con la que éstas son perseguidas o modificando la frecuencia de los sonidos emitidos por los depredadores que emplean la ecolocación) y mejorar la digestión de la comida (la presencia de más enzimas digestivas es garantizada por un mayor número de células) (Bonner, 2006).

1.2.2 Efectos del tamaño corporal en las plantas

La altura es una de las características relacionadas con el tamaño corporal que más estudios y discusiones ha merecido. Respecto a ésta, se ha argumentado que en cualquier etapa del proceso sucesional, ser más alto que los vecinos confiere las siguientes ventajas (Givnish, 1995; Westoby *et al.*, 2002; Enquist, 2003):

- (1) Acceso a la luz antes de que ésta sea interceptada por individuos adyacentes.
- (2) Acceso a recursos limitantes.
- (3) Mayor éxito reproductivo, pues una mayor altura permite atraer a más polinizadores (Aarssen *et al.*, 2006).
- (4) Mayor probabilidad de dispersar gametos y propágulos (*i.e.* polen y semillas) para que éstos lleguen a parejas potenciales o a hábitats desocupados (Aarssen *et al.*, 2006).
- (5) Habilidad para tolerar mayor variabilidad ambiental.

El desarrollo de mayores tamaños corporales, si bien parece impactar positivamente a los organismos al incrementar el acceso al agua, el éxito en el apareamiento, la fecundidad y la sobrevivencia, también requiere mayores tiempos de desarrollo y la inversión de considerables recursos para generar y mantener los tallos y las estructuras de soporte, utilizando para ello recursos que no pueden ser asignados al tejido fotosintético o reproductivo (Rosell y Olson, 2007). Adicionalmente, las plantas de mayor tamaño requieren cantidades significativamente mayores de biomasa para alcanzar niveles similares de transporte de agua que las plantas pequeñas, lo que implica que tienen menor conductancia hidráulica específica que las plantas pequeñas (Mencuccini, 2003). Por otro lado, la mayor proporción de tejido estructural muerto (xilema secundario) requerido para alcanzar mayores tamaños hace que los organismos se vuelvan, a medida que envejecen, cada vez más susceptibles al ataque de los descomponedores, particularmente después de la ruptura del tallo resultante de la desestabilización mecánica. Paralelamente, la probabilidad de experimentar tales desestabilizaciones se incrementa al hacerlo el lapso de vida de los organismos, como generalmente ocurre cuando se incrementa el tamaño de los mismos (Westoby *et al.*, 2002; Enquist, 2003).

Por consiguiente, las ventajas de tener un mayor tamaño corporal dependen del contexto, que determina si el beneficio fotosintético de incrementar la altura está balanceado o supera los costos estructurales de ese incremento (Kingsolver y Huey, 2008). Las condiciones en las que el aumento en la estatura resultará beneficioso parecen ser aquellas en las que la densidad y la altura de los competidores obstruyen el acceso a la luz (Givnish, 1995; Westoby *et al.*, 2002).

1.3 Tamaño corporal y *trade-offs* o disyuntivas

Un estudio significativo de la evolución del tamaño corporal debe estar íntimamente vinculado con el concepto de *trade-off* o disyuntiva dada la gran cantidad de atributos con los que el tamaño corporal está relacionado. El concepto de disyuntiva fue empleado por primera vez en biología en el marco de la teoría sobre historias de vida (Roff, 2002) y hace referencia a la existencia de fuertes asociaciones funcionales entre caracteres. A través de modelos de optimalidad, ha sido inferido que estas asociaciones producirán que la disminución en los valores de un cierto carácter o atributo esté relacionada con el aumento u optimización en los valores de otro, y la

optimización de uno u otro de los atributos tendrá efectos opuestos sobre la adecuación del organismo (Rosell, 2010; para profundizar en el tema de modelos de optimalidad y método comparativo, ver Apéndice 2).

Las disyuntivas están íntimamente vinculadas con el fenómeno de la adaptación y tienen efectos notables sobre las posibilidades de diversificación de las morfologías (Rosell, 2010) y de las historias de vida. Las combinaciones de caracteres que pueden ser alcanzadas por los organismos están restringidas por tales disyuntivas, por lo que dichos caracteres no son libres de variar de manera independiente y no son maximizados individualmente por la selección (Roff, 2002).

Desde la perspectiva de la teoría de las historias de vida, las disyuntivas pueden ser divididas en dos grupos. El primero incluye las características vinculadas directamente con la fecundidad, la sobrevivencia y la edad a la cual se alcanza la madurez, que son llamadas características de la adecuación directa. En la segunda categoría se encuentran las disyuntivas que actúan indirectamente sobre la adecuación modificando alguno de los caracteres precedentes. Un ejemplo de esta segunda categoría es el tamaño del cuerpo que, aunque no determina la adecuación sí determina, al menos parcialmente, la fecundidad, el éxito reproductivo, la sobrevivencia o edad a la que se alcanza la madurez (Roff, 2002).

1.4 Tamaño corporal y disyuntivas en las plantas: los grandes ausentes en la anatomía ecológica de maderas

Los tallos de las plantas son modelos especialmente apropiados para estudiar el efecto del tamaño sobre diversas características relevantes, así como las disyuntivas existentes entre las mismas. Esto se debe a que tienen un número reducido de tipos celulares (elementos de vaso, fibras y células del parénquima) que se derivan de las mismas células meristemáticas cambiales (Carlquist, 1988; Mauseth, 1988). Esto genera una fuerte competencia por recursos y por espacio entre un tipo celular y los otros. Adicionalmente, puede decirse que cada uno de los tipos celulares es responsable de llevar a cabo cada una de las funciones ejecutadas por el tallo, que son la conducción (desempeñada por los vasos), el sostén (llevada a cabo por las fibras) y el almacenamiento (efectuado por el parénquima) (Mauseth, 1988). Por lo tanto, dado el vínculo ontogenético que tienen estos tipos celulares y la división de labores que garantizan, hay una competencia fuerte por recursos entre las funciones del tallo, que es

una de las condiciones más importantes para el surgimiento de disyuntivas (Rosell, 2010).

En los tallos han sido ampliamente documentados algunas disyuntivas, mientras que otras han sido poco exploradas. En términos generales, aquellos atributos fisiológicos involucrados en una misma función están correlacionados positivamente. Así, por ejemplo, la rigidez a la flexión, la densidad de la madera o el volumen porcentual de paredes en la misma, son variables vinculadas con el sostén mecánico que están correlacionadas. En forma semejante, el contenido de agua en la madera y la corteza, el volumen porcentual de agua en la madera y la capacitancia de la misma (determinada como el cambio en el contenido de agua en ésta por unidad de cambio en el potencial hídrico -Holbrook, 1995) están positivamente correlacionadas (Rosell, 2010). Por el contrario, la conductividad máxima del xilema y su resistencia a la cavitación exhiben una correlación negativa (cf. Chave *et al.*, 2009) que es comúnmente citada como una disyuntiva entre la seguridad y la eficiencia en la conducción de agua (Hacke y Sperry, 2001; Rosell, 2010).

A pesar de que la existencia de tales disyuntivas entre atributos fisiológicos ha sido documentada en plantas, no ha sido igualmente documentada la relación entre las características anatómicas del tallo y dichas disyuntivas. Usualmente, las investigaciones en la anatomía ecológica de maderas se han concentrado en relacionar las características anatómicas del tallo con la forma de vida de las plantas y las variables ambientales que posiblemente son relevantes para las adaptaciones estructurales y funcionales. Aunque el objetivo general de esta disciplina es detectar la presencia de características anatómicas similares en situaciones ambientales semejantes, las investigaciones en esta área han tendido a concentrarse en ciertos atributos considerados relevantes, desestimando los efectos que la variación en los mismos tiene sobre la variación en otros (Rosell *et al.*, 2007).

Adicionalmente, así como en otras áreas de la biología como la ecología fisiológica de animales (*e.g.* Huey y Hertz, 1982; Huey y Hertz, 1984; Brischoux *et al.*, 2007) o la teoría de historias de vida (Roff, 2002) ha sido reconocido por largo tiempo la relevancia del tamaño de los organismos en la determinación de sus relaciones con el medio ambiente, este atributo ha sido ignorado en la anatomía ecológica de maderas. Como resultado de lo anterior, un gran número de correlaciones paradigmáticas en esta área probablemente son producto del tamaño de las plantas y no de ciertas condiciones ambientales, tal como ha sido interpretado (Rosell *et al.*, 2007). Así, por ejemplo, a

pesar de que se sabe que el diámetro de los vasos es el resultado del alargamiento radial o tangencial del tallo de las plantas (Mauseth, 1988) y, por consiguiente, que está relacionado con el tamaño de las mismas, la correlación positiva entre el diámetro de los vasos y la disponibilidad de agua ha sido reiteradamente citada como un caso en el que la selección natural ha tendido a maximizar la conductividad cuando los riesgos de sufrir embolismos son reducidos (*e.g.* Carlquist, 2003), desestimando paralelamente la hipótesis alternativa de que la selección natural podría estar maximizando la altura en condiciones en las que hay una intensa competencia para acceder a la luz (*e.g.* Westoby *et al.*, 2002).

1.5 Utilidad de las especies mexicanas de *Manihot* para el estudio de la evolución del tamaño corporal

Manihot es un género exclusivo del continente americano cuyo origen es relativamente reciente, habiendo sido datado hace unos 6.6 m.a. (Chacón *et al.*, 2008). La especie mejor conocida es *M. esculenta* subsp. *esculenta* Crantz, también llamada cassava, mandioca o yuca, que es una de las fuentes de carbohidratos más importantes en numerosos países del Tercer Mundo y que fue domesticada a partir de la especie sudamericana *Manihot esculenta* subsp. *flabellifolia* (Pohl.) Cif. (Olsen y Schaal, 1999, 2001). Además de dicha especie, este género incluye alrededor de 97 especies distribuidas entre el sur de Arizona y Argentina. Hay dos concentraciones principales de *taxa*, una en México y la otra en Brasil. Las especies encontradas en las dos áreas están notablemente aisladas geográficamente y ninguna de las especies norteamericanas se encuentra en Sudamérica. Alrededor de 80 de las especies son sudamericanas (Rogers y Appan, 1973). En México hay 20 especies, que constituyen un grupo monofilético (Chacón *et al.*, 2008; Capítulo 2). Dos de dichas especies fueron descubiertas recientemente (Jiménez-Ramírez, 1990; Steinmann, 2005), mientras que otra fue previamente incluida en otro género (*Manihotoides pauciflora*; Rogers y Appan, 1973).

Las especies de *Manihot* son encontradas en regiones relativamente secas. Sólo algunas de ellas se han reportado en bosques húmedos, siendo típicamente encontradas en los claros de dichos bosques. La adaptación de estas especies a los climas secos es evidente por la presencia de grandes raíces tuberosas y por el hecho de que los tallos de varias especies arbustivas mueren anualmente, quedando sólo vivas bajo el suelo las

raíces a partir de las cuales se formarán los nuevos tallos cuando las condiciones ambientales se modifiquen.

Todas las especies son relativamente escasas en su área de distribución y nunca constituyen elementos dominantes de la vegetación local. Dicha escasez podría ser la causa del poco conocimiento que tenemos sobre el número de especies y la distribución precisa de algunas de ellas (para profundizar en un ejemplo, ver Capítulo 3). Asimismo, gran parte de las especies es sensible a las heladas, por lo que su límite de distribución altitudinal es de 2,000 msnm (Rogers y Appan, 1973). Las especies norteamericanas son encontradas en suelos calizos de origen relativamente reciente y 16 de ellas viven en la vertiente del Pacífico mexicano (una ha extendido su distribución hasta la Península de Yucatán), una en el estado de Morelos, y tres en Nuevo León y Tamaulipas (Rogers y Appan, 1973).

Las especies de *Manihot* exhiben una enorme plasticidad en la forma de las hojas, pero la morfología de sus órganos florales y de sus frutos es relativamente invariable. Las flores son apétalas, estaminadas o pistiladas, y están dispuestas en inflorescencias de formas variables. En la mayoría de las especies las flores pistiladas, que normalmente se encuentran en la base de las inflorescencias, maduran antes de que lo hagan las flores estaminadas, ubicadas en el ápice de la inflorescencia. Las especies son polinizadas por una gran variedad de himenópteros a cuyos cuerpos se pega el polen. Su fruto es una cápsula y las semillas son carunculadas y de testa seca (Rogers y Appan, 1973). Poco se sabe de sus dispersores, y las características asociadas a la dispersión son muy variables en este género. Las especies sudamericanas de claros de zonas boscosas tienen características que indican que son dispersadas por pequeños vertebrados frugívoros (semillas grandes carentes de elaiosomas y frutos indehiscentes), mientras que un gran número de especies, particularmente aquellas del Cerrado, cuentan con características que apuntan a que son dispersadas por hormigas (semillas pequeñas con grandes elaiosomas) (Duputié *et al.*, 2011). Todos los frutos de las especies norteamericanas que hemos colectado parecen ser dehiscentes, pero aquellas especies de mayor tamaño cuentan con semillas grandes que probablemente no son dispersadas por hormigas. La única especie cuya dispersión ha sido observada es *M. oaxacana*. En este taxón, cuyas semillas son de tamaño mediano y cuentan con elaiosomas, la dispersión es llevada a cabo por hormigas (Echeverría 2015, com. pers.)

Al igual que sucede con los caracteres asociados con la dispersión, la forma de crecimiento de las especies de este género es altamente variable (Rogers y Appan, 1993;

Duputié *et al.*, 2011). Las especies norteamericanas exhiben una diversidad de formas de vida y de tamaños sobresalientes, incluyendo grandes árboles, arbustos de arquitectura diversa, pequeñas hierbas tuberosas y una especie lianescente. La distribución geográfica de estas especies es congruente con uno o con varios orígenes de cada forma de crecimiento. Varias especies con 2-5 hábitos son encontradas en las mismas unidades biogeográficas, aunque dentro de dichas unidades sus distribuciones son disyuntas. Así, cada hábito de crecimiento podría haber surgido de nuevo en cada una de las áreas geográficas, o podría haber surgido sólo una vez y haberse dispersado posteriormente a áreas diferentes. Encontrar que cada hábito ha surgido repetidamente abriría la posibilidad de que las condiciones ambientales hubieran promovido la evolución reiterada de los diferentes hábitos. El escenario previamente mencionado, junto con el número relativamente reducido de especies, hace a las especies norteamericanas de *Manihot* un grupo perfecto para el estudio de la evolución adaptativa de los hábitos de crecimiento y sus tamaños corporales asociados.

2. ARTÍCULO REQUISITO

APPARENT SIMILARITY, UNDERLYING HOMOPLASY: MORPHOLOGY AND MOLECULAR PHYLOGENY OF THE NORTH AMERICAN CLADE OF *MANIHOT*¹

MARÍA-ANGÉLICA CERVANTES-ALCAYDE^{2,5}, MARK E. OLSON², KENNETH M. OLSEN³,
AND LUIS E. EGUIARTE⁴

²Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, 3er Circuito de Ciudad Universitaria s/n, Del. Coyoacán, México D.F. 04510 Mexico; ³Department of Biology, Washington University, St. Louis, Missouri 63130 USA; and ⁴Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, 3er Circuito de Ciudad Universitaria s/n, Del. Coyoacán, México D.F. 04510 Mexico

- *Premise of the study:* Morphologically diverse clades are useful for detecting adaptive morphological evolution. Each of their variants may have evolved once or several times, suggesting that their repeated appearance may be due to environmental pressures. The North American *Manihot* species are an excellent system to detect possible adaptations and to assess the effect of mono- or polyphyly on classification. With 20 species, this group includes growth forms from tuberous herbs to trees. The monophyly of this group and its relationship with the economically important *M. esculenta* were tested for the first time with complete sampling of North American species.
- *Methods:* We carried out maximum likelihood and Bayesian phylogenetic analyses on a matrix of 3662 bp from chloroplast (*psbA-trnH*, *trnL-trnF*) and nuclear loci (*PEPC* and two paralogous copies of *G3pdh*). We included all North American *Manihot* species, *Manihotoides pauciflora*, and published sequences from 34 South American species.
- *Key results:* Our results support monophyly of the North American *Manihot* group. Its taxonomic sections are paraphyletic, and three to four growth forms evolved repeatedly. *Manihotoides pauciflora* is nested within North American *Manihot* species. Some *PEPC* and *G3pdh* clones grouped with clones of other species and not with clones from their own species.
- *Conclusions:* North and South American *Manihot* species are sister clades. Paraphyly of North American sections suggests that taxonomic revision is warranted. The position of *Manihotoides pauciflora* confirms that *Manihotoides* should remain subsumed within *Manihot*. Most growth forms likely evolved repeatedly in this group. The behavior of *PEPC* and *G3pdh*_{NA} clones is probably due to incomplete lineage sorting.

Key words: Bayesian analyses; Euphorbiaceae; growth form evolution; incomplete lineage sorting; maximum likelihood; *Manihotoides pauciflora*; morphological homoplasy; North American *Manihot* clade.

Detecting morphological convergence allows the identification of possible adaptations and environmental factors that promote morphological diversity. The study of morphologically

¹Manuscript received 17 February 2015; revision accepted 26 February 2015.

Funded by CONACyT grants 46475 and 132404, and PAPIIT grant IN228207. The authors thank the Extreme Science and Engineering Discovery Environment (XSEDE) for the 50,000 CPU hours granted. The authors thank V. W. Steinmann, Y. Ramírez Amezcua, and V. Rojas Piña for field assistance. M.-A.C.-A. thanks the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología of Mexico for a graduate scholarship and the Posgrado en Ciencias Biológicas of the Universidad Nacional Autónoma de México. The authors thank L. O. Alvarado-Cárdenas for assistance with the figures, R. Cerritos Flores and J. Rosell García for assistance in cloning and annotating sequences, J. Calónico Soto for some of the pictures, D.-I. Hernández-Mena for help in reconstructing growth form evolution, L. Márquez Valdelamar and L. Small for invaluable laboratory assistance, and Mark P. Simmons and two anonymous reviewers for significant improvements to the manuscript.

⁵Author for correspondence (e-mail: angelicacervantesalcayde@yahoo.com.mx), phone: +52 55 5622-9124

doi:10.3732/ajb.1500063

diverse clades is particularly useful because the species share a common ancestor and evolved from the same morphological starting point. Within morphologically diverse clades, each of the different variants might have evolved once, with their occurrence in multiple species reflecting shared ancestry, or they might have evolved convergently in separate species (e.g., Baker et al., 2000; Möller and Cronk, 2001; Perret et al., 2003; Edwards et al., 2005; Hearn, 2006). To identify one of these scenarios as the most plausible requires knowing the phylogenetic relationships among the members of these clades. One of the best-known examples of convergent morphological evolution comes from the lizard genus *Anolis* (Losos, 2001). On each of the largest islands of the Caribbean, there are similar assemblages of lizards, each made up of species with distinct body forms and divergent habitat uses. Molecular phylogenies indicate repeated and independent evolution of each body form on each island as the most likely scenario (see also Reinthal and Meyer, 1997; Turgeon and Bernatchez, 2003; Østbye et al., 2005; Østbye et al., 2006). Distinguishing between single and multiple origins of morphological features not only affects inference of the processes involved in species diversification, but

also is vital for identifying the features that can diagnose natural supraspecific classifications. We detail a case in the morphologically diverse and economically important plant genus *Manihot* Mill. Our molecular phylogenetic data suggest that morphologically similar species, which have traditionally been grouped together in supraspecific classifications, are actually instances of homoplasious evolution of growth form.

Manihot occurs exclusively in the New World and belongs, with the genera *Cnidocolus* Pohl, *Elateriospermum* Blume, *Glycydendron* Ducke, *Hevea* Aubl., and *Micrandra* Benn. & R. Br., to the lineage of articulated crotonoids within Euphorbiaceae Juss. (Wurdack et al., 2005). *Manihot* and *Cnidocolus* have been considered sister genera based on morphological and molecular evidence (Miller and Webster, 1962; Webster, 1994; Wurdack et al., 2005). With approximately 100 species, *Manihot* is a phenotypically diverse genus that includes tuberous herbs with annual shoots, shrubs, vines, and trees over 10 m tall (Figs. 1, 2). Its geographical range spans southern Arizona to Argentina, but there are two main concentrations of taxa. The largest is in eastern and central Brazil, where almost 80 species occur in a region including the states of Goiás, Minas Gerais, and Bahia (Rogers and Appan, 1973). Mexico is the center of diversity in North America, with 15 of the 20 North American species occurring exclusively there, and the remaining five species having the bulk of their ranges in Mexico. Only one species, *M. brachyloba* Müll. Arg., has a distribution that overlaps with those of both South and North American species, occurring in the northwestern Amazon basin, in a very small area of Costa Rica, and on Hispaniola (Duputié et al., 2011). Most species of *Manihot* are found in tropical dry habitats, and even those that occur in wet forest tend to grow in sunny clearings. The best-known species is the economically important starch crop cassava (also known as manioc or yuca), *M. esculenta* subsp. *esculenta* Crantz, which was domesticated from the South American *Manihot esculenta* subsp. *flabellifolia* (Pohl.) Cif. (Olsen and Schaal, 1999, 2001).

Phylogenetic relationships among North American *Manihot* species have been little studied. Although most previous phylogenetic hypotheses for the genus have suggested that the North American species make up a monophyletic group (Schaal et al., 2006; Chacón et al., 2008), an alternative hypothesis proposes that the North American species form a grade basal to the South American clade (Duputié et al., 2011). Ascertaining whether the North American species form a clade requires extensive sampling of these species. A phylogenetic analysis of the North American species would help clarify the relationships within this group, because less than half of the species have been included in previous phylogenetic studies. In addition, a robust phylogenetic hypothesis for the North American species of *Manihot* would help settle the long debate regarding the possible involvement of three North American species in the domestication of the most economically important species in the genus, *M. esculenta* subsp. *esculenta* (e.g., Rogers, 1965; Renvoize, 1972; Bertram, 1993; Fregene et al., 1994; Roa et al., 1997; Olsen and Schaal, 1999, 2001; Léotard et al., 2009). Showing that the species are only distantly related to the cultivated manioc would further support *M. esculenta* subsp. *flabellifolia* as the sole wild progenitor (Olsen and Schaal, 1999, 2001).

A phylogenetic hypothesis for North American species would also allow us to address whether the proposed supraspecific taxonomy (Rogers and Appan, 1973) represents monophyletic groups. Rogers and Appan (1973) split the North American species into two sections, *Foetidae* Rogers and Appan and *Parvibracteatae* Pax emend. Rogers and Appan, based on the growth form and the size of fruits and seeds. There is evidence that these sections might not reflect monophyletic groups, with South and North American species from different sections being intermingled in molecular phylogenetic hypotheses (Bertram, 1993; Chacón et al., 2008; Duputié et al., 2011). Moreover, since the monograph of Rogers and Appan (1973), two new

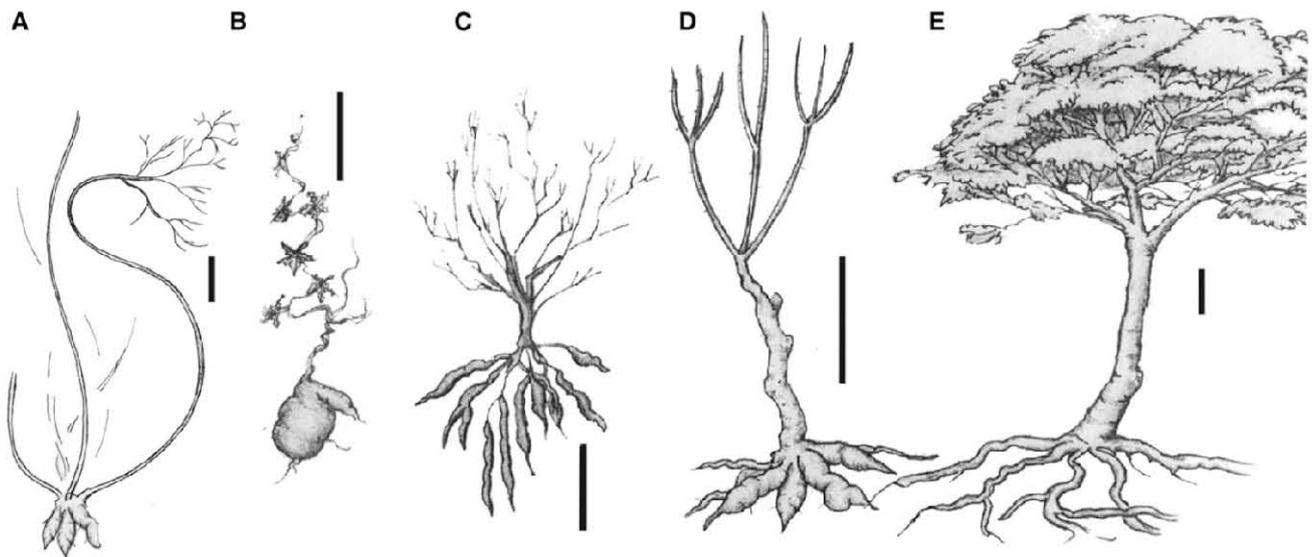


Fig. 1. Growth form diversity in North American *Manihot* species. (A) Lianas (plants with non self-supporting stems, commonly exceeding 10 m in length, but usually less than 5 cm in diameter). (B) Herbs (short plants with annual stems and massive tuberous roots). (C) Shrubs (plants with tuberous roots, at most 3 m in height, lacking distinct trunks and having numerous branches rarely exceeding 5 cm in diameter). (D) Treelets (plants with tuberous roots normally not exceeding 3 m in height, with distinct trunks sparingly branched well above the base and branches rarely exceeding 5 cm in basal diameter). (E) Trees (tall plants with fibrous roots, reaching 5 m or more, with distinct trunks commonly exceeding 10 cm in basal diameter branched well above the base). Scale bars: A, C, E = 1 m; B = 10 cm.



Fig. 2. Eight North American *Manihot* species representing the different growth forms in this genus and *Manihotooides*. (A, B) Trees (A, *M. foetida*; B, *M. websteri*). (C, D) Treelets (C, *M. pringlei*; D, *M. aesculifolia*). (E, F) Shrubs (E, *M. obovata*; F, *Manihotooides pauciflora*). (G, H) Herbs (G, *M. rhomboidea*; H, *M. subspicata*).

Mexican species, *M. obovata* (Jiménez-Ramírez, 1990) and *M. mcvaughii* (Steinmann, 2005) have been described. Jiménez-Ramírez (1990) described the section *Obovatae* to include *M. obovata*, while Steinmann (2005) did not designate a sectional affinity for *M. mcvaughii*. For a stronger test of the monophyly of the North American sections and to examine the placement of newly described taxa, we included in our analyses all known North American species.

In addition to evaluating the monophyly of North American species and sections of *Manihot*, a phylogenetic hypothesis would make it possible to address the taxonomic status of two additional enigmatic taxa. One is the genus *Manihotooides*, the only species of which, *M. pauciflora* (Brandege) D.J. Rogers & Appan, was previously considered a species of *Manihot* (Brandege, 1910). *Manihotooides* was erected for it (Rogers and Appan, 1973) because it has condensed stems and uniflorous inflorescences, conditions that made it unique in *Manihot*. The subsequent description of *M. obovata* (Jiménez-Ramírez, 1990) and *M. mcvaughii* (Steinmann, 2005), which share with *Manihotooides*

these features, suggested that *M. pauciflora* should again be subsumed within *Manihot* (Webster, 1994, 2014; Radcliffe-Smith, 2001; Martínez-Gordillo et al., 2002). We test its position here.

Another elusive relationship that a phylogenetic hypothesis would help clarify is that between *M. crassisejala* Pax & K. Hoffm. and *M. foetida* (Kunth) Pohl. *Manihot crassisejala* is known from only a few wild populations, whereas *M. foetida* lacks known wild populations but is a part of traditional horticulture. These species are extremely similar morphologically, differing only in the glabrous ovary of *M. crassisejala* and the hairy ovary of *M. foetida*. However, many morphological characters are likely markedly homoplasious in *Manihot* (Chacón et al., 2008), so this similarity might not reflect ancestry. Our phylogenetic reconstruction will allow us to evaluate whether the morphological similarity between these two species reflects common ancestry or whether it might represent an example of repeated evolution of similar morphologies.

In addition to its economic importance, the North American *Manihot* species are of interest because they offer a useful

system for the study of growth form evolution. The distribution of North American species of *Manihot* seems congruent with a single or with multiple origins of each growth form in this genus. Several species of *Manihot*, together often representing two to five growth habits, can be found in the same biogeographical units (Fig. 3; following Morrone, 2005). Within these general units, most *Manihot* species have restricted distributions. This situation, with localized species assemblages, often isolated from one another, and each with similar arrays of growth forms, represents an archipelago-like distribution, analogous to the distribution of *Anolis* ecomorphotypes on the Greater Antillean islands (Losos, 2001). Each growth habit in *Manihot* might have arisen in each of the geographical areas in which it is found, or it might have arisen only once and subsequently spread to different areas prior to speciation. Identifying which of the two options is the more likely is a primary goal of this study.

Finally, a phylogenetic hypothesis would allow us to evaluate whether the phenomenon of incomplete lineage sorting is as common in North American species as in those of South America. Incomplete lineage sorting may occur in recently radiated lineages, where there has not been sufficient time for sequences to diverge to the point of reciprocal monophyly between species. It has been suggested that the relatively recent appearance

of *Manihot* (approximately 6.6 million years ago [Ma]; Chacón et al., 2008) would give insufficient time for the evolution of reproductive barriers (Chacón et al., 2008) and for coalescence leading to reciprocal monophyly (Duputié et al., 2011). Potentially congruent with these observations is that the South American species of *Manihot* intergrade morphologically with one another. In contrast, North American species are readily distinguished from one another, having clear morphological discontinuities between them (M. E. Olson and K. M. Olsen, personal observations). This discontinuity might suggest that there has been more time since divergence in the North American species and consequently more frequent reciprocal monophyly.

In summary, this study has four main goals. The first is to evaluate whether the North American *Manihot* species are a monophyletic group. The second is to explore whether the supraspecific classification of Rogers and Appan (1973), which is based on growth form, reflects monophyletic groups, as well as to assess the generic status of *Manihotoides* and the phylogenetic relationships of two species described in the last two decades. The third is to analyze whether each growth habit arose one or more times. The final goal is to assess whether incomplete lineage sorting, which is prevalent in the South American species, is also widespread in the North American species.

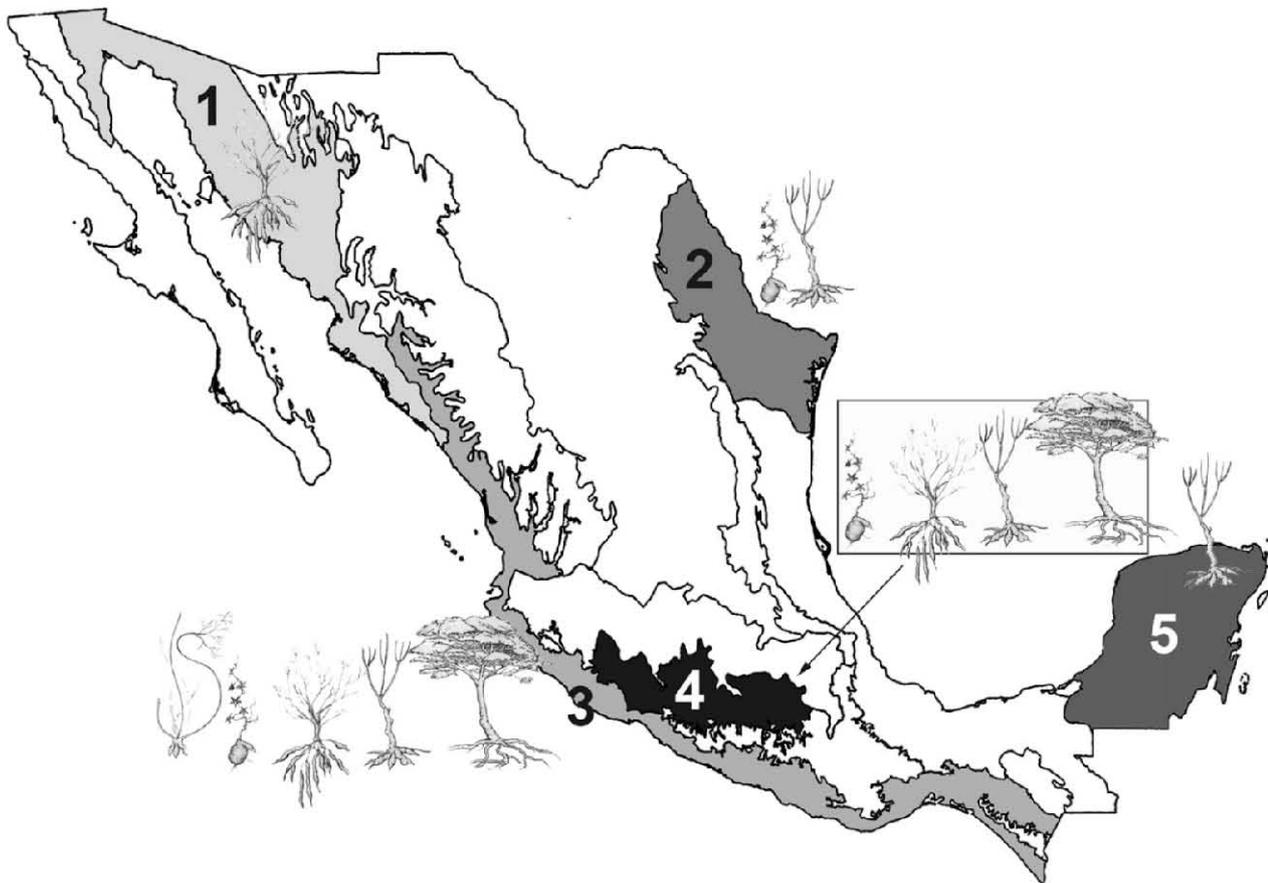


Fig. 3. Map of North American *Manihot* growth forms. Different growth forms often occur together in the same biogeographic unit. This distribution creates an archipelago-like situation analogous to that described by Losos (2001). Biogeographic units: 1 = Sonora, 2 = Tamaulipas, 3 = Mexican Pacific Coast, 4 = Balsas Basin, 5 = Yucatan Peninsula (Morrone, 2005).

MATERIALS AND METHODS

Taxon sampling—We sampled one individual for 17 North American species that have restricted distributions and little intraspecific morphological variability and two individuals for one morphologically variable species (*M. caudata*, some of whose populations have individuals with flat canopies and exfoliating bark, whereas other populations have individuals with rounded canopies and smooth bark) and two widespread species (*M. aesculifolia* and *M. rhomboidea*). For these taxa, we obtained sequences for all markers from one individual, and sequences for two to four markers for the second. In the phylogenetic analyses, we only included the sequences of one individual for each North American species because the sequences were invariant within species. In addition to this sampling of all 20 North American species of *Manihot*, we included as outgroups *M. brachyloba* (the northernmost South American species), *M. esculenta*, and *Cnidoscolus egegius* Breckon ex Fern. Casas. We generally extracted DNA from material collected during the rainy season from young leaves. For species collected during the dry season (*M. angustiloba*, *M. auriculata* McVaugh, *M. davisiae*, *M. obovata*, *M. rubricaulis* I.M. Johnston, *M. websteri* D.J. Rogers & Appan and *M. pauciflora*), we extracted DNA from bark.

Our phylogenetic analyses included 126 original sequences from *Manihot* species and *C. egegius*. These sequences were from three plastid and three nuclear markers. The plastid markers were the intergenic spacer *psbA-trnH*, the intron *trnL*, and the intergenic spacer *trnL-trnF* (primers from Taberlet et al. [1991] and Sang et al. [1997]). The sequences from the intron *trnL* and the intergenic spacer *trnL-trnF* were analyzed as a single marker (*trnL-trnF*) following Chacón et al. (2008). The nuclear markers were the gene for phosphoenolpyruvate carboxylase (*PEPC*) (primers from Olson [2002]), a version of the low-copy nuclear gene encoding glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase that was not sequenced in previous phylogenetic studies of *Manihot* (*G3pdh_{NA}*) (primers from Strand et al. [1997]), as well as a possible paralog of *G3pdh_{NA}* sequenced by previous authors for several North and South American species (hereafter *G3pdh_{NASA}*). In addition to our original sequences, we also used 74 sequences of one plastid and one nuclear marker from Chacón et al. (2008) and Duputié et al. (2011) for 45 species of *Manihot* and two of *Cnidoscolus* (see Appendix 1 for vouchers and GenBank accession numbers). We included the sequences of *trnL-trnF* and *G3pdh_{NASA}* of Chacón et al. (2008) for all the species of *Manihot* for which these authors amplified both markers. Additionally, we used all the sequences of *G3pdh_{NASA}* of Duputié et al. (2011) for North American species, and the sequences of *G3pdh_{NASA}* from these authors for 11 South American species representing all the major clades they recovered, the six major South American biogeographic units inhabited by *Manihot* (Duputié et al., 2011, following Morrone, 2006), most growth forms found in the South American species, and the entire South American range of *Manihot* (Appendix S1, see Supplemental Data with the online version of this article).

DNA extraction, amplification, cloning, and sequencing—We ground leaves or bark in liquid nitrogen or in a TissueLyser LT (Qiagen, Valencia, California, USA) with one or two cycles of 50 shakings per second for 3 min. We extracted total genomic DNA using DNeasy Plant Mini kits (Qiagen) following the manufacturer's protocols, eluting the samples in deionized water.

Details on the amplification protocols, reaction contents, and kits used are in Appendices S2 and S3 (see online Supplemental Data). We obtained all sequences of *psbA-trnH*, *trnL-trnF*, and *G3pdh_{NASA}*, as well as most *PEPC* sequences and some *G3pdh_{NA}* sequences, by direct sequencing, whereas the remaining *PEPC* and *G3pdh_{NA}* sequences were obtained after cloning. Before direct sequencing, we purified amplification products using the QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). We followed the manufacturer instructions, eluting the amplifications in 30 μ L of deionized water rather than in dilution buffer. For sequencing, we used BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kits (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). For purifying sequencing reactions, we used Centri-Sep spin columns (Princeton Separations, Freehold, New Jersey, USA) for *PEPC* and *psbA-trnH*, or Centri-Sep 96-well plates (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) for *trnL-trnF* and *G3pdh_{NA}* with Sephadex G-50 Fine (GE Healthcare BioSciences, Piscataway, New Jersey, USA).

We carried out cloning to obtain sequences of *PEPC* for seven species and of *G3pdh_{NA}* for 13 species with more than one haplotype of these markers. Although we made several modifications to the amplification protocols and/or reactions, we could not increase specificity of amplification reactions for direct sequencing. Therefore, we made four 50 μ L amplification reactions per species with nonproofreading polymerases, separated the fragments using electrophoresis, and purified the desired fragments using the QIAquick Gel Extraction Kit

(Qiagen) and the manufacturer instructions. We cloned the purified fragments into plasmids using standard protocols. For ligations, we used the Pgm-T Easy Vector System I kit (Promega, Madison, Wisconsin, USA) or the pJET1.2/blunt Cloning Vector (Fisher Scientific, Pittsburgh, Pennsylvania, USA). We cloned the ligations into JM109 (Promega), Z (Zymo Research, Orange, California, USA), or NEB 5-alpha competent cells (New England Biolabs, Ipswich, Massachusetts, USA). We digested bacterial plasmids with EcoRI (Invitrogen; New England Biolabs). We purified the digested plasmids with Montage Plasmid Miniprep 96 well kits (Millipore Corp., Billerica, Massachusetts, USA) or QIAprep Spin Miniprep Kits (Qiagen). After plasmid purification, we followed the same sequencing procedure described above for the plastid markers and *G3pdh_{NASA}*. We obtained three to four clone sequences for all species, except for *M. obovata*, for which we only found and sequenced two clones.

We sequenced *psbA-trnH*, *trnL-trnF*, *PEPC*, and *G3pdh_{NA}* using the ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer platform (Applied Biosystems). We sequenced *PEPC* and *psbA-trnH* sequences at the facilities of the Instituto de Biología and the Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental of the Instituto de Ecología, both of the Universidad Nacional Autónoma de México. We sequenced *trnL-trnF* and *G3pdh_{NA}* at the facilities of Washington University in Saint Louis. We sent our amplifications of North American *G3pdh_{NASA}* to be sequenced at the High Throughput Genomics Center, Seattle, Washington (<http://www.htseq.org/>).

Phylogenetic analyses—We edited sequences using the program Sequencher v4.8 (Gene Codes, Ann Arbor, Michigan, USA). After editing, we made preliminary alignments in Clustal W (Larkin et al., 2007) as implemented in the program BioEdit v. 5.0.6 (Hall, 1999) using the default parameters. Later we corrected these alignments using the program Se-AL v.2.0a11 Carbon (Rambaut, 2002), seeking to maximize similarity and simultaneously minimize substitutions, eliminating ambiguous zones from further analysis. We carried out all our phylogenetic analyses with the CIPRES Science Gateway (<http://www.phylo.org/portal2>; Miller et al., 2010).

Bayesian analyses—We carried out Bayesian MCMC analyses (Yang and Rannala, 1997) of each marker separately using the program MrBayes v. 3.1.2 (Huelsenbeck and Ronquist, 2001). The first purpose of these analyses was to assess qualitatively whether markers yielded contradictory topologies or not. The second was to detect putatively paralogous clones in the nuclear markers *PEPC* and *G3pdh_{NA}*, which we cloned. We excluded *PEPC* and *G3pdh_{NA}* clones with singleton mutations that were likely produced by sequencing errors. Therefore, we only included in phylogenetic analyses *PEPC* and *G3pdh_{NA}* clones that differed by at least two bases from the other clones of the same species or that differed only by one, provided that this distinctive character state was shared with at least another clone or sequence from another species.

We carried out separate analyses for each of four markers to observe which clades were recovered, as well as the behavior of the clones of nuclear markers. For *G3pdh_{NA}*, we carried out two separate analyses. The first included our sequences plus the sequences of Chacón et al. (2008) and Duputié et al. (2011). In this analysis, our *G3pdh* sequences made up a clade distinct from the sequences of Chacón et al. (2008) and Duputié et al. (2011) (online Appendix S4; alignment available at <http://purl.org/phylo/treebase/phyloids/study/TB2:S16916>). This result and the great difference between our sequences and the sequences of Chacón et al. (2008) and Duputié et al. (2011) (Fig. 4) suggested that the two versions were not orthologous. Therefore, we designated our sequences as *G3pdh_{NA}* and the previously published sequences as *G3pdh_{NASA}*. Using GenBank sequences of *G3pdh_{NASA}* from *Manihot*, we designed two specific primers using the program Primer3 v. 0.4.0 (Koressaar and Remm, 2007; Untergasser et al., 2012). These primers (*GPDXTFSpe*: 5'-AAGCITAGAACACAAGT-3', *GPDXYRSppe*: 5'-CATTCTGCTGTGATCCCC-3') allowed us to obtain sequences of *G3pdh_{NASA}* for most North American samples. For the second separate analysis of *G3pdh_{NA}*, the *G3pdh_{NASA}* sequences were analyzed separately.

In addition to allowing us to observe which clades were recovered by each of the five markers, separate analyses of *PEPC* and *G3pdh_{NA}* allowed us to determine how to treat the clones from species of the ingroup in further analyses. On the basis of these analyses, we constructed a consensus sequence for each species whenever the clones grouped with the others from their own species or did not group with any other clone. Therefore, we included in subsequent analyses consensus sequences of all the clones of the nuclear markers, with the exception of three clones of *PEPC* from two species of the ingroup (online Appendix S5; alignment available at <http://purl.org/phylo/treebase/phyloids/study/TB2:S16916>). We deleted these clones because they grouped with clones from a member of the outgroup and they were so different from the other clones from their own species that it would

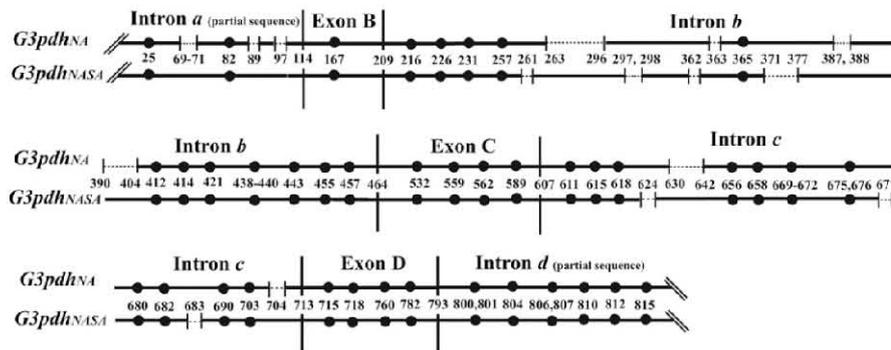


Fig. 4. Map depicting the differences between a version of *G3pdh* exclusively sequenced in North American species of *Manihot* (*G3pdh_{NA}*) and a version of this gene sequenced in North and South American species (*G3pdh_{NASA}*). Black circles represent positions with only two character states, one shared by all sequences of *G3pdh_{NA}*, and the second by all the sequences of *G3pdh_{NASA}*. Dashed lines represent bases or fragments absent in one of the versions of *G3pdh*. Names of exons and introns follow Olsen and Schaal (1999).

have been impossible to construct a consensus without having many uncertain character states. For South American clones, we constructed consensus sequences for each species, provided they were similar enough not to generate consensus sequences with many ambiguous characters. Summarizing the variation in South American species in this way would not affect our conclusions because the South American species were used only to test North American species monophyly, not to infer South American species phylogeny.

Before each Bayesian analysis, we identified the models that best fit the data for each of the five markers using the Akaike information criterion (Akaike, 1974) in the program jModeltest 0.1.1 (Posada, 2008). Preliminary trials indicated that a heating parameter of 0.05 and runs of 20 million generations allowed optimal exchange among chains and acceptably low standard deviations.

For concatenated analyses, we joined our sequences with those of Chacón et al. (2008) and Duputié et al. (2011). We carried out several preliminary trials to identify the parameters that would produce acceptably low standard deviations and proper exchange levels among chains. To find these values, as well as the number of generations to include in the burn-in during the final analyses, we examined the results using the program Tracer v1.6 (Rambaut et al., 2014). Based on these preliminary tests, we carried out a final analysis of 240 million generations using six chains, 100 swaps among chains per generation, a heating parameter of 0.03, and a burn-in of 60 million generations. After discarding the topologies included in the burn-in, we constructed a consensus for each search with the remaining trees.

Maximum likelihood analyses—We carried out maximum likelihood analyses (Felsenstein, 1973) of the concatenated matrix of all markers using the program RAxML BlackBox 8.0.24 (Stamatakis et al., 2008; Stamatakis, 2014) as implemented in the CIPRES Science Gateway. We specified one partition for each marker and used GTR + Γ , as suggested by Stamatakis et al. (2008). We recovered slightly differing topologies depending on which species of *Cnidocolus* was used as outgroup. Therefore, we ran three trials using three different sequences of addition of the species of *Cnidocolus* and a randomly selected seed number. To estimate clade support, we ran rapid bootstrap replicates allowing RAxML to stop bootstrapping automatically (Pattengale et al., 2010). We compared the topologies with highest scores produced by the three different sequences of addition of *Cnidocolus*.

Growth habit evolution—As compared with the often plastic growth habits exhibited by South American species, North American *Manihot* species are readily distinguished from one another morphologically (Rogers and Appan, 1973), and they can be clearly divided into five growth habit categories (Figs. 1, 2). The single liana species has nonself-supporting stems, commonly exceeding 10 m in length, but usually less than 5 cm in diameter. Herbs are very short plants, less than a meter tall, with annual stems and massive tuberous roots. Shrubs are short plants, rarely over 3 m, lacking distinct trunks and branched from the base. Branches rarely exceed 5 cm in diameter. Adult shrubs have tuberous roots. Treelets are short plants, rarely exceeding 3 m, with distinct trunks sparingly branched well above the base and basal diameters seldom over 5 cm. Adult treelets have tuberous roots. Finally, trees are tall plants, reaching 5 m or more, with distinct trunks that branch well above the base and commonly exceed 10 cm in basal diameter. Adult trees have fibrous roots. To infer the

number of times these growth habits likely evolved in the North American species of *Manihot*, we mapped this character onto the topology obtained with the Bayesian and maximum likelihood analyses of the concatenated matrix. For mapping growth habit, we carried out a maximum likelihood optimization using a Markov model with one parameter (Mk1) (Lewis, 2001) in the program Mesquite v. 2.75 (Maddison and Maddison, 2011).

RESULTS

We sequenced *psbA-trnH*, *trnL-trnF*, *PEPC*, and *G3pdh_{NA}* for all North American species, and *G3pdh_{NASA}* sequences for 16 (Appendix S1). For a molecular sampling as complete as possible, we added to the alignment of three of the four species for which we were not able to obtain *G3pdh_{NASA}* (*M. angustiloba*, *M. michaelis*, and *M. oaxacana*) the sequences of Duputié et al. (2011). The final matrix included the sequences of five markers for 19 terminals, four markers for four terminals, two markers for 23 terminals, and one marker for 12 (alignment available at <http://purl.org/phylo/treebase/phyloWS/study/TB2:S16916>). There were great differences in sequence length between the outgroup and the North American *Manihot* species. However, the segments shared by all the sequences were very similar, so it was possible to align them unambiguously. The only exceptions were *trnL-trnF* and *PEPC*, which had segments ambiguously aligned of 19 and 30 bp, respectively, which were not included in the analyses.

As reported for other taxa (Wolfe et al., 1987; Clegg et al., 1994), individual plastid markers had fewer point mutations per unit length than did the individual nuclear markers. The lengths of the five individual matrices and the single concatenated matrix, the number of species included within each of them, their numbers of variable sites, and the descriptive statistics for each phylogenetic method are shown in Table 1. Recovery of clades in separate gene analyses helped to identify the few clades that were recovered by more than one marker (Appendix S6).

Two of the three nuclear markers, *PEPC* and *G3pdh_{NA}*, had more than one copy per species.

Possible incomplete lineage sorting or hybridization in North American species—Separate analyses of these loci provided evidence consistent with incomplete lineage sorting or hybridization in North American *Manihot* species. We found that some clones from several species did not coalesce with one

TABLE 1. Features of separate and concatenated matrices, as well as statistics of each phylogenetic method. I: First separate analysis. II: Second separate analysis.

Feature	Chloroplast		Nucleus			Concatenated matrix
	<i>psbA-trnH</i>	<i>trnL-trnF</i>	<i>PEPC</i>	<i>G3pdh_{NA}</i>	<i>G3pdh_{NASA}</i>	
Matrix						
Length (bp)	863	1034	I: 455 II: 451	I: 816 II: 646	668	3662
Number of taxa	23	44	I: 33 II: 24	I: 81 II: 20	54	58
Informative characters	17 (1.96%)	16 (1.55%)	I: 36 (7.91%) II: 22 (4.88%)	I: 154 (18.87%) II: 14 (2.17%)	53 (7.93%)	123
Outgroup	<i>Cnidioscolus egregius</i>	<i>C. tubulosus</i>	<i>C. egregius</i>	<i>M. aesculifolia</i>	<i>C. urens</i>	<i>C. urens</i>
Bayesian analyses						
Model selected	TPM1uf+Γ	TrN+ Γ	I: TIM2 + Γ II: TIM2 + I	I: HKY+I II: HKY	TIM1+I	One model for each partition
Average SD	0.001820	0.002090	I: 0.001392 II: 0.001268	I: 0.001482 II: 0.000765	0.001458	0.000817
ML analyses						
ML scores	—	—	—	—	—	-8407.987831

Note: ML = maximum likelihood.

another, grouping instead with clones from other species. *PEPC* clones that made up clades with *PEPC* clones from other species were found in 20% of the North American taxa, whereas *G3pdh_{NA}* clones that made up clades with clones from other species were found in 30% of them. Some of the clades recovered by the second analyses of *PEPC* and *G3pdh_{NA}* were identical to those in the concatenated analyses (e.g., both markers recovered the clade *M. angustiloba*-*M. davisiae* and clade A) (Figs. 5, 6; Appendices S6, S8) or very similar to them (e.g., a clade similar to B was recovered both by *PEPC* and *G3pdh_{NA}*; *PEPC* recovered a polytomy made up of *M. mcvaughii*, *M. michaelis*, and *M. tomatophylla*; and *G3pdh_{NA}* recovered a clade including four species from clade C). These findings suggest that these markers are evolving congruently with the species phylogeny. Other clades recovered by the second analyses of *PEPC* and *G3pdh_{NA}* were not recovered in any other analysis, suggesting that the species making up such clades have gone through interspecific hybridization or, alternatively, through duplication events of this marker followed by subsequent episodes of lineage sorting. The results of the *G3pdh_{NA}* separate analysis of all North and South American sequences suggested that *G3pdh_{NA}* and *G3pdh_{NASA}* are not orthologous (see Materials and Methods and Appendix S4). Our 34 *G3pdh_{NA}* sequences made up a clade (PP = 1.00) separated by a long branch from a clade made up of the South and North American *G3pdh_{NASA}* sequences of Chacón et al. (2008) and Duputié et al. (2011).

Final concatenated analyses and evolutionary questions—

The concatenated analyses carried out with the two phylogenetic methods recovered very similar topologies (Figs. 5, 6; Appendices S7, S8). However, the support values of clades recovered using maximum likelihood were low. This seems to imply that most clades were supported by relatively few characters. Additionally, maximum likelihood analyses (hereafter MLA) failed to recover the genus *Manihot* as monophyletic with respect to *Cnidioscolus*, with two species of *Cnidioscolus* mingling with South American species of *Manihot*. This result was probably due to the fact that we were able to sequence only two markers for *C. egregius* and had only one marker for each of the remaining species of *Cnidioscolus*. The incomplete molecular sampling for these three species could have led to their unstable positions.

Both Bayesian analysis (hereafter BA) and MLA suggested that North American *Manihot* species together make up a monophyletic group (BSML = 36%, PP = 0.81). Results from the two phylogenetic methods agreed on the nonmonophyly of North American *Manihot* sections. Members of section *Foetidae*, section *Parvibracteatae*, and *Manihotoides pauciflora* intermingled in all analyses. Both BA and MLA indicated convergent evolution in habit in North American *Manihot* species (Fig. 6; Appendix S8). There are herbs in two clades, treelets in three clades, and trees and shrubs in two (BA) to four and five clades (MLA), respectively. Although the growth forms of many ancestral nodes were ambiguous, the growth forms with the highest likelihoods at most of them were the shrubby (BA) or tree habits (BA and MLA). This suggests that herbs likely arose two (BA), three (MLA), or even four (BA) times, treelets between three (BA, MLA) and four (BA) times, trees between one (BA, MLA) and three (BA) times, and shrubs two (BA), five (BA), or six (MLA) times, with the lianescent growth having arisen in *M. chlorosticta* (BA and MLA). Thus, despite evidence of lineage sorting and the low support values of several clades, the resolution recovered in our analyses allowed us to address the main objectives of our study.

DISCUSSION

North American *Manihot* monophyly—Our study addressed the issue of whether North American *Manihot* species make up a distinct clade within this large neotropical genus. Although most authors have suggested that North American species form a clade (Bertram, 1993; Schaal et al., 2006; Chacón et al., 2008), others have suggested that North American species make up a grade basal to the South American ones (Duputié et al., 2011). However, all previous studies were based on incomplete sampling of North American *Manihot* species and on three loci at most (Chacón et al., 2008; Duputié et al., 2011). The current study was based on four to five molecular regions for all the North American *Manihot* species, as well as including an extensive representation of potentially closely related species. Our results suggested that North American species make up a single clade (Bertram, 1993; Schaal et al., 2006; Chacón et al., 2008).

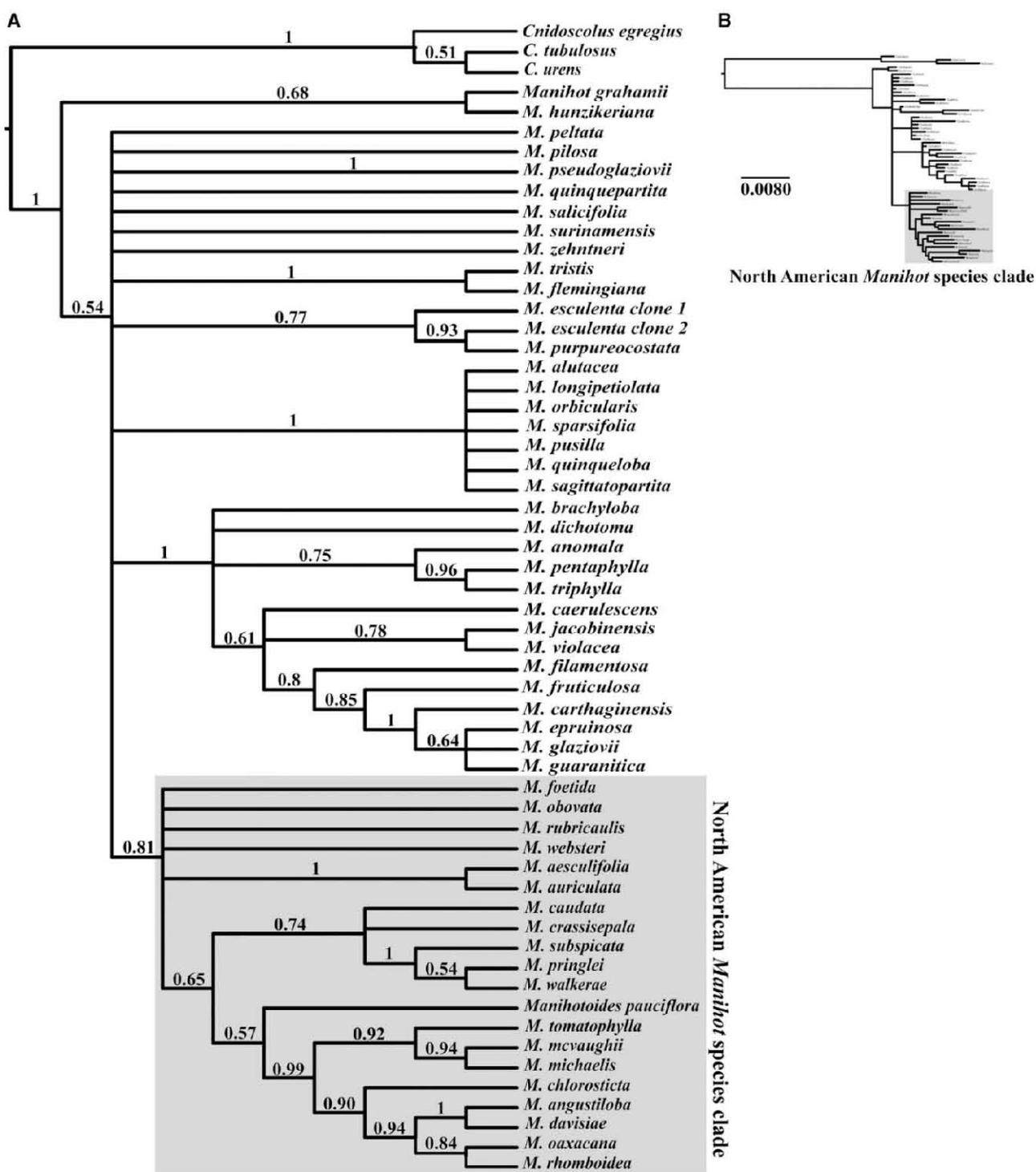


Fig. 5. Bayesian 50% majority rule consensus tree showing the relationships among all North American *Manihot* species and a selected group of South American species encompassing all growth forms and the entire geographical range of the South American species. The phylogeny is based on sequences of two plastid markers (*psbA-trnH* and *trnL-trnF*), and three nuclear markers (*PEPC*, *G3pdh_{NA}*, and *G3pdh_{NASA}*). Posterior probabilities are shown above the branches. (A) Consensus tree showing the relationships among species. (B) Reduced consensus tree showing the branch lengths.

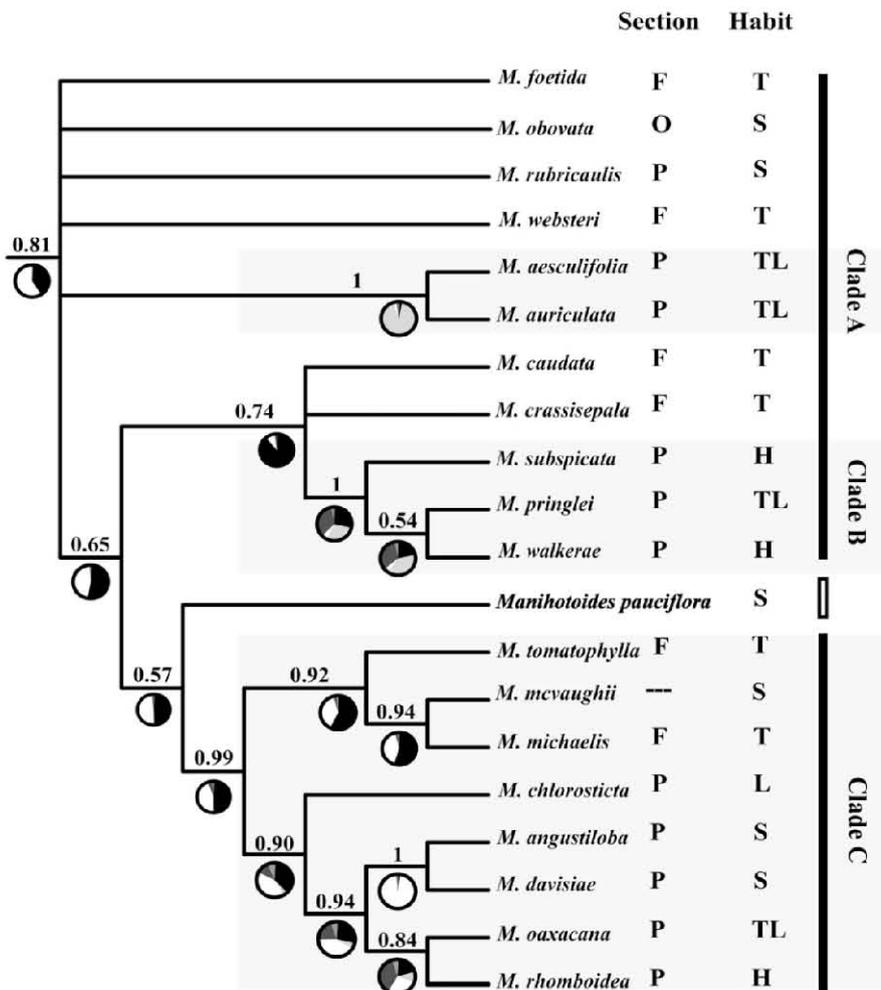


Fig. 6. Habit and sectional affinity of the North American *Manihot* clade mapped onto the topology recovered using Bayesian inference, showing that sectional classification is not based on monophyletic groups and that the habit categories that they are in part based on are highly homoplasious. The tree summarizes the phylogeny in Fig. 5. Clades A, B, and C are those recovered both by Bayesian and maximum likelihood analyses. Posterior probabilities are shown above the branches. Maximum likelihood growth form mapping for the North American species is shown below the branches. Liana: medium gray, herb: dark gray, shrub: white, treelet: light gray, tree: black. P = section *Parvibracteatae*, F = section *Foetidae*, O = section *Obovatae*. T = tree, TL = treelet, S = shrub, H = herb, L = liana. *Manihotoides pauciflora* falls within the North American *Manihot* species clade.

Our results also seem to cast some light on the debated relationship between North American species and *M. esculenta*. None of the concatenated phylogenetic analyses we carried out suggested a close relationship between *M. esculenta* subsp. *esculenta* and any North American species (Fig. 5; Appendix S7). Therefore, our results agree with previously published results that suggested that North American and Mesoamerican *Manihot* are only distantly related to the cultivated manioc and were not involved in its domestication (Olsen and Schaal, 1999, 2001; Chacón et al., 2008; Léotard et al., 2009).

Supraspecific classification of North American *Manihot* species—Our phylogenetic analyses, based on a complete sampling of North American species, suggested that sections *Foetidae* and *Parvibracteatae* are not monophyletic, and, therefore that the morphological characters they are based on (the

size of individual plants, fruits, and seeds) are likely homoplasious. Even without perfectly resolved phylogenetic hypotheses, we can identify numerous instances of members of the two sections making up clades. For example, clade C recovered by BA and MLA (Fig. 6; Appendix S8) was made up of members from sections *Foetidae* and *Parvibracteatae*. These sections are delimited based on features that are positively related with plant stature. Our results would make it seem that the sections of Rogers and Appan (1973) simply reflect plant size, with section *Foetidae* including the largest species, and section *Parvibracteatae* including medium to small ones. These apparently frequent changes in size in North American *Manihot* species also seem to be accompanied by frequent shifts in growth form.

Growth form evolution—Although not completely congruent regarding the phylogenetic relationships recovered, our

results helped to assess whether each growth form in *Manihot* originated only a single time before speciation or originated multiple times, as in *Anolis* (Losos, 2001). If each growth form evolved only once, we would have obtained topologies with clades made up of species sharing the same growth form. Given that all our analyses recovered clades made up of species with different growth forms, our results provide evidence that each growth form evolved more than once in the North American clade.

Of these likely independent origins of growth forms, the similarity between *Manihot crassisepala* and *M. foetida* is particularly striking. *M. crassisepala* is known from only a few populations in a small, remote area of the western Balsas Depression, whereas *M. foetida* lacks known wild populations but is a part of traditional horticulture in the northern central Balsas, where it is used in living fences. This species pair is apparently morphologically identical except for ovary pubescence. That *M. foetida* grows exclusively in human settlements and *M. crassisepala* in the wild and that both species are so similar morphologically made us think that *M. foetida* was probably domesticated from *M. crassisepala*. Given this scenario, we expected to recover these two species as closely related. However, these taxa were not recovered as sister species in any of our analyses, implying that these species evolved their similar morphologies independently. There is no information regarding the original wild range of *M. foetida*. Therefore, not only the relationship between these two species demands further clarification, but also the history of domestication of *M. foetida*.

Growth form is intimately associated with environmental conditions. One of the most important adversities that plants of the dry tropics have to face is the scarcity of water during much of the year. In the North American clade of *Manihot*, larger species seem to live in areas with greater moisture availability, but in general the selective factors that favor different life forms are not clear. Tuberos roots in *Manihot* have been interpreted not only as water storage adaptations, but also as adaptations to disturbance, allowing to the plants to resprout after fire (Duputié et al., 2011). However, fire is absent from most Mexican *Manihot* habitats, in contrast to the Brazilian cerrado, where many species occur. Therefore, the environmental conditions favoring the development of tuberos roots in the North American species of *Manihot* remain to be investigated.

Positions of new North American *Manihot* species and taxonomic status of *Manihotoides pauciflora*—Our results help place the recently described species *M. mcvaughii*, while the position of *M. obovata* remains ambiguous. *Manihot mcvaughii* was recovered as a member of clade C, both by BA and MLA. In the case of *M. obovata*, while BA did not associate this species with any other, in MLA this species was recovered as sister to *M. foetida* with low support (BSML = 32%; Appendix S8).

Our phylogenetic analyses suggested, even if they were not congruent on the exact position of *Manihotoides*, that the genus should not be recognized and *Manihotoides pauciflora* should remain synonymized with *Manihot* (i.e., Webster, 1994, 2014; Radcliffe-Smith, 2001; Martínez-Gordillo et al., 2002). In all our separate and concatenated analyses, *M. pauciflora* was nested within the North American clade. Our results also suggested that the unusual features of *Manihotoides* (Rogers and Appan, 1973) are examples of the morphological lability in *Manihot*. *Manihotoides pauciflora* shares with *Manihot mcvaughii* and *M. obovata* reduced inflorescences (Martínez-Gordillo

et al., 2002; Steinmann, 2005), and with *M. obovata* the presence of leaves clustered on short shoots (Martínez-Gordillo et al., 2002; Webster, 1994). None of our concatenated analyses indicated that *M. mcvaughii*, *M. obovata*, or *Manihotoides pauciflora* are closely related, implying that condensed stems and uniflorous inflorescences might have evolved at least twice. Furthermore, these results add support to the hypothesis that these features have evolved in response to arid environments (Steinmann, 2005) given that these three unrelated species are located in some of the driest areas of occurrence of *Manihot* in Mexico, which also have the highest minimum temperatures. This association might imply that the evolution of stature is influenced by water availability, with larger plants being favored in areas where drought is less severe (Moles et al., 2009). Additionally, while *M. mcvaughii*, *M. obovata*, or *Manihotoides pauciflora* have short shoots, the shrub species that reach into the northern desert areas (*Manihot angustiloba*, *M. davisiae*, and *M. rubricaulis*, all of them occurring in northwestern Mexico) do not have condensed stems. This suggests that the capacity to leaf out from existing stems is favored only in areas that are not subject to frost, whereas in arid areas where stems are subject to freezing, leaf area is increased only from apical and not axial meristems.

Incomplete lineage sorting and molecular polymorphisms in North American *Manihot* species—As the distribution of *PEPC* and *G3pdh_{NA}* haplotypes seemed to suggest, North American *Manihot* species have either undergone lineage sorting or frequent hybridization. Sequences often showed patterns of coalescence that were incongruent with species boundaries, rather than consistent patterns of reciprocal monophyly between species. Given that incomplete lineage sorting has also been detected for South American species (Olsen and Schaal, 2001; Duputié et al., 2011), this phenomenon, rather than hybridization, would seem to be the more likely alternative to explain the distribution of haplotypic diversity across the clade. However, in the absence of enough information on the reproductive biology of *Manihot*, the possibility that the hybridization between species has caused this pattern, at least partially, cannot be ruled out.

Conclusions—Based on a taxonomic sampling including all North American *Manihot* species and *Manihotoides pauciflora*, and a molecular sampling of two chloroplast and three nuclear marker sequences, we have assembled the most complete phylogenetic hypothesis of North American *Manihot* to date, using Bayesian and maximum likelihood analyses. Our concatenated analyses suggested that the group of North American species of *Manihot* is monophyletic.

Our results consistently suggested that accepting the current supraspecific classification of *Manihot* would require recognizing paraphyletic groups. Our concatenated analyses recovered clades made up of members of both sections *Foetidae* and *Parvibracteatae*, so these sections are best eliminated. In the case of section *Obovatae*, our analyses did not provide any conclusive result regarding its position. In contrast, our analyses consistently recovered *Manihotoides pauciflora* as nested within the North American *Manihot* clade. Therefore, *Manihotoides* should remain synonymized with *Manihot* to avoid a paraphyletic *Manihot*.

Illustrating the morphological lability of North American *Manihot* species, most of our results suggested that trees, treelets, shrubs, and herbs have evolved repeatedly in this genus. Rather than grouping by growth form, North American *Manihot* species form species assemblages mainly based on their geographical distribution, with several of the most strongly supported clades including species whose ranges are close or overlapping (e.g., the *M. angustiloba*-*M. davisiae* and *M. aesculifolia*-*M. auriculata* clades) and that often differ in growth form (e.g., members of clade B and some members of clade C) (Fig. 6; Appendix S8).

Finally, even though North American species of *Manihot* have clearer morphological boundaries than South American ones, the interspecific distribution of nuclear haplotypes in the North American clade suggested that they have undergone widespread incomplete lineage sorting, just as has been reported for the South American species (Olsen and Schaal, 2001; Duputié et al., 2011).

LITERATURE CITED

- AKAIKE, H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* 19: 716–723.
- BAKER, W. J., J. DRANSFIELD, AND T. A. HEDDERSON. 2000. Phylogeny, character evolution and a new classification of the calamoid palms. *Systematic Botany* 25: 297–322.
- BERTRAM, R. B. 1993. Application of molecular techniques to genetic resources of cassava (*Manihot esculenta* Crantz, Euphorbiaceae): Interspecific evolutionary relationships and intraspecific characterization. Ph.D. dissertation, University of Maryland, College Park, Maryland, USA.
- BRANDEGEE, T. S. 1910. *Plantae Mexicanae Purpusianae*. *University of California Publications in Botany* 4: 85–96.
- CHACÓN, J., S. MADRIÑAN, D. DEBOUCK, F. RODRÍGUEZ, AND J. TOHME. 2008. Phylogenetic patterns in the genus *Manihot* (Euphorbiaceae) inferred from analyses of nuclear and chloroplast DNA regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 260–267.
- CLEGG, M. T., B. S. GAUT, G. H. LEARN JR., AND B. R. MORTON. 1994. Rates and patterns of chloroplast DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 91: 6795–6801.
- DUPUTIÉ, A., J. SALICK, AND D. MCKEY. 2011. Evolutionary biogeography of *Manihot* (Euphorbiaceae), a rapidly radiating Neotropical genus restricted to dry environments. *Journal of Biogeography* 38: 1033–1043.
- EDWARDS, E. J., R. NYFFELER, AND M. J. DONOGHUE. 2005. Basal cactus phylogeny: Implications of *Pereskia* (Cactaceae) paraphyly for the transition to the cactus life form. *American Journal of Botany* 92: 1177–1188.
- FELSENSTEIN, J. 1973. Maximum likelihood and minimum-steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. *Systematic Zoology* 22: 240–249.
- FREGENE, M. A., J. VARGAS, J. IKEA, F. ANGEL, J. TOHME, R. A. ASIEDU, M. O. AKORODA, AND W. M. ROCA. 1994. Variability of chloroplast DNA and nuclear ribosomal DNA in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) and its wild relatives. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 719–727.
- HALL, T. A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95–98.
- HEARN, D. J. 2006. *Adenia* (Passifloraceae) and its adaptive radiation: Phylogeny and growth form diversification. *Systematic Botany* 31: 805–821.
- HUELSENBECK, J. P., AND F. RONQUIST. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- JIMÉNEZ-RAMÍREZ, J. 1990. Una nueva sección y una especie nueva de *Manihot* (Euphorbiaceae) de México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, serie botánica* 60: 49–53.
- KORESSAAR, T., AND M. REMM. 2007. Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23: 1289–1291.
- LARKIN, M. A., G. BLACKSHIELDS, N. P. BROWN, R. CHENNA, P. A. MCGETTIGAN, H. MCWILLIAM, F. VALENTIN, ET AL. 2007. Clustal W and Clustal X version 2. *Bioinformatics* 23: 2947–2948.
- LOFARD, G., A. DUPUTIÉ, F. KILLBERG, E. J. P. DOUZERY, C. DEBAIN, J. J. DE GRANVILLE, AND D. MCKEY. 2009. Phylogeography and the origin of cassava: New insights from the northern rim of the Amazonian basin. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 53: 329–334.
- LEWIS, P. O. 2001. A likelihood approach to estimating phylogeny from discrete morphological character data. *Systematic Biology* 50: 913–925.
- LOSOS, J. B. 2001. Evolution: A lizard's tale. *Scientific American* 284: 64–69.
- MADDISON, W. P., AND D. R. MADDISON. 2011. Mesquite: A modular system for evolutionary analysis, v. 2.75. Computer program and documentation distributed by the author, website <http://mesquiteproject.org> [accessed 1 August 2014].
- MARTÍNEZ-GORDILLO, M., J. JIMÉNEZ-RAMÍREZ, R. CRUZ-DURÁN, E. JUÁREZ-ARRIAGA, R. GARCÍA, A. CERVANTES, AND M. MEJÍA-HERNÁNDEZ. 2002. Los géneros de la familia Euphorbiaceae en México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, serie botánica* 73: 155–281.
- MILLER, K. I., AND G. L. WEBSTER. 1962. Systematic position of *Cnidoscolus* and *Jatropha*. *Brittonia* 14: 174–180.
- MILLER, M. A., W. PFEIFFER, AND T. SCHWARTZ. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)* in New Orleans, Louisiana, 2010, 1–8. Available at http://www.nbgw.org/ee/index.php/portal/cite_us
- MOLES, A. T., D. I. WARTON, L. WARMAN, N. G. SWENSON, S. W. LAFFAN, A. E. ZANNE, A. PITMAN, ET AL. 2009. Global patterns in plant height. *Journal of Ecology* 97: 923–932.
- MÖLLER, M., AND Q. C. B. CRONK. 2001. Evolution of morphological novelty: A phylogenetic analysis of growth patterns in *Sireptocarpus* (Gesneriaceae). *Evolution* 55: 918–929.
- MORRONE, J. J. 2005. Hacia una síntesis biogeográfica de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 76: 207–252.
- MORRONE, J. J. 2006. Biogeographic areas and transition zones of Latin America and the Caribbean islands based on panbiogeographic and cladistic analyses of the entomofauna. *Annual Review of Entomology* 51: 467–494.
- OLSEN, K. M., AND B. A. SCHAAL. 1999. Evidence on the origin of cassava: Phylogeography of *Manihot esculenta*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 96: 5586–5591.
- OLSEN, K. M., AND B. A. SCHAAL. 2001. Microsatellite variation in cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) and its wild relatives: Further evidence for a southern Amazonian origin of domestication. *American Journal of Botany* 88: 131–142.
- OLSON, M. E. 2002. Combining data from DNA sequences and morphology for a phylogeny of Moringaceae (Brassicales). *Systematic Botany* 27: 55–73.
- ØSTBYE, K., A. AMUNDSEN, L. BERNATCHEZ, A. KLEMETSEN, R. KNUDSEN, R. KRISTOFFERSEN, T. F. NÆSJE, AND K. HINDAR. 2006. Parallel evolution of ecomorphological traits in the European whitefish *Coregonus lavaretus* (L.) species complex during postglacial times. *Molecular Ecology* 15: 3983–4001.
- ØSTBYE, K., T. BERNATCHEZ, T. F. NÆSJE, K. J. HIMBERG, AND K. HINDAR. 2005. Evolutionary history of the European whitelish *Coregonus lavaretus* (L.) species complex as inferred from the mtDNA phylogeography and gill-raker numbers. *Molecular Ecology* 14: 4371–4387.
- PATTENGALE, N. D., M. ALIPOUR, O. R. BININDA-EMONDS, B. M. MORET, AND A. STAMATAKIS. 2010. How many bootstrap replicates are necessary? *Journal of Computational Biology* 17: 337–354.
- PERRET, M., A. CHAUTEAIS, R. SPICIGER, G. KITE, AND V. SAVOLAINEN. 2003. Systematics and evolution of tribe Sinningieae (Gesneriaceae): Evidence from phylogenetic analyses of six plastid DNA regions and nuclear *NCPGS*. *American Journal of Botany* 90: 445–460.
- POSADA, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253–1256.
- RADCLIFFE-SMITII, A. 2001. *Genera Euphorbiacearum*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.

- RAMBAUT, A. 2002. Se-AI v. 2.0a11: Sequence alignment program. Computer program and documentation distributed by the author, website <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/seal/> [accessed July 2005].
- RAMBAUT, A., M. A. SUCHARD, D. XIE, AND A. J. DRUMMOND. 2014. Tracer v1.6, Computer program and documentation distributed by the author, website <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> [accessed 27 July 2014].
- REINTHAL, P. N., AND A. MEYER. 1997. Molecular phylogenetic tests of speciation models in lake Malawi cichlid fishes. In T. J. Givnish and K. J. Systma [eds.], *Molecular evolution and adaptive radiation*, 375–390. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- RENOUVOISE, B. S. 1972. The area of origin of *Manihot esculenta* as a crop plant—a review of the evidence. *Economic Botany* 26: 352–360.
- ROA, A. C., M. M. MAYA, M. C. DUQUE, J. TOHME, A. C. ALLEM, AND M. W. BONIFERALE. 1997. AFLP analysis of relationships among cassava and other *Manihot* species. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 741–750.
- ROGERS, D. J. 1965. Some botanical and ethnological considerations of *Manihot esculenta*. *Economic Botany* 19: 369–377.
- ROGERS, D. J., AND S. G. APPAN. 1973. *Manihot* and *Manihotoides* (Euphorbiaceae). Flora neotropica, monograph 13. Hafner, New York, New York, USA.
- SANG, T., D. J. CRAWFORD, AND T. F. STUESSY. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany* 84: 1120–1136.
- SCHAAL, B. A., K. M. OLSEN, AND L. J. C. B. CARVALHO. 2006. Evolution, domestication, and agrobiodiversity in the tropical crop cassava. In T. J. Motley, N. Zerega, and H. Cross [eds.], *Darwin's harvest: New approaches to the origins, evolution and conservation of crops*, 269–284. Columbia University Press, New York, New York, USA.
- STAMATAKIS, A. 2014. RAxML Version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30: 1312–1313.
- STAMATAKIS, A., P. HOOVER, AND J. ROUGEMONT. 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web servers. *Systematic Biology* 57: 758–771.
- STEINMANN, V. W. 2005. New Euphorbiaceae from Mexico II. *Contributions from the University of Michigan Herbarium* 24: 173–187.
- STRAND, A. E., J. LEEBENS-MACK, AND B. G. MILLIGAN. 1997. Nuclear DNA-based marker for plant evolutionary biology. *Molecular Ecology* 6: 113–118.
- TABERLET, P., L. GIELLY, G. PAUTOU, AND J. BOUVET. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109.
- TURGEON, J., AND L. BERNATCHEZ. 2003. Reticulate evolution and phenotypic diversity in North American ciscoes, *Coregonus* ssp. (Teleostei: Salmonidae): Implications for the conservation of an evolutionary legacy. *Conservation Genetics* 4: 67–81.
- UNTERGASSER, A., I. CUTCIACHE, T. KORLSSAAR, J. YE, B. C. FAIRCLOTH, M. REMM, AND S. G. ROZEN. 2012. Primer3—New capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research* 40: e115.
- WEBSTER, G. L. 1994. Synopsis of the genera and suprageneric taxa of Euphorbiaceae. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 81: 33–144.
- WEBSTER, G. L. 2014. Euphorbiaceae. In K. Kubitzki [ed.], *The families and genera of vascular plants*, vol. 11, Flowering plants, Eudicotis, Malpighiales, 51–216. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, Germany.
- WOLFE, K. H., W.-H. LI, AND P. M. SHARP. 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 84: 9054–9058.
- WURDACK, K. J., P. HOFFMANN, AND M. W. CHASE. 2005. Molecular phylogenetic analysis of uniovulate Euphorbiaceae (Euphorbiaceae sensu stricto) using plastid *rbcL* and *trnL-F* DNA sequences. *American Journal of Botany* 92: 1397–1420.
- YANG, Z., AND B. RANNALA. 1997. Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: A Markov chain Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution* 14: 717–724.

APPENDIX 1. Voucher and sequence information for the species collected and sequenced by the authors of this paper, as well as accession numbers of the sequences from Chacón et al. (2008) and Duputié et al. (2011) employed in this study. All vouchers collected by the authors of this paper and *M. auriculata* are deposited at the Herbario Nacional de México (MEXU). ACA: María-Angélica Cervantes-Alcayde.

Taxon, voucher, Locality, locality, GenBank accession numbers: ^(a) *psbA-trnH*, ^(b) *trnL-trnF*, ^(c) *PEPC*, ^(d) *G3pdh_{NIA}*, ^(e) *G3pdh_{NASA}*.

Ingroup: *Manihot aesculifolia*, ACA 31, México: Michoacán, KP692091 ^a, KP691988 ^b, KP692008 ^c, KP692041 ^d, KP692075 ^e, EU518807 ^e, FN551748 ^e, FN551744 ^e. *Manihot angustiloba*, ACA 49, México: Sinaloa, KP692092 ^a, KP691989 ^b, KP692009 ^c, KP692042 ^d, KP692043 ^d, KP692044 ^d, FN551745 ^e, FN551751 ^e. *Manihot auriculata*, MELR 3408, México: Nayarit, KP692093 ^a, KP691990 ^b, KP692010 ^c, KP692045 ^d, KP692076 ^e. *Manihot caudata*, ACA 23, México: Michoacán, KP692094 ^a, KP691991 ^b, KP692011 ^c, KP692046 ^d, KP692047 ^d, KP692048 ^d, KP692077 ^e, FN551746 ^e. *Manihot chlorosticta*, ACA 29, México: Colima, KP692095 ^a, KP691992 ^b, KP692012 ^c, KP692049 ^d, KP692078 ^e, EU518814 ^e, FN551743 ^e. *Manihot crassisejala*, ACA 37, México: Michoacán, KP692096 ^a, KP691993 ^b, KP692013 ^c, KP692050 ^d, KP692051 ^d, KP692052 ^d, KP692079 ^e. *Manihot davisiae*, ACA 50, México: Sinaloa, KP692097 ^a, KP691994 ^b, KP692014 ^c, KP692053 ^d, KP692054 ^d, KP692055 ^d. *Manihot foetida*, ACA 1, México: Morelos, KP692098 ^a, KP691995 ^b, KP692015 ^c, KP692016 ^c, KP692056 ^d, KP692057 ^d, KP692058 ^d, KP692080 ^e. *Manihot mcvaughii*, ACA 35, México: Michoacán, KP692099 ^a, KP691996 ^b, KP692017 ^c, KP692059 ^d, KP692060 ^d, KP692081 ^e. *Manihot michaelis*, ACA 25, México: Colima, KP692100 ^a, KP691997 ^b, KP692018 ^c, KP692019 ^c, KP692061 ^d, FN551742 ^e. *Manihot oaxacana*, Olson 1116, México: Oaxaca, KP692101 ^a, KP691998 ^b, KP692020 ^c, KP692062 ^d, FN551739 ^e. *Manihot obovata*, ACA 8, México: Guerrero, KP692102 ^a, KP691999 ^b, KP692021 ^c, KP692063 ^d, KP692082 ^e. *Manihotoides pauciflora*, ACA 20, México: Puebla, KP692103 ^a, KP692000 ^b, KP692022 ^c, KP692064 ^d, KP692065 ^d, KP692083 ^e. *Manihot pringlei*, ACA 42, México: Tamaulipas, KP692104 ^a, KP692001 ^b, KP692023 ^c, KP692024 ^c, KP692025 ^c, KP692066 ^d, KP692084 ^e. *Manihot rhomboidea*, ACA 26, México: Colima, KP692105 ^a, KP692002 ^b, KP692026 ^c, KP692027 ^c, KP692028 ^c, KP692067 ^d, KP692068 ^d, KP692069 ^d, KP692085 ^e. *Manihot rubricaulis*, ACA 46, México: Durango, KP692106 ^a, KP692003 ^b, KP692029 ^c, KP692069 ^d, KP692070 ^d, KP692086 ^e, EU518831 ^e. *Manihot subspicata*, ACA 40, México: Nuevo León, KP692107 ^a, KP692004 ^b, KP692030 ^c, KP692031 ^c, KP692071 ^d, KP692087 ^e, FN551871 ^e. *Manihot tomatophylla*, ACA 34, México: Michoacán, KP692108 ^a, KP692005 ^b, KP692032 ^c, KP692033 ^c, KP692072 ^d, KP692088 ^e, FN551747 ^e. *Manihot walkerae*, KP692109 ^a, KP692006 ^b, KP692034 ^c, KP692073 ^d, KP692089 ^e. *Manihot websteri*, ACA 17, México: Puebla, KP692110 ^a, KP692007 ^b, KP692035 ^c, KP692074 ^d, KP692090 ^e, FN551740 ^e. Outgroups- *Cnidoscolus egregius*, ACA 19, México: Oaxaca, KP692113 ^a, KP692040 ^b. *Cnidoscolus tubulosus*, EU518895 ^b. *Cnidoscolus urens*, FN551736 ^e. *Manihot alutacea*, EU518897 ^b, EU518808 ^e. *Manihot anomala*, EU518898 ^b, EU518809 ^e. *Manihot brachyloba*, KP692111 ^a, EU518899 ^b, KP692036 ^c, EU518810 ^c. *Manihot caerulescens*, EU518900 ^b, EU518811 ^e. *Manihot carthaginensis*, EU518901 ^b, EU518812 ^e. *Manihot dichotoma*, FN551741 ^e, FN551773 ^e. *Manihot epruinosa*, EU518904 ^b, EU518815 ^e. *Manihot esculenta* subsp. *esculenta*, KP692112 ^a, KP692037 ^c, KP692038 ^c, KP692039 ^c. *Manihot esculenta* subsp. *flabellifolia*, EU518906 ^b, EU518816 ^e. *Manihot filamentosa*, EU518908 ^b, EU518818 ^e. *Manihot flamingiana*, FN551821 ^e. *Manihot fruticulosa*, EU518909 ^b, EU518819 ^e. *Manihot glaziovii*, EU518910 ^b, EU518820 ^e. *Manihot grahamii*, FN551792 ^e. *Manihot guaranitica*, EU518911 ^b, EU518821 ^e. *Manihot hunzikeriana*, FN551791 ^e. *Manihot jacobinensis*, EU518914 ^b, EU518823 ^e. *Manihot longipetiolata*, EU518915 ^b, EU518824 ^e. *Manihot orbicularis*, EU518916 ^b, EU518825 ^e. *Manihot peltata*, EU518917 ^b, EU518826 ^e. *Manihot pentaphylla*, EU518918 ^b, EU518827 ^e. *Manihot pilosa*, EU518919 ^b, EU518828 ^e. *Manihot pseudoglaziovii*, EU518920 ^b, EU518829 ^e. *Manihot purpureocostata*, EU518921 ^b, EU518830 ^e. *Manihot pusilla*, FN551809 ^e. *Manihot quinqueloba*, FN551805 ^e, FN551807 ^e. *Manihot quinquepartita*, FN551783 ^e. *Manihot sagittatopartita*, FN551811 ^e. *Manihot salicifolia*, FN551837 ^e. *Manihot sparsifolia*, EU518923 ^b, EU518832 ^e. *Manihot surinamensis*, FN551822 ^e. *Manihot triphylla*, EU518924 ^b, EU518833 ^e. *Manihot tristis*, EU518925 ^b, EU518834 ^e. *Manihot violacea*, EU518926 ^b, EU518835 ^e. *Manihot zehntneri*, FN551825 ^e.

Cervantes-Alcayde *et al.* 2015. Morphology and molecular phylogeny of the North American clade of *Manihot*. *American Journal of Botany* 102(4): 520–532. Data Supplement S1 – Page 5

Table 1 of the species used in this study, their sections, their distributions, and their biogeographic units.

Species	Sections	Distribution	Biogeographic units	Chloroplast			Nucleus	
				Markers	<i>psbA-trnH</i>	<i>trnL-trnF</i>	PEPC	<i>G3pdl_{NSA}</i>
<i>Manihot aesculifolia</i> (Kunth) Mill.	<i>Parvibracteatae</i> ¹	Pacific Ocean slope: from northwestern Mexico to Panama. Atlantic Ocean slope: disjointed distribution from central eastern Mexico to Panama ¹ .	I (1,3,5) ^{5,6}	*	*	*	*	* ₇
<i>angustiloba</i> (Torr.) Müll. Arg.	<i>Parvibracteatae</i> ¹	South western USA and northwestern Mexican Pacific slope ¹	I (1) ^{5,6}	*	*	*	*	*
<i>auriculata</i> McVaugh	<i>Parvibracteatae</i> ¹	Small area in the northwestern Mexican state of Nayarit ¹	I (1, 3) ^{5,6}	*	*	*	*	* ₇
<i>caudata</i> Greenm.	<i>Foetidae</i> ¹	Central Mexico to central western, Central north and North of Mexico ¹	I (3) ^{5,6}	*	*	*	*	* ₇
<i>chlorosticta</i> Standl. & Erdman	<i>Parvibracteatae</i> ¹	Northwestern to southwestern Mexico ¹	I (1, 3) ^{5,6}	*	*	*	*	* ₇
<i>crassiseptala</i> Pax & K. Hoffm.	<i>Foetidae</i> ¹	Central western to Central Mexico ¹	I (4) ^{5,6}	*	*	*	*	*
<i>davisiae</i> Croizat	<i>Parvibracteatae</i> ¹	Southwestern USA and northwestern Mexico ¹	I (1) ^{5,6}	*	*	*	*	*
<i>foetida</i> (Kunth) Pohl	<i>Foetidae</i> ¹	Small area in the Central Mexican states of Morelos, Guerrero ¹ , and Puebla (observation of the authors)	I (4) ^{5,6}	*	*	*	*	*
<i>mcvaughii</i> V.W. Steinhilber	None	Small area in the central western Mexican state of Michoacán ⁴	I (4) ^{5,6}	*	*	*	*	*
<i>michaelis</i> McVaugh	<i>Foetidae</i> ¹	Small area in the central western states of Colima and Jalisco ¹	I (3) ^{5,6}	*	*	*	*	*
<i>oaxacana</i> D.J. Rogers & Appan	<i>Parvibracteatae</i> ¹	Small area in the southwestern Mexican state of Oaxaca ¹	I (3) ^{5,6}	*	*	*	*	*
<i>obovata</i> J. Jiménez Ram.	<i>Obovatae</i> ²	Southwestern Mexican state of Guerrero ²	I (4) ^{5,6}	*	*	*	*	*
<i>nihotoides pauciflora</i> (Andeggee) Rogers & Appan	Genus <i>Manihotoides</i> ^{1,2}	Small area in the Central Mexico states of Puebla and northern Oaxaca ¹	I (4) ^{5,6}	*	*	*	*	*
<i>pringlei</i> S. Watson	<i>Parvibracteatae</i> ¹	Central to northeastern part of Mexico ¹	I (2) ^{5,6}	*	*	*	*	*
<i>rhomboides</i> Müll. Arg.	<i>Parvibracteatae</i> ¹	Central Mexico, northwestern to south western Mexico, Guatemala, Honduras, El Salvador and Nicaragua ¹	I (3, 4) ^{5,6}	*	*	*	*	*
<i>M. rubricaulis</i> I.M. Johnston	<i>Parvibracteatae</i> ¹	North to northwestern Mexico ¹	I (1, 3) ^{5,6}	*	*	*	*	* ₇
<i>subspicata</i> D.J. Rogers & Appan	<i>Parvibracteatae</i> ¹	Northeastern Mexico ¹	I (2) ^{5,6}	*	*	*	*	* ₇
<i>tomatophylla</i> Standl.	<i>Foetidae</i> ¹	Small area in the central western Mexican state of Michoacán ¹	I (4) ^{5,6}	*	*	*	*	* ₇
<i>walkerae</i> Croizat	<i>Parvibracteatae</i> ¹	Northeastern Mexico and southeastern USA ¹	I (2) ^{5,6}	*	*	*	*	*
<i>websteri</i> D.J. Rogers & Appan	<i>Foetidae</i> ¹	Small area in the central Mexican state of Puebla ¹	I (4) ^{5,6}	*	*	*	*	* ₇
<i>alutacea</i> D.J. Rogers & Appan	<i>Quinquelobae</i> ¹	Central Brazil ³	III ³	---	*	---	---	*
<i>anomala</i> Pohl	<i>Simuatae</i> ¹	Brazil, Paraguay, Bolivia, Argentina ³	II, III, V and VI ⁶	---	*	---	---	*
<i>brachyloba</i> Müll. Arg.	<i>Peruvianae</i> ¹	Eastern and northern South America ³	II ⁶	---	*	---	---	*
<i>caerulescens</i> Pohl	<i>Cearulescentes</i> ¹	Brazil, Paraguay ³	II, III, IV and VI ⁶	---	*	---	---	*
<i>carthaginensis</i> (Jacq.) Mill. Arg.	<i>Carthaginenses</i> ¹	West Indies, Colombia, Venezuela ³	II ⁶	---	*	---	---	*
<i>dichotoma</i> Ule isolates 1 & 2	<i>Glaziovianae</i> ¹	Northeastern Brazil ³	IV ⁶	---	---	---	---	*
<i>epumosa</i> Pax & K. Hoffm.	<i>Glaziovianae</i> ¹	Northeastern Brazil ³	IV ⁶	---	*	---	---	*
<i>esculenta</i> subsp. <i>esculenta</i> Nutt.	<i>Manihot</i> ¹	Cultivated sample	Cultivated sample	*	*	---	---	---
<i>esculenta</i> subsp. <i>velifolia</i> (Pohl) Cif.	<i>Manihot</i> ¹	III and Amazon basin ³	II ^{3,6} and III ⁶	---	*	---	---	*
<i>filamentosa</i> Pittier	<i>Carthaginenses</i> ¹	Venezuela ³	NS	---	*	---	---	*
<i>flemingiana</i> D.J. Rogers & Appan	<i>Graciles</i> ¹	Central-western Brazil ¹	III ⁶	---	---	---	---	*
<i>fruticulosa</i> (Pax) D.J. Rogers & Appan	<i>Graciles</i> ¹	Central and south eastern Brazil ³	III ⁶	---	*	---	---	*
<i>glaziovii</i> Müll. Arg.	<i>Glaziovianae</i> ¹	Northeastern Brazil ³	IV ⁶	---	*	---	---	*
<i>grahamii</i> Hook. isolate 1	<i>Heterophyllae</i> ¹	Southeastern Brazil, northern Argentina, Paraguay and Uruguay ¹	V, VI, VII ⁶	---	---	---	---	*
<i>guaranitica</i> Chodat & Speg.	<i>Anisophyllae</i> ¹	Bolivia, Paraguay, Argentina ³	VI ⁶	---	*	---	---	*
<i>hinzikeriana</i> Mart. Crov.	<i>Graciles</i> ¹	South of Brazil, and northeastern Argentina ¹	V ⁶	---	---	---	---	*
<i>jacobinensis</i> Müll. Arg.	<i>Quinquelobae</i> ¹	Eastern and western Brazil (gallery forests) ³	NS	---	*	---	---	*
<i>longipetiolata</i> Pohl	<i>Stipulares</i> ¹	Central Brazil ³	III ³	---	*	---	---	*
<i>orbicularis</i> Pohl	<i>Brevipetiolatae</i> ¹	Central Brazil ³	III ⁶	---	*	---	---	*
<i>peltata</i> Pohl	<i>Peltatae</i> ¹	Central Brazil ³	III ⁶	---	*	---	---	*
<i>pentaphylla</i> Pohl	<i>Graciles</i> ¹	North and southeastern Brazil, Paraguay ³	NS	---	*	---	---	*
<i>villosa</i> Pohl	<i>Heterophyllae</i> ¹	Southeastern Brazil ³	VI ⁶	---	*	---	---	*

<i>pseudoglaziovii</i> Pax & K. Hoffm.	<i>Glaziovianae</i> ¹	Northeastern Brazil ³	NS	---	*	---	---	*
<i>virgureocostata</i> Pohl	<i>Breviopediatae</i> ¹	Central Brazil ³	III ⁶	---	*	---	---	*
<i>pusilla</i> Pohl	<i>Stipulares</i> ¹	Central Brazil ¹	III ⁶	---	---	---	---	*
<i>quinqueloba</i> Pohl isolates 1 and 3	<i>Quinquelobae</i> ¹	Central Brazil ¹	III ⁶	---	---	---	---	*
<i>quinquepartita</i> Huber ex Rogers & Appan isolate 1	<i>Peruviana</i> ¹	From north-northeastern to central-western Brazil ¹	II ⁶	---	---	---	---	*
<i>sagittatopartita</i> Pohl isolate 1	<i>Quinquelobae</i> ¹	Central-central eastern Brazil ¹	III ⁶	---	---	---	---	*
<i>salicifolia</i> Pohl isolate 2	<i>Breviopediatae</i> ¹	Central Brazil ¹	III ⁶	---	---	---	---	*
<i>sparsifolia</i>	<i>Quinquelobae</i> ¹	Central Brazil ³	III ^{1,6}	---	*	---	---	*
<i>surinamensis</i> D.J.Rogers & Appan isolate 2	<i>Heterophyllae</i> ¹	Venezuela, Guyana and Suriname ³	II ⁶	---	---	---	---	*
<i>triphyllo</i> Pohl	<i>Graciles</i> ¹	Central Brazil ³	NS	---	*	---	---	*
<i>tristis</i> Muell.Arg.	<i>Heterophyllae</i> ¹	Venezuela (Amazonas), Suriname, northern Brazil ³	II ⁶	---	*	---	---	*
<i>violacea</i> Pohl	<i>Quinquelobae</i> ¹	Central and eastern Brazil ³	III ⁶	---	*	---	---	*
<i>zehmneri</i> Ule	<i>Heterophyllae</i> ¹	Northeastern Brazil ³	IV ⁶	---	---	---	---	*
<i>doscolus egregius</i> Breckon & Casas	---	---	---	---	*	*	---	---
<i>doscolus tubulosus</i> (Müll. Arg.) I.M. Johnst.	---	---	---	---	*	---	---	---
<i>irens</i> (L.) Arthur	---	---	---	---	---	---	---	*

Geographic units are I: Mesoamerica (1: Sonora, 2: Tamaulipas, 3: Mexican Pacific Coast, 4: Balsas Basin, 5: Yucatan Peninsula), II: Amazon and northern South America, III: Cerrado, IV: Caatinga, V: Paraná, VI: Chaco, VII: Pampeanas; Geographic units not specified in literature. Information taken from ¹: Rogers and Appan (1973), ²: Jiménez-Ramírez (1990), ³: Chacón et al. (2008), ⁴: Steinmann (2005), ⁵: Morrone (2005), ⁶: Duputié et al. (2011), ⁷: The sequences of these species from Chacón et al. (2008) and or Duputié et al. (2011) were only used for the first separate analysis of *G3pDNA*. NS: information not specified in any source. *: sequences used in the analyses. ---: Not available information or sequence. eber (1994), Martínez-Gordillo et al. (2002), and Steinmann (2005) argued there is no reason to separate *Manihotoides pauciflora* from *Manihot*.

Cervantes-Alcayde *et al.* 2015. Morphology and molecular phylogeny of the North American clade of *Manihot*. *American Journal of Botany* **102**(4): 520–532. Data Supplement S2 – Page 5

Protocols and reactions for DNA amplification, as well as amplification kits used for the different markers and the different species.

Organelle	Chloroplast									Nucleus														
	Marker			<i>psbA-trnH</i> ^{a,b}			Intron <i>trnL</i> ^b			<i>trnL-trnF</i> ^c			<i>PEPC</i> ^{d,b}			<i>G3pdh_{ssA}</i> ^e			<i>G3pdh_{ssA}</i> ^{e,f}					
Primers	Forward: <i>psb4F</i>			Forward: B49317			Forward: B49873			Forward: <i>PPCY4F</i>			Forward: <i>GPDΔ7F</i>			Forward: <i>GPDΔ7FSpe</i>								
	Reverse: <i>trnHR</i>			(c)			(e)			Reverse: <i>PPCY5R</i>			Reverse: <i>GPDΔ9R</i>			Reverse: <i>GPDΔ9RSpe</i>								
Protocols	Reverse: A49855			Reverse: A50272			(f)																	
	(d)																							
Reactions	Te Ti N			Te Ti N			Te Ti N			Te Ti N			Te Ti N			Te Ti N								
	S. 1	94	2:00	---	94	2:00	---	94	2:00	---	94	1:30	---	95	2:00	---	95 ^{f,g}	2:00 ^f /15:00 ^g	---					
	S. 2.1	94	0:45		94	0:30		94	1:00		94	0:50		95	1:00		95 ^f /94 ^g	1:00 ^f /0:30 ^g						
	S. 2	S. 2.2	55	1:00	30	50	0:30	35	55	1:00	35	55	1:10	30	50	1:00	30	60 ^f /55- 60 ^g	1:00 ^f /1:30 ^g	30 ^f /40 ^g				
	S. 2.3	72	1:15		72	2:00		72	2:00		72	1:30		72	1:30		72 ^{f,g}	1:30 ^g						
	S. 3	72	7:00	---	72	7:00	---	72	3:00	---	72	3:00	---	72	3:00	---	72 ^{f,g}	3:00 ^f /10:00 ^g	---					
	S. 4			---			---			---	30	1:00				---			---					
	Kit employed	(B)			(A) ¹		(B) ¹		(A) ¹		(B) ¹		(B)		(B)		(B) ¹		(B) ¹		(C) ¹		(D) ¹	
	Total volume (μL)	50			25		50		50		50		25 ^(b)		50 ^(b)		25/50		50		30		40	
	Buffer (μL)	5			5		5		10		5		2.5		5		5/10		5		3		4	
MgCl ₂ (μL)	1.5			1.5		1.5		3.0		1.5		0.75		1.5		1.5/3.0		1.5		0.9		2.0 ^(d)		
dNTPs 10 mM (except for ^(b) (μL))	1.0			0.5		1.0		1.0		1.0		0.5		1.0		0.5/1.0		1.0		0.6		4.0 ^(b)		
Primer F 10 μM (μL)	1.26			2.0		4.0		4.0		4.0		0.63		1.26		2.0/4.0		4.0		0.76		1.6 ^(d)		
Primer R 10 μM (μL)	1.26			2.0		4.0		4.0		4.0		0.63		1.26		2.0/4.0		4.0		0.76		1.6 ^(d)		
Solution Q from QIAGEN (μL)	10			---		---		---		---		5		10		---		---		6 ^(c)		8		
Taq polymerase (μL)	0.250			0.125		0.250		0.250		0.250		0.200		0.250		0.125/0.250		0.250		0.150		0.200		
DNA (μL)	2-4			2-3		4		4-8		4		1-2		1-6		3-5/4-10		6-8		4-8		10-18.6		
H ₂ O (μL)	Up to 50			Up to 25		Up to 50		Up to 50		Up to 50		Up to 25		Up to 50		Up to 25 or to 50		Up to 50		Up to 30		Up to 40		

Notes: Te: Temperature (°C), Ti: Time (min:sec), N: Number of cycles. S. 1: Stage 1. S. 2: Stage 2. S. 3: Stage 3. S. 1: Initial denaturation period. Stage 2: Successive cycles of denaturation (2.1), annealing (2.2) and elongation (2.3) periods. S. 3: Final elongation period. Kits employed were (A): GoTaq Flexi (Promega, Madison, Wisconsin, USA) (5X PCR buffer and 25 mM MgCl₂), (B): Taq Platinum (Life Technologies, Grand Island, New York, USA) (10X PCR buffer and 50 mM MgCl₂), (C): Taq Amplificasa (Biotecnologías Moleculares SA de CV, México Distrito Federal, México) (10X PCR buffer and 30 mM MgCl₂), (D): Taq DNA Polymerase (Qiagen, Valencia, California, USA) (10X PCR buffer, 25 mM MgCl₂, 5X Q-Solution)^(b). Reactions consisted of 25 μL when they were directly sequenced. They consisted of 50 μL when they were cloned, and later sequenced. For each cloned species, four 50 μL reactions were used. ^(b): Taq Amplificasa was only used to amplify one species. ^(c): For these series of reactions we used dNTPs 2 mM. ^(d): For one species we used 4 μL of MgCl₂ and 3.2 μL of each primer.

^a: Primers from Sang *et al.* (1997); protocol modified from Sotuyo-Vázquez (2007). ^b: Primers from Taberlet *et al.* (1991); protocol modified by L. Small. ^c: Primers and protocol from Taberlet *et al.* (1991). ^d: Primers and protocol from Olson (2002). ^e: Primers from Strand *et al.* (1997); protocol modified from Olsen and Schaal (1999) to obtain amplifications in thirteen species. ^f: Protocol from Olsen and Schaal (1999). ^g: Protocol from Duputié *et al.* (2011) used to amplify four species (annealing temperatures: 55-60 °C). ^h: For these markers we always used Hot Start. ⁱ: (A) was used for all the species; (B) was only used to amplify intron *trnL* in one of them. ^j: (A) was used for eighteen species; for the remaining two species, Platinum Taq was used to amplify intergenic spacer *trnL-trnF*. ^k: (A) was used for fourteen species; (B) was used for the remaining six species. ^l: (C) was used for thirteen species; (D) was used for four of them.

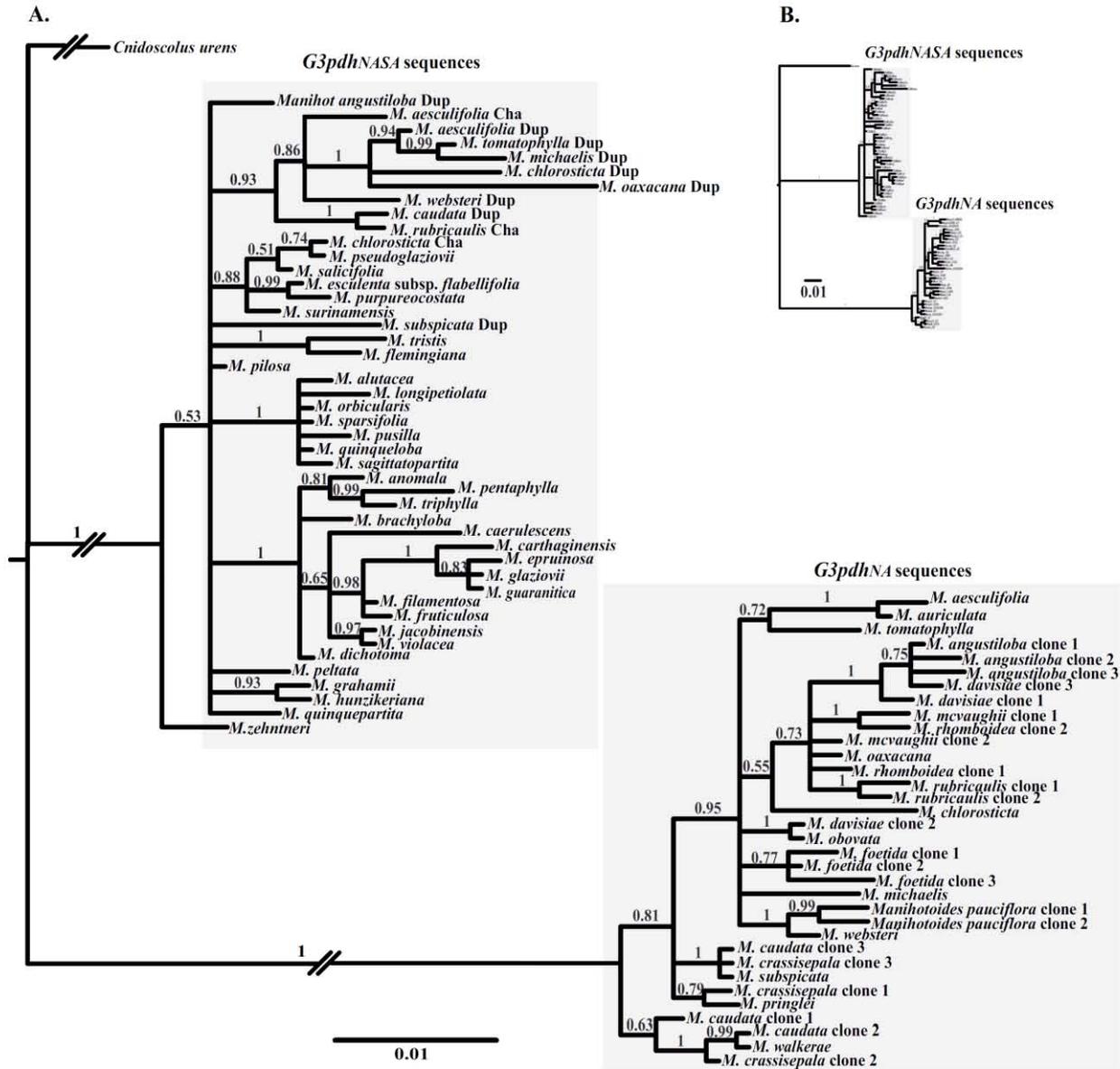
Cervantes-Alcayde *et al.* 2015. Morphology and molecular phylogeny of the North American clade of *Manihot*. *American Journal of Botany* **102**(4): 520–532. Data Supplement S3 – Page 5

Protocols and reactions used to sequence the amplifications obtained by conventional PCRs or by cloning. Stage 1: Initial denaturation period. Stage 2: Successive cycles of denaturation (2.1), annealing (2.2) and elongation (2.3). Stage 3: Final elongation period. Te: Temperature (°C). Ti : Time. (min:sec). N: Number of cycles.

		<i>PEPC and psbA-trnH</i>						Intron <i>trnL-trnF</i> , intergenic spaces <i>trnL-trnF</i> , and <i>G3pdlh_{3A}</i>						
		Directly amplified DNA			Cloned DNA			Directly amplified DNA			Cloned DNA			
		Te	Ti	N	Te	Ti	N	Te	Ti	N	Te	Ti	N	
Protocols	S. 1	96	5:00		94	5:00		95	1:00		96	1:00		
		S. 2.1	96	0:10		94	0:10		95	0:15		96	0:10	
	S. 2	S. 2.2	55	0:05	25	50	0:10	30	50	0:10	25	50	0:05	30
		S. 2.3	60	4:00		60	4:00		60	4:00		60	4:00	
Reactions	Total volume (μL)	10			10-11			12			12			
	Big Dye (μL)	2			2			1			1			
	Buffer 2.5X (μL)	2			2			1.5			1.5			
	Primer F 10 μM (μL)	0.75			----			2			----			
	Primer R 10 μM (μL)	0.75			----			2			----			
	Primer F 3 μM (μL) ^c	----			1			----			1.6			
	Primer R 3 μM (μL) ^d	----			1			----			1.6			
	DNA (μL)	2-4			4-6			Up to 7			Up to 7			
	H ₂ O (μL)	Variable			Variable			Variable			Variable			

Notes: Te: Temperature (°C). Ti: Time (min:sec). N: Number of cycles. S. 1: Stage 1. S. 2: Stage 2. S. 3: Stage 3. S. 1: Initial denaturation period. Stage 2: Successive cycles of denaturation (2.1), annealing (2.2) and elongation (2.3) periods.

Topology of the first Bayesian separate analysis of all our sequences of *G3pdh_{NA}* and the sequences of *G3pdh_{NASA}* obtained by other authors. Posterior probabilities are shown above branches. A: Enlarged topology with the branches leading to the outgroup, to the sequences of *G3pdh_{NA}*, and to the sequences of *G3pdh_{NASA}* truncated. The terminals whose names are followed by “Cha” or “Dup” are sequences of North American species of *Manihot* obtained by Chacón *et al.* (2008) or Duputié *et al.* (2011). B: Topology showing the original branch lengths.

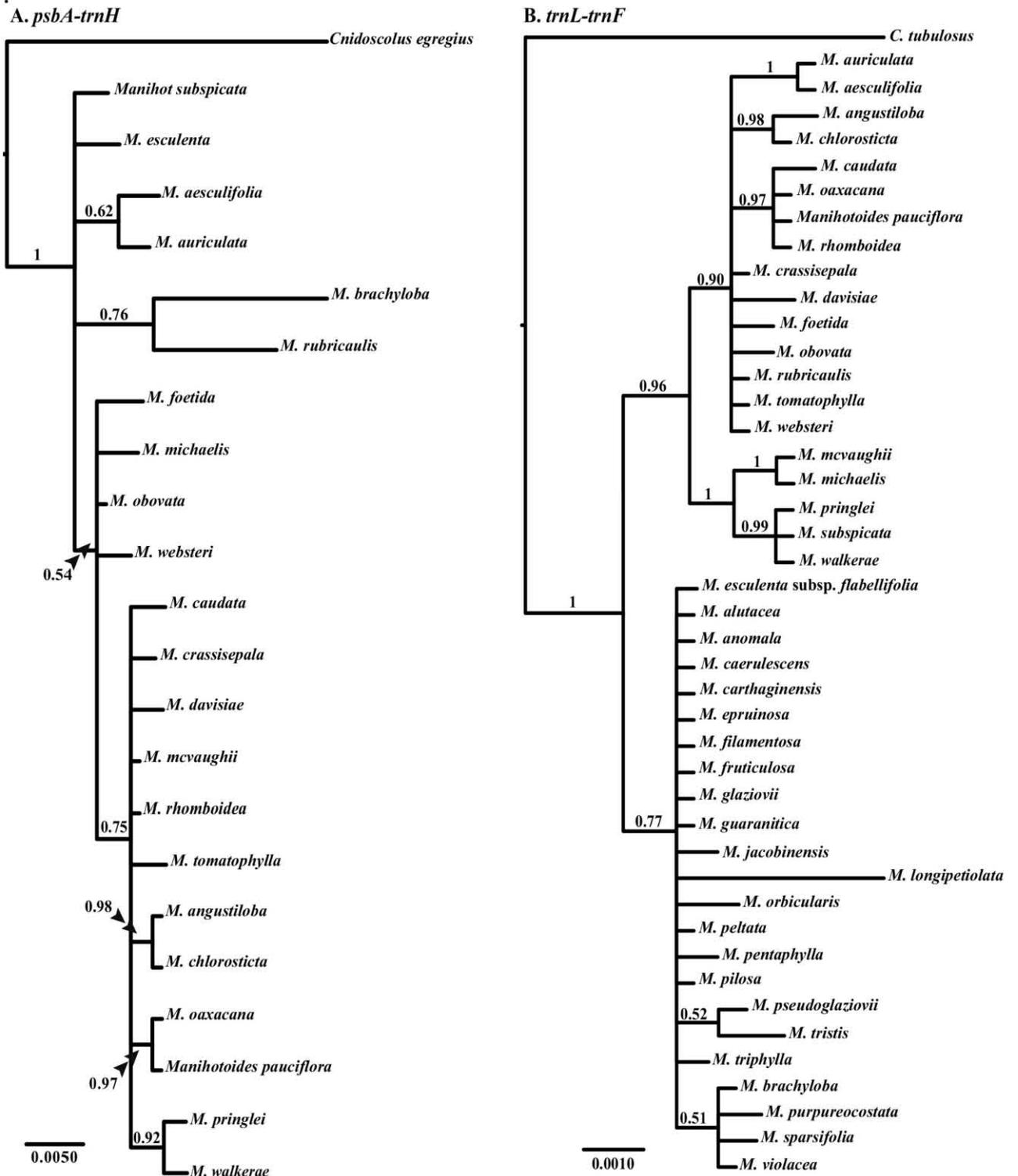


Cervantes-Alcayde *et al.* 2015. Morphology and molecular phylogeny of the North American clade of *Manihot*. *American Journal of Botany* **102**(4): 520–532. Data Supplement S5 – Page 5

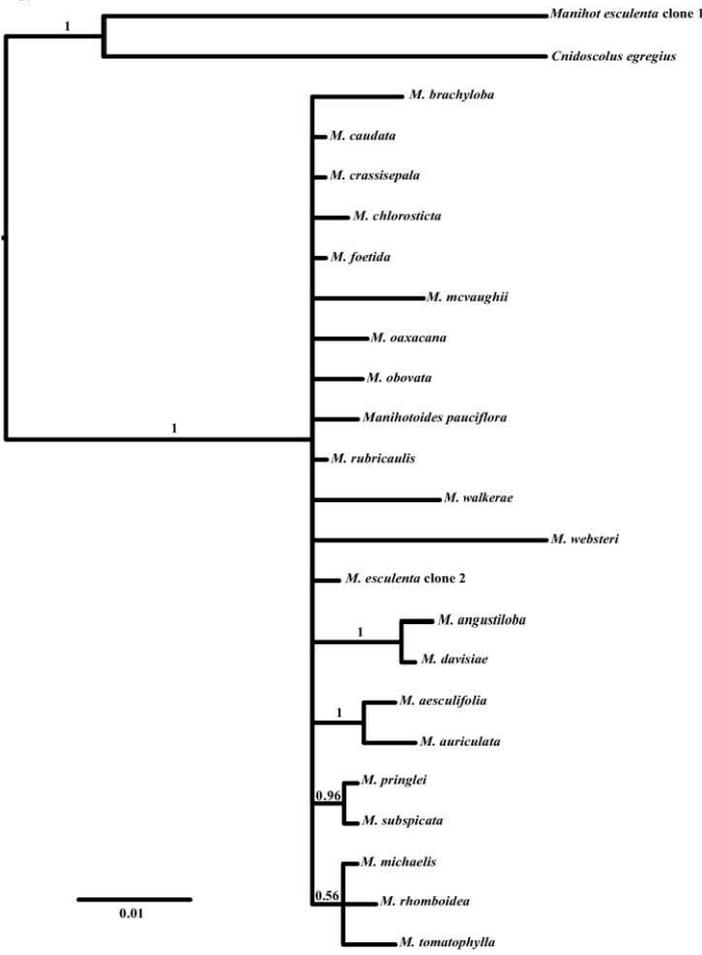
Topology of the first Bayesian separate analysis of all the sequences of *PEPC*. Posterior probabilities are shown above branches. Within the gray box and followed by asterisks are the two sequences of *PEPC* from species of the ingroup that were not included in subsequent analyses.



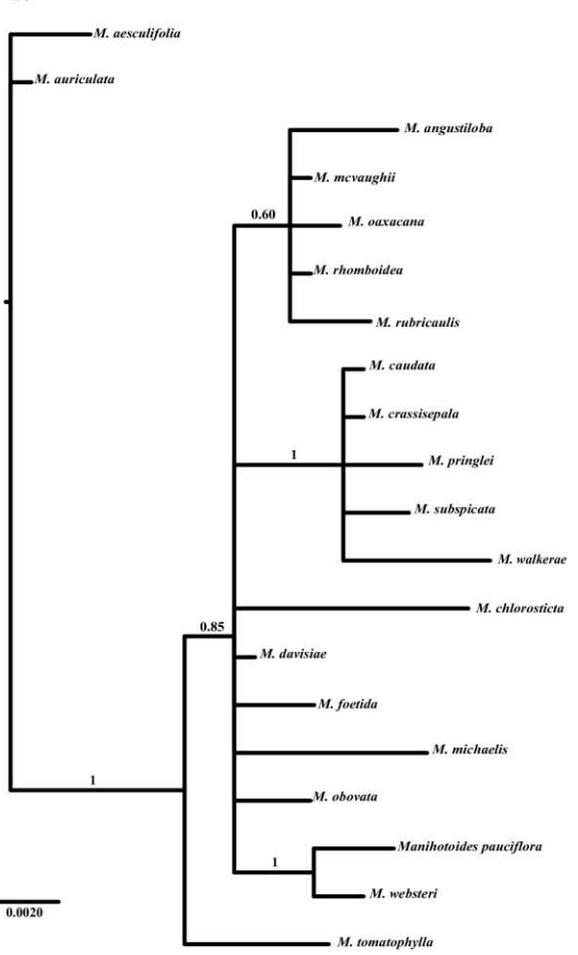
Appendix S6. Topologies obtained with Bayesian separate analyses of each marker (A. *psbA-trnH*, B. *trnL-trnF*, C. *PEPC*, D. *G3pdhNA*, E. *G3pdhNASA*). Posterior probabilities are shown above branches or connected to them by arrows.



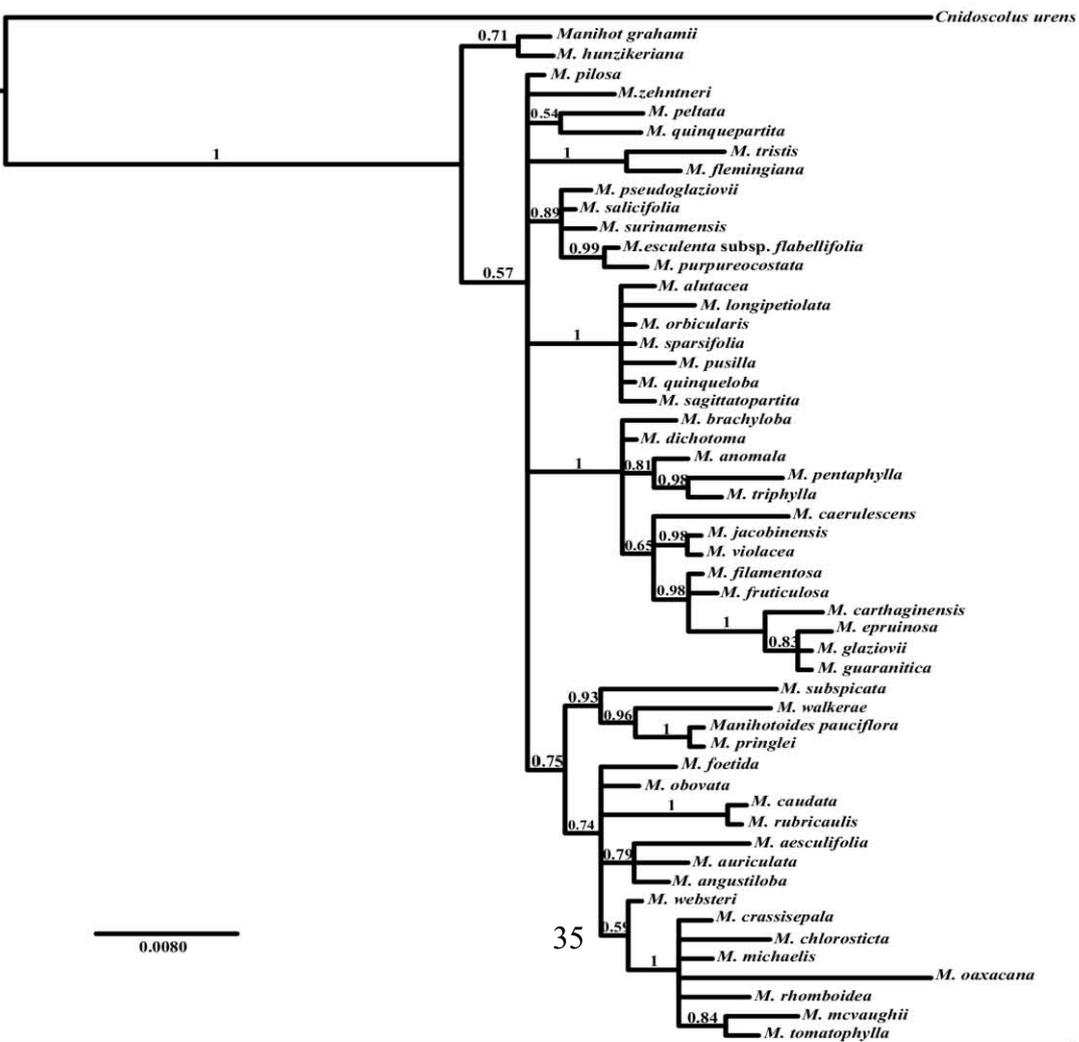
C.



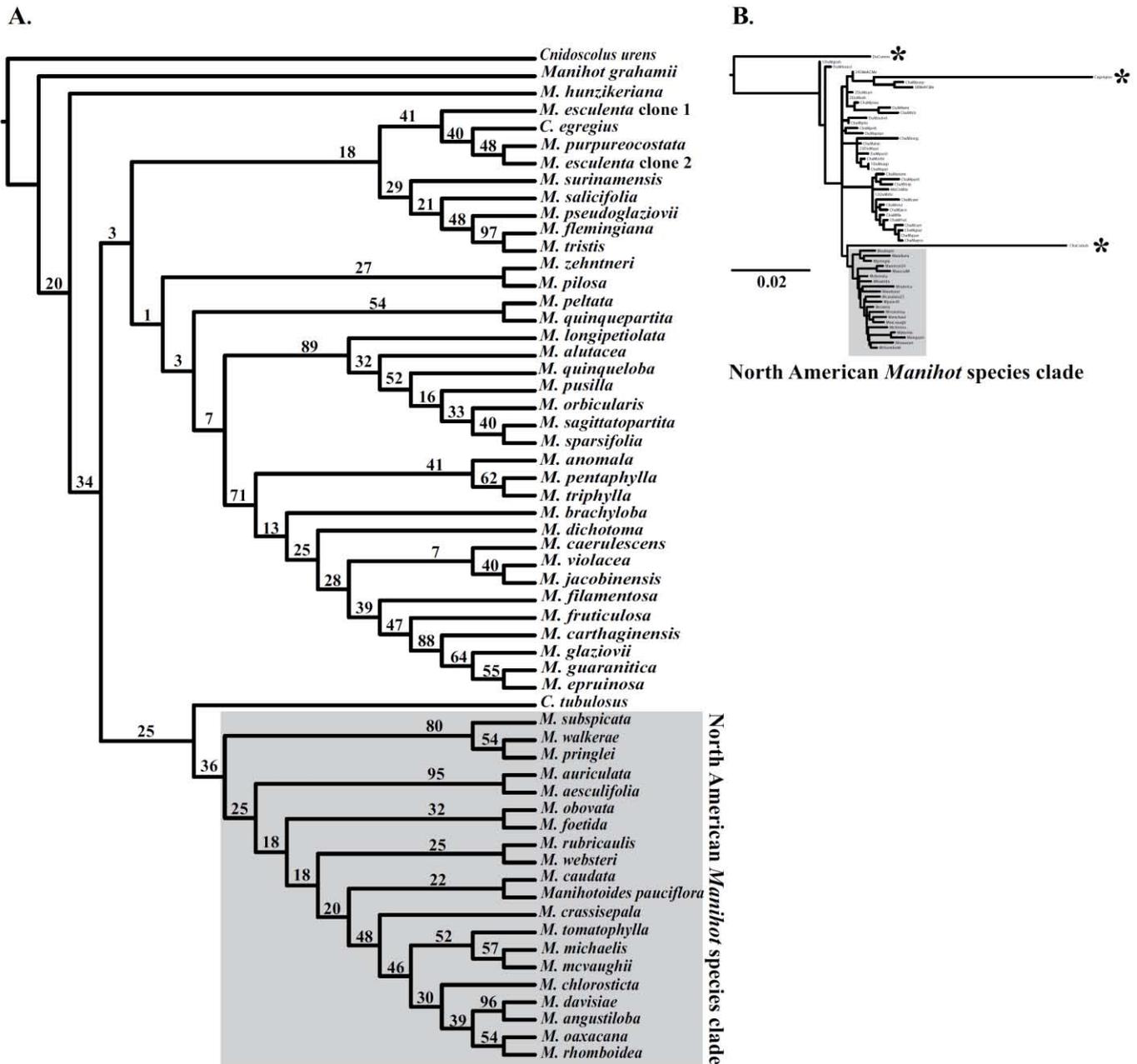
D.



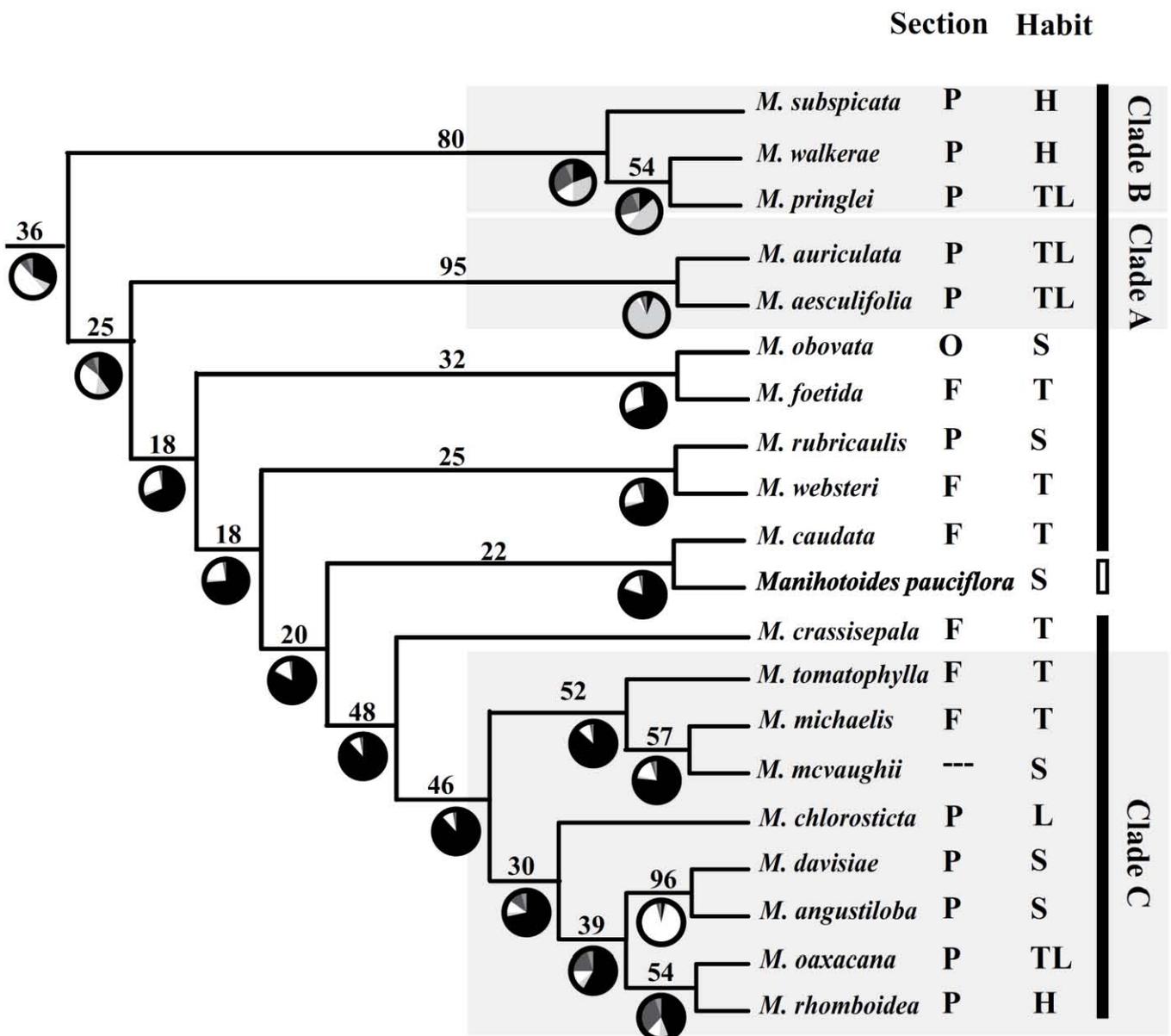
E.



Topology with the maximum likelihood score (ML=8407.987831) showing the relationships among all North American *Manihot* species and a selected group of South American species. The phylogeny is based on sequences of two plastid markers (*psbA-trnH* and *trnL-trnF*), and three nuclear markers (*PEPC*, *G3pdhNA*, and *G3pdhNASA*). Bootstrap values are shown on the branches. A: Enlarged topology not showing branch lengths. B: Topology showing branch lengths. Within gray boxes is the clade made up of North American species of *Manihot*. Asterisks in B indicate the positions of the three species of *Cnidoscolus*.



Habit and sectional affinity of North American *Manihot* species clade mapped onto the topology recovered using Maximum Likelihood, showing that the section classification is not based on monophyletic groups, and that the habit categories that they are in part based on are highly homoplasious. The tree summarizes the phylogeny in Appendix S7. Clades A, B and C are those recovered both by Bayesian and Maximum Likelihood analyses. Bootstrap values are shown above branches. Below branches are the results of the mapping of growth form. Liana: medium gray, herb: dark gray, shrub: white, treelet: light gray, tree: black. P = Section Parvibracteatae, F = Section Foetidae, O = Section Obovatae. T = tree, TL = treelet, S = shrub, H = herb, L = liana. *Manihotoides pauciflora* falls within the North American *Manihot* species clade.



3. HALLAZGO DE UNA POSIBLE NUEVA ESPECIE DE *MANIHOT* (EUPHORBIACEAE) AFÍN A *M. OAXACANA* EN GUERRERO

María-Angélica Cervantes-Alcayde, Susana Valencia-Ávalos, Jaime Jiménez-Ramírez, Mark Earl Olson, Leonardo O. Alvarado-Cárdenas, K. M. Olsen y Luis E. Eguiarte

RESUMEN

Manihot es un género nativo de América que incluye alrededor de 98 especies, 20 de las cuales habitan en Norteamérica y 16 de las cuales se encuentran exclusivamente en México. Las especies son poco abundantes en su área de distribución, no constituyendo nunca elementos dominantes de la vegetación local. Esto podría contribuir a que no conozcamos aún a todas las especies de este género, lo que entorpecería la investigación sobre la evolución del tamaño corporal en el mismo, que constituye un modelo excelente para hacerlo. Tres secuencias de cloroplasto (del espaciador intergénico *psbA-trnH*, del intrón *trnL* y del espaciador intergénico *trnL-trnF*) y dos secuencias de núcleo (*PEPC* y *G3pdh_{NASA}*) fueron obtenidas a partir de un ejemplar afín a *M. oaxacana* procedente de una población ubicada en Iguala, Guerrero. Fue llevado a cabo un análisis filogenético bayesiano en el que se incluyeron dichas secuencias y las secuencias de seis marcadores de otras 58 especies de *Manihot*. Adicionalmente, fue efectuado un análisis de distribución potencial de *M. oaxacana* para evaluar si el ambiente ocupado por la nueva población es el mismo que aquel ocupado por *M. oaxacana*. El análisis filogenético muestra que la nueva población está cercanamente relacionada con *M. oaxacana* pero exhibe una gran divergencia genética respecto a ésta, lo que sugiere que dicha población podría pertenecer a una nueva especie. Esta conclusión es apoyada por los análisis de distribución efectuados, que indican que el ambiente ocupado por esta población es significativamente distinto de aquel ocupado por *M. oaxacana*.

Palabras clave: Nueva especie de *Manihot*, *M. oaxacana*, análisis bayesiano, núcleo, cloroplasto, análisis de distribución potencial

INTRODUCCIÓN

Manihot es un género nativo de América que incluye alrededor de 98 especies, la más conocida de las cuales es *M. esculenta* subsp. *esculenta*, comúnmente llamada cassava, yuca o mandioca, que constituye la principal fuente de carbohidratos en numerosos países del Tercer Mundo. Alrededor de 80 de las especies de *Manihot* son nativas de Sudamérica, mientras que unas 20 habitan en el sur de Estados Unidos, México y parte de Centroamérica. Dieciséis de estas 20 especies habitan exclusivamente en México.

Las especies de *Manihot* son encontradas en regiones relativamente secas. Cuando han sido reportadas en bosques húmedos, son encontradas en los claros de los mismos. Las especies de este género exhiben varios atributos comúnmente interpretados como

adaptaciones a la escasez de agua. Entre tales atributos han sido mencionados la presencia de grandes raíces tuberosas en las especies arbustivas y herbáceas, y de tallos caducifolios en varias especies arbustivas. Gran parte de las especies es sensible a las heladas, por lo que su límite de distribución altitudinal es de 2,000 msnm. Las especies norteamericanas son encontradas en suelos calizos de origen relativamente reciente. Una especie habita en los estados de Morelos y Puebla, tres en los estados de Nuevo León y Tamaulipas, y 16 en la vertiente del Pacífico mexicano (una de las cuales ha extendido su distribución hasta la Península de Yucatán) (Rogers y Appan, 1973). Todas las especies son poco abundantes en su área de distribución y nunca constituyen elementos dominantes de la vegetación local.

El hecho de que las especies de *Manihot* constituyan elementos poco abundantes de la vegetación podría contribuir a que desconozcamos aún el número y la identidad de todas las especies de este género que habitan en nuestro país. Esto es lamentable, ya que este grupo de especies constituye un modelo muy apropiado para el estudio de la evolución convergente del tamaño corporal porque exhibe una gran diversidad de tamaños y de formas de vida cuyo surgimiento fue aparentemente promovido, al menos parcialmente, por las condiciones ambientales.

En septiembre de 2010 la segunda autora encontró, como parte de un viaje de colecta en el marco del proyecto de la Flora de Guerrero, una pequeña población de individuos en fructificación afines a *M. oaxacana* D.J. Rogers & Appan (*M. cf. oaxacana*), especie cuya ocurrencia ha sido reportada exclusivamente en el estado de Oaxaca. La presencia de esta población puede deberse a una subestimación del rango de distribución de *M. oaxacana*, a la inapropiada identificación de los individuos de esta población, que podrían corresponder a alguna otra especie de *Manihot* distribuida en esa zona, o a que dicha población pertenece a una nueva especie. La posibilidad de que los individuos hayan sido mal identificados por presentar hojas y hábitos de crecimiento semejantes a los de *M. oaxacana* (Figura 1) se debe al hecho de que ha sido reportado que la forma de las hojas puede variar incluso en el mismo individuo, además de que las especies de *Manihot* posiblemente sufren eventos de hibridación que podrían dar origen a individuos de fenotipos intermedios (Chacón *et al.*, 2008). Sin embargo, esta posibilidad es remota puesto que quien diagnosticó a los ejemplares (el tercer autor) es especialista en la familia Euphorbiaceae y ha trabajado por largo tiempo en el estado de Guerrero. Para determinar cuál de las dos opciones restantes es la más plausible (*i.e.* si la nueva

población pertenece a *M. oaxacana* o si, por el contrario, pertenece a una nueva especie) fueron llevados a cabo los procedimientos descritos en la siguiente sección.

MATERIALES Y MÉTODO

Fue colectada una muestra de un miembro de la población de *M. cf. oaxacana* y con ella fueron hechos análisis filogenéticos. Los procedimientos empleados para obtener, secuenciar, editar y alinear las cuatro regiones de ADN obtenidas a partir de *M. cf. oaxacana* son mencionados en Cervantes *et al.* (2015). Las cuatro secuencias obtenidas a partir de dicho ejemplar fueron alineadas con secuencias de los mismos marcadores, y las de un quinto marcador, procedentes de 58 especies de *Manihot* nativas de Norte y de Sudamérica. La matriz concatenada de los cinco marcadores fue analizada empleando análisis bayesianos (Yang y Rannala, 1997) implementados en el programa MrBayes v. 3.1.2 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001). Los modelos evolutivos empleados para cada marcador, los parámetros usados en la búsqueda bayesiana y los procedimientos llevados a cabo tras el análisis bayesiano son los mismos empleados en el análisis concatenado citado en Cervantes *et al.* (2015).

Para evaluar si la nueva población de *M. cf. oaxacana* ocupa un ambiente comparable a aquel ocupado por *M. oaxacana* fue empleado el programa MaxEnt (Phillips *et al.*, 2006), que es una herramienta de predicción que utiliza datos climáticos y los registros de colecta de una especie implementando un algoritmo llamado “máxima entropía”. MaxEnt permite caracterizar el clima de cada localidad donde *M. oaxacana* ha sido colectada e identificar las zonas donde muy probablemente existen condiciones ambientales parecidas a las registradas en localidades conocidas (Phillips *et al.*, 2006). El resultado final es un modelo de predicción consistente en un mapa de la extensión geográfica del clima óptimo en el que crece la especie.

Antes del cálculo del modelo distribución potencial, fueron georreferenciadas la localidad del ejemplar de *M. cf. oaxacana* y todas las localidades de ejemplares de *M. oaxacana* depositados en el Herbario Nacional (MEXU), el Herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM (FCME) y el herbario virtual del Jardín Botánico de Missouri (MO) (<http://www.tropicos.org>).

Para modelar la distribución potencial de *M. oaxacana* y caracterizar las zonas con las condiciones en las cuales crece, fue utilizada la configuración por omisión del programa MaxEnt. Fueron utilizadas 19 capas de información climática para el ajuste del modelo,

las cuales fueron obtenidas de la *WorldClim Global Climate GIS Database* con una resolución espacial de 30 segundos (ca. 1 km²) (Hijmans *et al.*, 2005; <http://www.worldclim.org>).

Para evaluar la calidad del modelo, fueron utilizados los valores del área bajo la curva ROC (receiver operating characteristics). A fin de validar el modelo, fue empleado el 70% de los registros puntuales de la especie, seleccionados al azar, para generar los modelos, mientras que el 30% restante fue empleado para su evaluación. Para delimitar la proyección del modelo, fue usado como umbral el percentil del 10%.

Fue empleado el programa ArcGIS 9.3 (ESRI, 2006) para editar el modelo con base en el umbral del percentil del 10%. El mapa resultante sirvió para ubicar la población de *M. cf. oaxacana* y observar si el modelo de *M. oaxacana* la predecía.

RESULTADOS

El ejemplar de *M. cf. oaxacana*, depositado en el Herbario de la Facultad de Ciencias (FCME) con el número de voucher S. Valencia A. 4890, procede del municipio de Iguala de la Independencia, en el estado de Guerrero, 5 km al S de la Colonia Guadalupe. Las coordenadas en las que se ubica la población son 18° 21' 18" N y 99° 35' 38" W. La altitud de la localidad es de 942 msnm. El tipo de vegetación es bosque tropical caducifolio y los individuos de *Manihot* son escasos y tienen una altura estimada de unos 4 m.

A partir de este ejemplar fueron obtenidas secuencias del espaciador intergénico *psbA-trnH*, el intrón *trnL*, el espaciador intergénico *trnL-trnF* (todos ellos del cloroplasto), un segmento del gen nuclear que codifica a la fosfoenol piruvato carboxilasa (*PEPC*) y un segmento de una versión del gen nuclear que codifica a la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (referida como *G3pdh_{NASA}* en Cervantes-Alcayde *et al.*, 2015). Estas secuencias fueron conjuntadas con secuencias de las mismas regiones de 58 especies adicionales de *Manihot*, así como con las secuencias de otra versión del gen de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (referida como *G3pdh_{NA}* en Cervantes-Alcayde *et al.*, 2015) provenientes de las especies norteamericanas de *Manihot*. El alineamiento de todas las especies tuvo una longitud de 3,666 pares de bases y 123 caracteres variables. Una vez alineadas, las secuencias procedentes de *M. cf. oaxacana* tuvieron una longitud de 3,019 pares de bases.

En la Figura 3.2 se ilustra el árbol de consenso del análisis bayesiano. En él se muestra que *M. oaxacana* y *M. cf. oaxacana* formaron un clado con el mayor valor de apoyo posible (PP=1.00). Esto es congruente con la información proveniente de los caracteres morfológicos, de acuerdo con la cual la población de *M. cf. oaxacana* – corresponde a *M. oaxacana*. Sin embargo, las ramas que conducen a *M. oaxacana* y a *M. cf. oaxacana* son tan largas como las ramas que separan a varias especies de *Manihot* (e.g. *M. aesculifolia*, *M. angustiloba*) de sus taxones hermanos. Lo anterior sugiere que *M. cf. oaxacana* tiene una serie de autapomorfias moleculares que la diferencian de *M. oaxacana*. De acuerdo con algunos conceptos de especie, estas características serían suficientes para que *M. cf. oaxacana* fuera considerada una especie distinta. Tal es el caso del Concepto Filogenético de Especie (Cracraft, 1989).

En cuanto a los análisis de distribución potencial, estos muestran que el modelo que predice la distribución de *M. oaxacana* no predice la localidad de *M. cf. oaxacana* (Figura 3.3), sugiriendo que ésta es diferente a las localidades en las que *M. oaxacana* es encontrada. Ciertos conceptos de especie asumen que la ocupación de un nicho ecológico distintivo constituye una característica suficiente para diagnosticar a una especie. Tal es el caso del Concepto Cohesivo de Especie (Templeton, 1989). De acuerdo con este concepto, *M. oaxacana* y *M. cf. oaxacana* constituirían especies distintas dado que sus miembros carecen de intercambiabilidad demográfica.

CONCLUSIONES

La población encontrada en Guerrero por la segunda autora es de una especie muy semejante morfológicamente a *M. oaxacana*. Los análisis filogenéticos efectuados indican que, si bien está cercanamente emparentada con *M. oaxacana*, exhibe respecto a ésta una divergencia molecular comparable a aquella existente entre pares especies de *Manihot* diagnosticables morfológicamente. De manera semejante, los análisis de distribución potencial muestran que el modelo que predice la distribución de *M. oaxacana* no predice la localidad en la que *M. cf. oaxacana* fue encontrada. Estas observaciones sugieren que *M. cf. oaxacana* constituye una especie nueva de acuerdo con el Concepto Filogenético de Especie y el Concepto Cohesivo de Especie, respectivamente.

En lo referente al rango de distribución de *M. oaxacana*, los análisis de distribución potencial muestran que existe una alta probabilidad de encontrar a *M. oaxacana* en

zonas en las que no ha sido reportada hasta ahora. Dada la escasez de individuos que caracteriza a las poblaciones de *Manihot*, esto podría implicar que las distribuciones previamente reportadas para las mismas son imprecisas y, probablemente, constituyen subestimaciones de sus áreas de distribución reales. Lo anterior sugiere que es necesaria una revisión de los datos depositados en los ejemplares de herbario, así como un esfuerzo de colecta más intenso, para aproximarnos no sólo al verdadero número de especies ni a las áreas de distribución de las mismas, sino también a información esencial sobre su biología reproductiva (e.g. organismos que las dispersan).

BIBLIOGRAFÍA

Cracraft, J. 1989. Speciation and its ontology: The empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. In D. Otte y J. A. Endler (eds.). *Speciation and its consequences*, pág. 29-59. Sinauer, Sunderland, Massachusetts

Cervantes-Alcayde, M. A., M. E. Olson, K. M. Olsen y L. E. Eguiarte. 2015. APPARENT SIMILARITY, UNDERLYING HOMOPLASY: MORPHOLOGY AND MOLECULAR PHYLOGENY OF THE NORTH AMERICAN CLADE OF *MANIHOT*. *American Journal of Botany* **102** (4): 520–532

Chacón, J., S. Madriñán, D. Debouck, F. Rodríguez y J. Tohme. 2008. PHYLOGENETIC PATTERNS IN THE GENUS *MANIHOT* (EUPHORBIACEAE) INFERRED FROM ANALYSES OF NUCLEAR AND CHLOROPLAST DNA REGIONS. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **49**: 260–267

ESRI. 2006. *ArcGIS 9.3*. Environmental Systems Research Institute, Redlands, CA. <http://www.esri.com>

Hijmans, R. J., S. E. Cameron, J. L. Parra, P. G. Jones y A. Jarvis. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* **25**: 1965–1978

Huelsenbeck, J. P. y F. Ronquist. 2001. MRBAYES: BAYESIAN INFERENCE OF PHYLOGENETIC TREES. *Bioinformatics* **17**: 754–755.

Rogers, D. J. y S. G. Appan. 1973. *MANIHOT* AND *MANIHOTOIDES* (EUPHORBIACEAE). *Flora neotropica*, monograph 13. Hafner, Nueva York, E. U.

Phillips, S. J., R. P. Anderson y R. E. Schapire. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distribution. *Ecological Modelling* **190**: 231–259

Templeton, A. R. 1989. The meaning of species and speciation: A genetic perspective. In D. Otte y J. A. Endler (eds.). *Speciation and its consequences*, pág. 3-27. Sinauer, Sunderland, Massachusetts

Yang, Z. y B. Rannala. 1997. BAYESIAN PHYLOGENETIC INFERENCE USING DNA SEQUENCES: A MARKOV CHAIN MONTE CARLO METHOD. *Molecular Biology and Evolution* **14**: 717–724

Figura 3.1. Imágenes de uno de los individuos de *M. cf. oaxacana* encontrados en las proximidades de Iguala, Guerrero. (A) Imagen de una planta completa mostrando el hábito y el tamaño aproximado. (B) Detalle de las hojas. Fotos de S. Valencia Ávalos.



Figura 3.2. Árbol de compromiso de mayoría del 50% ilustrando las relaciones entre las especies norteamericanas de *Manihot* y una selección de especies sudamericanas. La filogenia está basada en tres marcadores de cloroplasto (*psbA-trnH*, intrón *trnL* y *trnL-trnF*) y tres marcadores nucleares (*PEPC*, *G3pdh_{NA}* y *G3pdh_{NASA}*). Para *M. cf. oaxacana* sólo pudieron ser obtenidas las secuencias de *psbA-trnH*, el intrón *trnL*, *trnL-trnF*, *PEPC* y *G3pdh_{NASA}*. Las probabilidades posteriores se muestran sobre las ramas. El cuadro gris muestra el clado formado por *M. oaxacana* y *M. cf. oaxacana*.

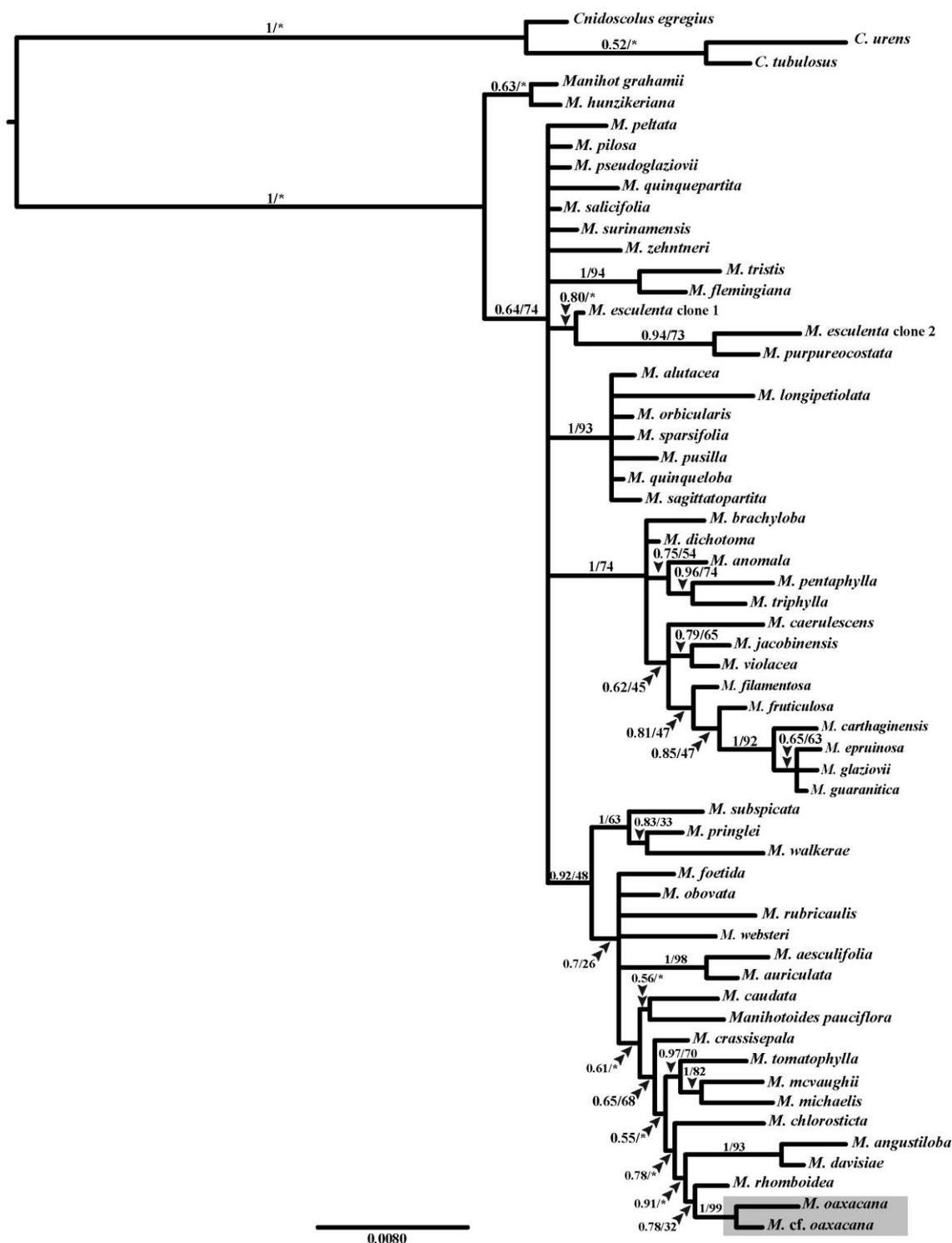
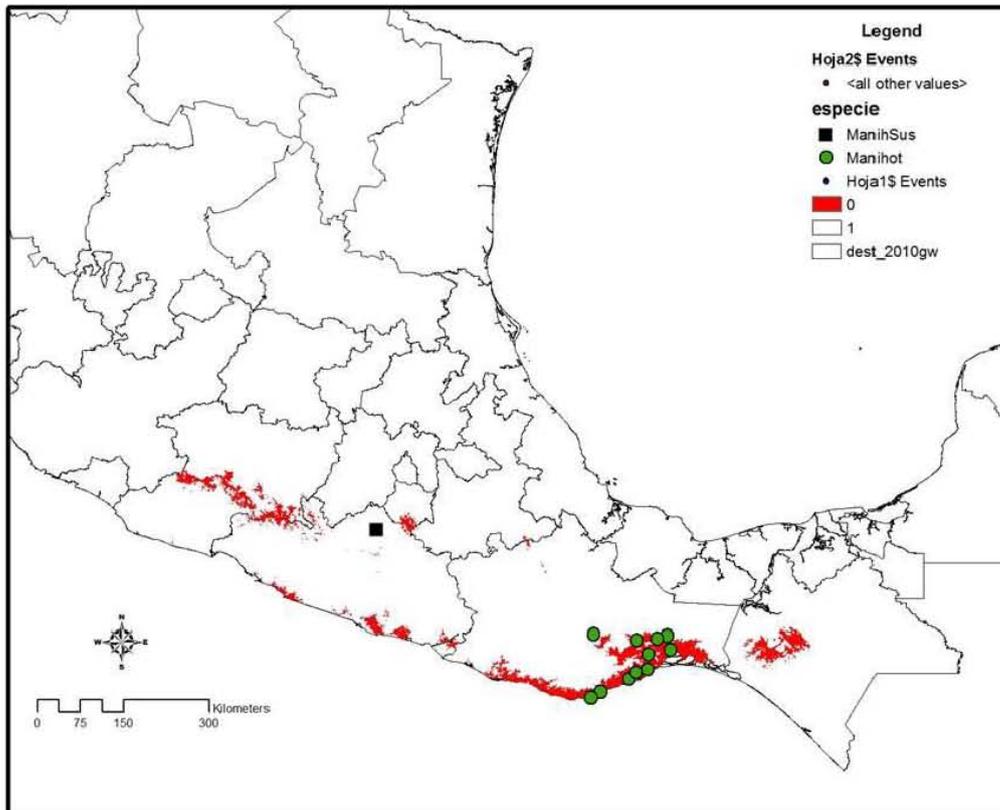


Figura 3.3 Mapa que ilustra la distribución potencial de *M. oaxacana*. 0: Áreas con las condiciones ambientales óptimas para que crezca *M. oaxacana*. 1: Áreas con condiciones ambientales no óptimas para que crezca *M. oaxacana*. Círculos verdes: localidades de *M. oaxacana*. Cuadrado negro: localidad en la que fue encontrada *M. cf. oaxacana*



4. ANÁLISIS DE LA CORRELACIÓN ENTRE EL TAMAÑO CORPORAL, 31 VARIABLES ANATÓMICAS Y 19 VARIABLES BIOCLIMÁTICAS EN LAS ESPECIES NORTEAMERICANAS DE *MANIHOT* (EUPHORBIACEAE)

RESUMEN

Las especies norteamericanas de *Manihot* parecen constituir un modelo apropiado para el estudio de la evolución del tamaño corporal y de los atributos anatómicos correlacionados con él puesto que constituyen un clado cuyas especies exhiben tamaños diversos asociados a hábitos de crecimiento que han evolucionado convergentemente. Adicionalmente, el tamaño en estas especies está correlacionado positivamente con la homogeneidad de la temperatura, temperaturas superiores en la parte más fría del año y mayores precipitaciones, lo que brinda apoyo adicional a la hipótesis de que el tamaño evolucionó de manera adaptativa. En este trabajo fue evaluada la relación entre la circunferencia en la base del tallo y 31 variables anatómicas en 19 de las 20 especies que conforman este clado. La circunferencia y ocho de dichas variables exhiben señal filogenética, aunque aquella detectada en la circunferencia podría ser un efecto del pequeño tamaño de muestra. Adicionalmente, 15 de las variables anatómicas están relacionadas con la circunferencia y correlacionadas entre sí. Cuatro de tales variables están relacionadas con el número de vasos y el área del lumen de los elementos de vaso, tres con el número de radios, el número de hileras que constituye cada radio y el área transversal de las células de los radios y cuatro con el parénquima axial. Sólo dos de las variables relacionadas con la circunferencia involucran atributos de las fibras. El área transversal de los elementos de vaso, la proporción de radios con más de una hilera de células, el área transversal de las células de los radios y la proporción del área transversal del tallo ocupada por los tres tipos de parénquima axial están positivamente relacionadas entre sí. A su vez, tales atributos están negativamente relacionados con el número de vasos y el número de radios. Las variables anatómicas antes mencionadas están correlacionadas con las mismas variables bioclimáticas que la circunferencia, lo que sugiere que cualquier inferencia respecto a la relevancia adaptativa de dichas variables debe ser efectuada tomando en consideración el tamaño corporal. Adicionalmente, estas variables y aquellas no relacionadas con la circunferencia están correlacionadas con variables bioclimáticas con las que la circunferencia no necesariamente lo está.

Palabras clave: tamaño corporal, atributos anatómicos, convergencia, correlaciones tamaño corporal-atributos anatómicos, señal filogenética

INTRODUCCIÓN

El tamaño corporal es uno de los caracteres con mayores implicaciones para el desempeño y la adecuación de los organismos. Consecuentemente, es un atributo que regula de manera determinante las interacciones entre dichos organismos y los miembros de otras especies o entre éstos y el ambiente, tal como ha sido ampliamente documentado tanto en animales (*e.g.* Bonner, 2006; Koehl, 2000; Wikelski, 2005) como en plantas (*e.g.* Aarssen *et al.*, 2006; Enquist, 2003; Givnish, 1995; Westoby *et al.*, 2002) (ver Capítulo 1).

El tallo de las plantas es una estructura que puede contribuir a investigar de manera particularmente fructífera los efectos del tamaño corporal sobre el desempeño de estos organismos. Este órgano está relacionado con gran parte de los procesos indispensables para la vida de las plantas vasculares (*i.e.* la conducción de agua, el almacenamiento de compuestos y el soporte de los tejidos fotosintéticos) y es relativamente sencillo estructuralmente en relación con otros órganos. Su importancia y su relativa simplicidad estructural garantizan, entonces, que sea relativamente sencillo evaluar la relación entre el conjunto de funciones que el tallo hace posible, las características anatómicas responsables de las mismas, las disyuntivas entre dichas funciones y las condiciones ambientales (Carlquist, 1988, 2001 y 2003; Hacke y Sperry, 2001; Holbrook, 1995; Mauseth, 1988; Rosell, 2010; Rosell *et al.*, 2007) (ver Capítulo 1).

Las especies norteamericanas de *Manihot* constituyen un grupo prometedor para el estudio tanto de la evolución del tamaño corporal y las características anatómicas del tallo a él asociadas, como de las condiciones ambientales que pudieron haberla promovido. La hipótesis filogenética más reciente de estas especies sugirió que este conglomerado de alrededor de 20 *taxa* constituye un grupo monofilético en el que el tamaño corporal y las cinco formas de crecimiento a él asociadas han evolucionado convergentemente (Cervantes-Alcayde *et al.*, 2015). No obstante, no puede ser descartada la existencia de señal filogenética sobre el tamaño corporal y los atributos anatómicos de las especies.

Por consiguiente, el objetivo de este capítulo consiste en evaluar la posible existencia de señal filogenética sobre el tamaño corporal y 31 características anatómicas del tallo de las especies norteamericanas de *Manihot*, así como las correlaciones existentes entre éstos y las condiciones ambientales que pudieron haber contribuido a su evolución.

La discusión detallada de los resultados que serán descritos en este capítulo será efectuada en el Capítulo 5, mientras que las conclusiones detalladas serán expuestas en el Capítulo 6.

MATERIALES Y MÉTODOS

Medición del tamaño corporal - Fueron colectadas muestras de la base del tallo de todas las especies norteamericanas de *Manihot*, con la excepción de *M. walkerae*. Como variables indicadoras del tamaño corporal fueron elegidas la longitud y la

circunferencia en la base del tallo. Las longitudes de los individuos muestreados fueron medidas con una cinta métrica, aunque no fue posible hacerlo en varias de las especies. La circunferencia en la base del tallo de las especies de mayor tamaño fue medida con una cinta métrica, mientras que en las especies más pequeñas la circunferencia fue calculada a partir del diámetro de los tallos.

Adicionalmente, fueron revisados 418 ejemplares de las especies norteamericanas de *Manihot* depositados en el Herbario Nacional (MEXU), el Herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM (FCME) y el Herbario Virtual del Jardín Botánico de Missouri (<http://www.tropicos.org>). Fueron extraídos las longitudes y las circunferencias de los ejemplares en los que esta información está reportada. La mayoría de dichos ejemplares sólo cuenta con datos de longitud, de manera que fue ésta la variable empleada para evaluar la existencia de señal filogenética sobre el tamaño corporal en los individuos depositados en los herbarios.

Realización de las preparaciones y obtención de las variables anatómicas -

Los fragmentos de tallo colectados fueron almacenados en etanol acuoso al 70% hasta que fueron hechas las preparaciones. Antes de hacerlas, fueron cortados fragmentos rectangulares de alrededor de 1 cm³ que posteriormente fueron deshidratados y embebidos en parafina (Ruzin, 1999) o PEG (Sandoval-Zapotitla *et al.*, 2005). A partir de estos fragmentos fueron realizados cortes transversales de entre 10 y 15 μ m usando un microtomo rotatorio, que luego fueron teñidos usando la técnica combinada de azul alciano con safranina. Adicionalmente, fueron hechas maceraciones que luego se teñieron con safranina usando solución Jeffrey (Ruzin, 1999). A partir de estas preparaciones y maceraciones fueron medidas 19 variables anatómicas para un individuo de cada una de las 19 especies norteamericanas de *Manihot* de las cuales se tienen muestras. Dichas variables fueron seleccionadas debido a la relevancia fisiológica que les ha sido atribuida, a su relación funcional con atributos presumiblemente relevantes o a la relación observada en el curso de las mediciones entre dichas variables y la circunferencia. Las imágenes de tales variables fueron obtenidas con un microscopio OLYMPUS IX2-UCB (Olympus Co. Ltd, Japan) mientras que las mediciones fueron efectuadas usando el programa Image-Pro Plus v. 7.0 para Windows (Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD). Los nombres, las abreviaturas, la relevancia funcional atribuible a dichos atributos (en caso de ser conocida) y otras variables calculadas a partir de los mismos, así como el número de

mediciones hechas por individuo, aparecen en la Tabla 4.1. Ilustraciones de algunas de las variables aparecen en la Figura 4.1.

Obtención de las variables bioclimáticas y análisis estadísticos - A partir de las coordenadas obtenidas en los lugares de colecta de los individuos anatomizados fueron obtenidos los valores de las 19 variables bioclimáticas incluidas en la *WorldClim Global Climate GIS Database* (<http://www.worldclim.org>) usando la metodología descrita en el Capítulo 3 (ver Apéndice 4.1 para una lista de dichas variables).

La posible existencia de señal filogenética sobre el tamaño corporal y sobre los atributos anatómicos fue evaluada empleando los estadísticos λ (Pagel, 1999) y K (Blomberg, Garland y Ives, 2003), cuyos valores fueron obtenidos usando los paquetes “ape” (Paradis, Claude y Strimmer, 2004) y “phytools” (Revell, 2012) implementados en R (R Development Core Team, 2013).

Una vez obtenidos los valores de λ y de K fue posible determinar cuáles atributos anatómicos podían ser analizados utilizando estadísticos convencionales y cuáles lo serían usando métodos que toman explícitamente en consideración la filogenia. Las correlaciones entre los atributos carentes de señal filogenética y entre éstos y las variables bioclimáticas fueron evaluadas usando el coeficiente de correlación de Pearson (1895) o la *rho* de Spearman (1904) implementados en el programa SPSS (v. 15.0 para Windows). Las correlaciones entre los atributos que exhibieron señal filogenética y entre los mismos y las 19 variables bioclimáticas fueron analizadas usando el método de contrastes independientes (Felsenstein, 1985) implementado en R.

RESULTADOS

Señal filogenética y correlaciones entre el tamaño corporal y las variables anatómicas - La longitud de los ejemplares de *Manihot* depositados en los herbarios consultados no exhibe señal filogenética ($\lambda=0.234$; $K=0.313$, $P=0.249$), mientras que la circunferencia de los individuos a partir de los cuales fueron obtenidas las muestras anatómicas sí presenta señal filogenética. La circunferencia en la base del tallo, así como los promedios de los atributos anatómicos para cada especie y los valores de λ y de K correspondientes a cada carácter morfológico aparecen en la Tabla 4.2. Además de la circunferencia, ocho de las 31 características anatómicas medidas o calculadas exhiben señal filogenética. Cuatro de las ocho características que la exhiben (Nv, NR,

PAV y DEAVM) están entre aquellas más correlacionadas con el resto de los atributos, como puede observarse en la Figura 4.2, en la que son ilustradas las correlaciones con r o $\rho > 0.500$.

Por otro lado, N_v , N_R , PAV, DEAVM y otras once variables están significativamente relacionadas con la circunferencia (Tabla 4.2; Fig. 4.2). IA, PRMH, % Par. Axial, % ATOPAT, ATOPT/ATOV, ATOPAT/ATOPT, AMV, PAV, DEAVM, ArCPR y LoFi están positivamente relacionados con la circunferencia. Esto es, el incremento en el tamaño corporal tiende a estar relacionado con una mayor proporción de vasos agrupados, mayor proporción de radios con más de una hilera de células de parénquima, mayores proporciones del área transversal ocupadas por parénquima axial total, parénquima axial apotraqueal y parénquima axial paratraqueal (sólo si se le corrige por el área transversal ocupada por vasos), mayor proporción de parénquima axial apotraqueal respecto al parénquima axial paratraqueal, mayores área transversal máxima, área transversal promedio y desviación estándar de las áreas de los elementos de vaso, mayores áreas transversales de las células del parénquima radial y mayores longitudes de las fibras. De manera inversa, N_v , N_R , N_H y $LoPaAx/LoFi$ están negativamente relacionados con la circunferencia. Esto implica que el incremento en el tamaño corporal tiende a estar relacionado con menores números de vasos, de radios y de hileras de parénquima radial, así como con un mayor crecimiento intrusivo de las fibras.

Las correlaciones existentes entre las variables anatómicas vinculadas con el tamaño son congruentes con aquellas existentes entre la circunferencia y dichas variables. Esto es, las variables relacionadas positivamente con la circunferencia están también positivamente correlacionadas unas con las otras, aunque la mayoría de ellas está correlacionada con menor número de atributos de lo que lo está la circunferencia. PRMH, ATOPAT y ArCPR destacan debido a la cantidad de variables con la que están correlacionadas, que fue casi la misma que aquella con la que el tamaño corporal lo está. Del mismo modo, las variables negativamente relacionadas con la circunferencia están correlacionadas positivamente unas con las otras y negativamente con aquellas cuya correlación con la circunferencia es positiva, aunque todas ellas están correlacionadas con menor número de atributos de lo que lo está el tamaño. N_v y N_R sobresalen por el gran número de variables con el que están correlacionadas (Fig. 4.2; Apéndice 4.2).

Además de las variables significativamente relacionadas con la circunferencia, tres variables están en el límite de exhibir una correlación significativa con el tamaño corporal. Dichas variables son AnFi, GPF y GPV/AV. Las dos primeras, relacionadas positivamente con el tamaño corporal, sugieren que el incremento en el tamaño tiende a estar relacionado con fibras y paredes de las fibras más anchas. La tercera de estas variables, correlacionada negativamente con la circunferencia, sugiere que el incremento en el tamaño tiende a estar relacionado con elementos de vaso con paredes menos gruesas respecto al área del lumen.

La abrumadora mayoría de las correlaciones con r o $\rho > 0.500$ ocurre entre atributos relacionados con el tamaño corporal (Tabla 4.2; Fig. 4.2), mientras que algo más de la cuarta parte de las correlaciones con valores de r o $\rho < 0.500$ involucra a variables relacionadas con la circunferencia (Ap. 4.2). Es decir, las variables anatómicas no relacionadas con el tamaño corporal muestran una integración muy pobre con el resto de las variables anatómicas si se les compara con los atributos vinculados con la circunferencia.

De particular interés en el caso de atributos no relacionados con la circunferencia son la anchura de las fibras y la longitud y el grosor de la pared tanto de las fibras como de los elementos de vaso. A pesar de constituir atributos de distintos tipos celulares, estas variables están correlacionadas positivamente (Ap. 4.2). Esto sugiere que tales atributos están determinados, al menos parcialmente, por el mismo factor causal (que posiblemente sea ontogenético).

Adicionalmente, si bien las proporciones de área transversal del tallo ocupada por vasos, por fibras y por parénquima radial no estuvieron relacionadas con la circunferencia, la proporción de área transversal ocupada por fibras sí lo estuvo con las otras dos variables y también con la proporción de parénquima axial. Así, la proporción de fibras está negativamente relacionada con la proporción tanto de parénquima radial (Fig. 4.2) como de parénquima axial y de vasos (Ap. 4.2).

Correlaciones entre el tamaño corporal, las variables anatómicas y las variables bioclimáticas - La circunferencia está significativamente relacionada con seis de las 19 variables bioclimáticas. Tales variables son la isothermalidad, la estacionalidad de la temperatura, el promedio de la temperatura del trimestre más frío, la precipitación anual, la precipitación del mes más húmedo y la precipitación del trimestre más húmedo. En resumen, el tamaño corporal está positivamente relacionado con climas en

los que las diferencias entre las temperaturas diarias y anuales más elevadas y más bajas son menores, en donde la desviación estándar de la temperatura es menor y en donde las precipitaciones son superiores, particularmente aquellas de los meses más húmedos. Las variables bioclimáticas vinculadas con la precipitación fueron las que exhibieron los valores más altos de r o de ρ y los valores más elevados de significancia (Figura 4.3).

En la siguiente sección serán descritas algunas tendencias encontradas al analizar cualitativamente la respuesta conjunta de la circunferencia y las variables anatómicas a ella vinculadas con las seis variables bioclimáticas con las que el tamaño corporal está relacionado. En la última sección serán mencionadas ciertas tendencias halladas al analizar cualitativamente la correlación entre todas las variables anatómicas y las variables bioclimáticas con las que la circunferencia no está relacionada.

Correlaciones entre variables anatómicas relacionadas con la circunferencia y las variables bioclimáticas - La respuesta a las variables bioclimáticas de las variables anatómicas relacionadas con el tamaño corporal no es idéntica a la de la circunferencia. No todos los atributos anatómicos están relacionados con las variables bioclimáticas vinculadas a la circunferencia. No obstante, todos ellos son congruentes con el tamaño corporal. Es decir, cuando los atributos anatómicos están positivamente relacionados con la circunferencia y vinculados con la variable bioclimática a la que la circunferencia está asociada, su correlación tiene el mismo signo que la correlación entre el tamaño corporal y dicha variable. Por el contrario, cuando los atributos están negativamente relacionados con la circunferencia y están asociados con la variable bioclimática con la que la circunferencia está correlacionada, su correlación tiene el signo opuesto al de la relación entre el tamaño corporal y dicha variable. La única excepción la constituye IA, correlacionada negativamente con la precipitación del mes más húmedo y la precipitación del trimestre más húmedo cuando la circunferencia está correlacionada positivamente (Fig. 4.3).

Los atributos anatómicos correlacionados con la circunferencia muestran ciertas tendencias en su asociación con las variables bioclimáticas. Los atributos relacionados con el área de los elementos de vaso tienen una relación reducida con las variables bioclimáticas vinculadas con la temperatura, con la excepción de la estacionalidad de la temperatura. Por el contrario, los atributos anatómicos relacionados con el parénquima axial y el parénquima radial están fuertemente vinculados con las variables bioclimáticas relacionadas con la temperatura. En cuanto a las variables bioclimáticas

Tabla 4.1 Lista de las variables anatómicas medidas y de la relevancia funcional que les ha sido atribuida. Tipo de preparación = CT: Corte transversal; M: Maceración. ----- : No aplica. *: Relevancia funcional desconocida. PoÁrTr: Porcentaje del área transversal. EV: Elementos de vaso. ATC: Área total del campo (970,646-2,200,000 μ^2). PR: Parénquima radial. PA: Parénquima axial. PAT: Parénquima axial apotraqueal. PT: Parénquima axial paratraqueal. ATOV: Área transversal ocupada por elementos de vaso. ATOPR: Área transversal ocupada por parénquima radial. ATOPA: Área transversal ocupada por parénquima axial. ^(a): Carlquist, 1988; ^(b): Lev-Yadun, 2001; ^(c): Martínez-Cabrera *et al.*, 2009; ^(d): Sperry, 2003; ^(e): Ziemińska *et al.*, 2013; ^(f): Ziemińska *et al.*, 2015.

Nombre de la variable	Abreviatura	Cálculo	No. de mediciones por especie (Preparación/Aumento)	Relevancia funcional
Número de vasos	Nv	-----	5 campos (CT/10x)	Redundancia de los elementos conductores de agua, que incrementa la seguridad ^(a) .
Índice de agrupamiento	IA	$\frac{\text{No. vasos agrupados}}{\text{No. total de vasos}}$	5 campos (CT/10x)	Misma que Nv ^(a) .
Tamaño promedio por agrupamiento	TPA	$\frac{\text{No. de vasos agrupados}}{\text{No. de agrupamientos}}$	5 campos (CT/10x)	Misma que Nv ^(a) .
Desviación estándar del número de vasos por agrupamiento	DEVAM	-----	5 campos (CT/10x)	*
Número de radios	NR	-----	5 campos (CT/10x)	Almacenamiento de fotosintatos ^(a) . Prevención de embolismos en los vasos ^(c) . Provisión de agua y agentes osmóticos que permiten reparar los embolismos ^(c) . Contribución al módulo de elasticidad ^(f) .

Número de hileras de células por radio	NH	-----	5 campos (CT/10x)	*
Proporción de radios con más de una hilera de células	PRMH	$\frac{\text{No. de radios con más de una hilera de células}}{\text{No. total de radios}}$	5 campos (CT/10x)	*
PoÁrTr ocupada por EV	% Vasos	$\frac{(\sum \text{áreas de todos los elementos de vaso}) * 100}{\text{ATC}}$	5 campos (CT/10x)	Eficiencia conductora por la redundancia de los elementos conductores ^(a) .
PoÁrTr ocupada por PR	% Par. Radial	$\frac{(\sum \text{áreas de todos los radios}) * 100}{\text{ATC}}$	5 campos (CT/10x)	Misma que NR ^(a, c, f) .
PoÁrTr ocupada por PA	% Par. Axial	$\frac{(\sum \text{áreas de todas las células del parénquima axial}) * 100}{\text{ATC}}$	5 campos (CT/10x)	Almacenamiento de fotosintatos ^(a) . Prevención de embolismos en los vasos ^(c) . Provisión de agua y agentes osmóticos que permiten reparar los embolismos ^(c) .
PoÁrTr ocupada por PAT	% ATOPAT	$\frac{(\sum \text{áreas de todas las células del PAT}) * 100}{\text{ATC}}$	5 campos (CT/10x)	Misma que % Par. Axial ^(a, c) .
PoÁrTr ocupada por PT	% ATOPT	$\frac{(\sum \text{áreas de todas las células del PT}) * 100}{\text{ATC}}$	5 campos (CT/10x)	Misma que % Par. Axial ^(a, c) .
PoÁrTr ocupada por fibras	% Fibras	$(\text{ATC} - ((\text{ATOV} + \text{ATOPR} + \text{ATOPA})))$	5 campos (CT/10x)	Densidad de la madera ^(c, e) .
$\frac{\text{Área total ocupada por PT}}{\text{Área total ocupada por EV}}$	ATOPT/ATOV	-----	5 campos (CT/10x)	Misma que % Par. Axial ^(a, c) .
$\frac{\text{Área total ocupada por PAT}}{\text{Área total ocupada por PT}}$	ATOPAT/ATOPT	-----	5 campos (CT/10x)	*
Área transversal máxima de los EV	AMV	-----	Una célula	*
Promedio de las áreas transversales de los EV	PAV	$\frac{\sum \text{áreas de todos los elementos de vaso}}{\text{No. total de elementos de vaso}}$	5 campos (CT/10x)	Eficiencia y seguridad en la conducción de agua ^(a, f) .

Desviación estándar de las áreas de los EV	DEAVM	-----	5 campos (CT/10x)	*
Grosor de la pared de los EV	GPV	-----	10 células (CT/100x)	Prevención de la deformación de los elementos de vaso causada por tensiones elevadas ^(a) . Contribución al módulo de elasticidad ^(f) .
$\frac{\text{Grosor de la pared del EV}}{\text{Área transversal del EV}}$	GPV/AV	-----	10 células (CT/100x/40x)	Resistencia a la cavitación ^(a)
Grosor de la pared de las fibras	GPF	-----	10 células (CT/100x)	Sostén ^(a) . Contribución al módulo de elasticidad ^(f) . Densidad de la madera ^(c, e) . Resistencia a la cavitación ^(a, e) .
Área del lumen de la fibra	ALF	-----	10 células (CT/100x)	Densidad de la madera ^(c, e)
$\frac{\text{Grosor de la pared de la fibra}}{\text{Área del lumen de la fibra}}$	GPF/ALF	-----	-----	Sostén ^(a) . Densidad de la madera ^(c, e) . Resistencia a la cavitación ^(a, e)
Área transversal de las células del parénquima radial	ArCPR	(Longitud de la célula)*(Anchura de la célula)	10 células (CT/40x)	*
Longitud de las fibras	LoFi	-----	10 células (M/10x)	Rigidez ^(a) . Densidad ^(c) .
Anchura de las fibras	AnFi	-----	10 células (M/40x)	Densidad ^(c)
$\frac{\text{Longitud de las fibras}}{\text{Anchura de las fibras}}$	AnFi/LoFi	-----	-----	Densidad ^(c)

Longitud de los elementos de vaso	LoVa	-----	10 células (M/10x)	Longitudes reducidas podrían incrementar la resistencia a la tensión al impedir que las células se deformen o al aislar los embolismos ^(a) .
Longitud de las células del parénquima axial	LoPaAx	-----	10 células (M/40x)	*
<u>Longitud de las células del PA</u> Longitud de las fibras	LoPaAx/LoFi	-----	-----	Rigidez ^(a) . Resistencia a la cavitación de la red de vasos ^(b, d) .
<u>Longitud de las células del PA</u> Longitud de los EV	LoPaAx/LoVa	-----	-----	*

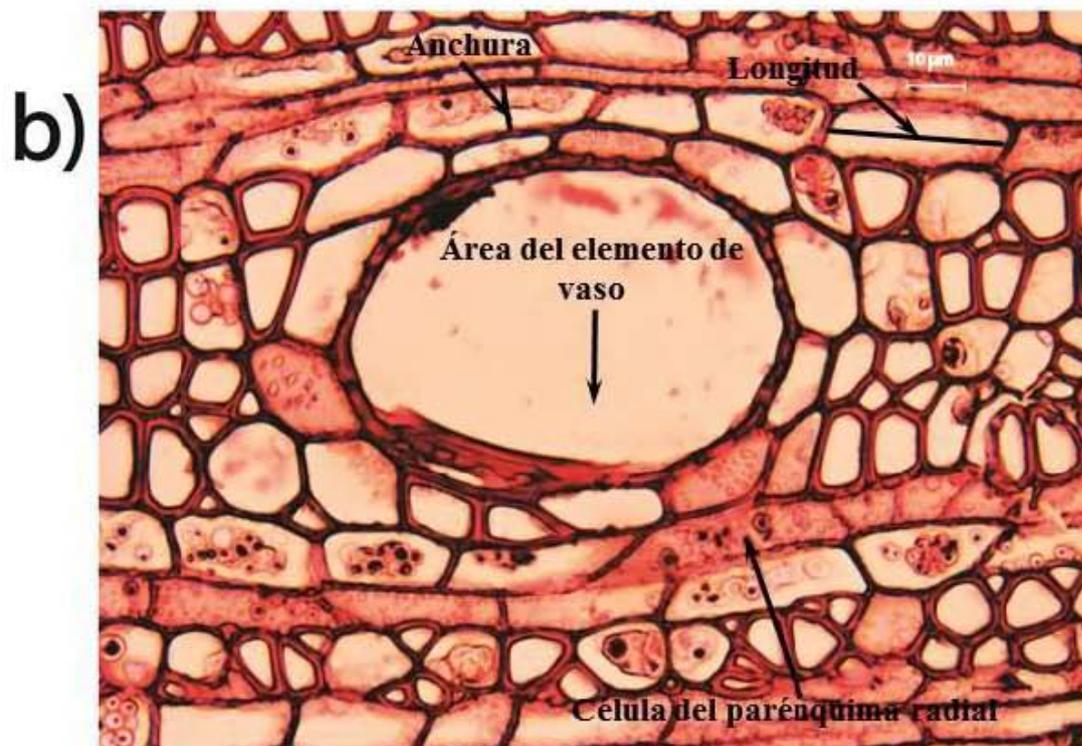
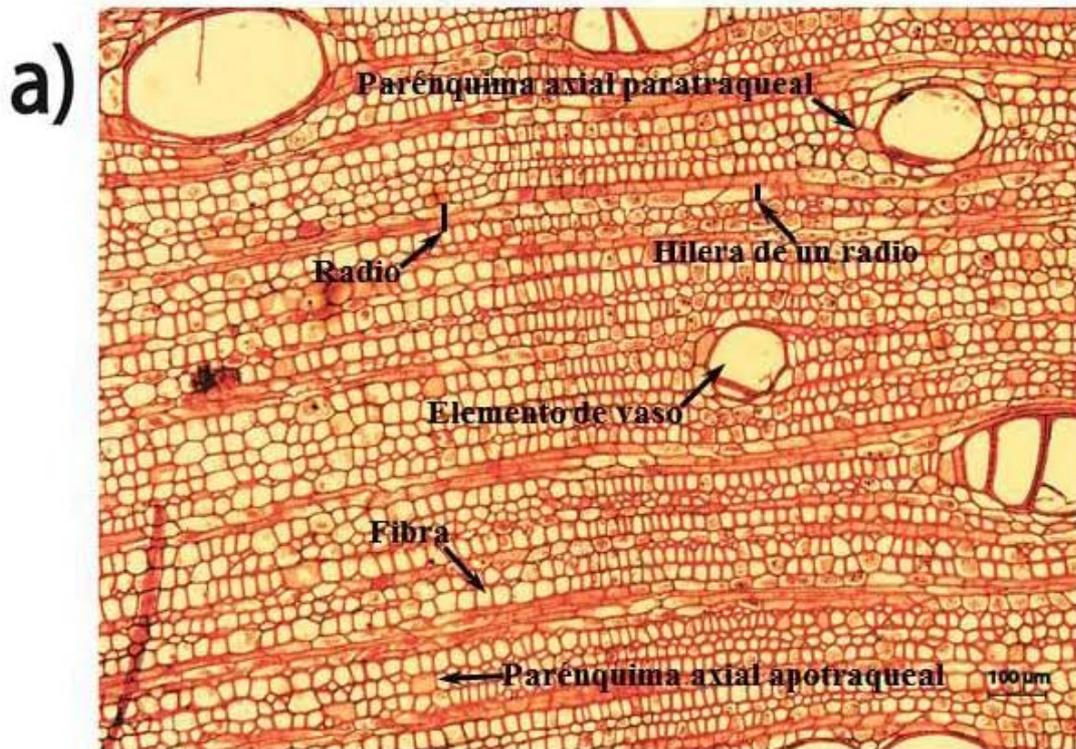
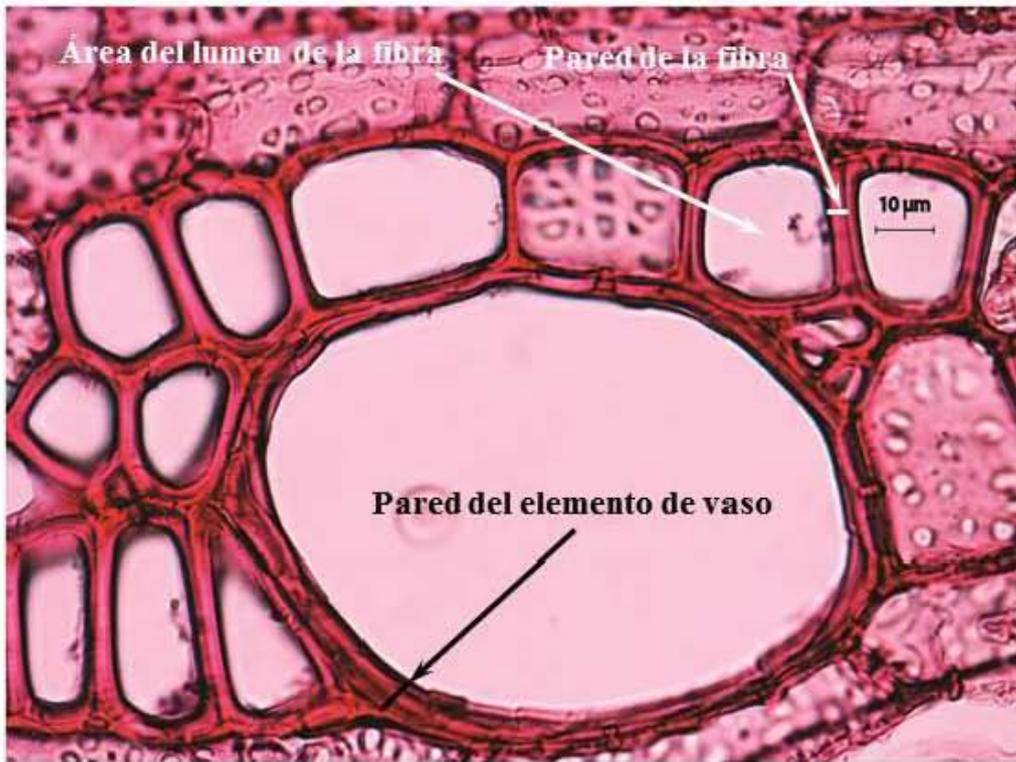
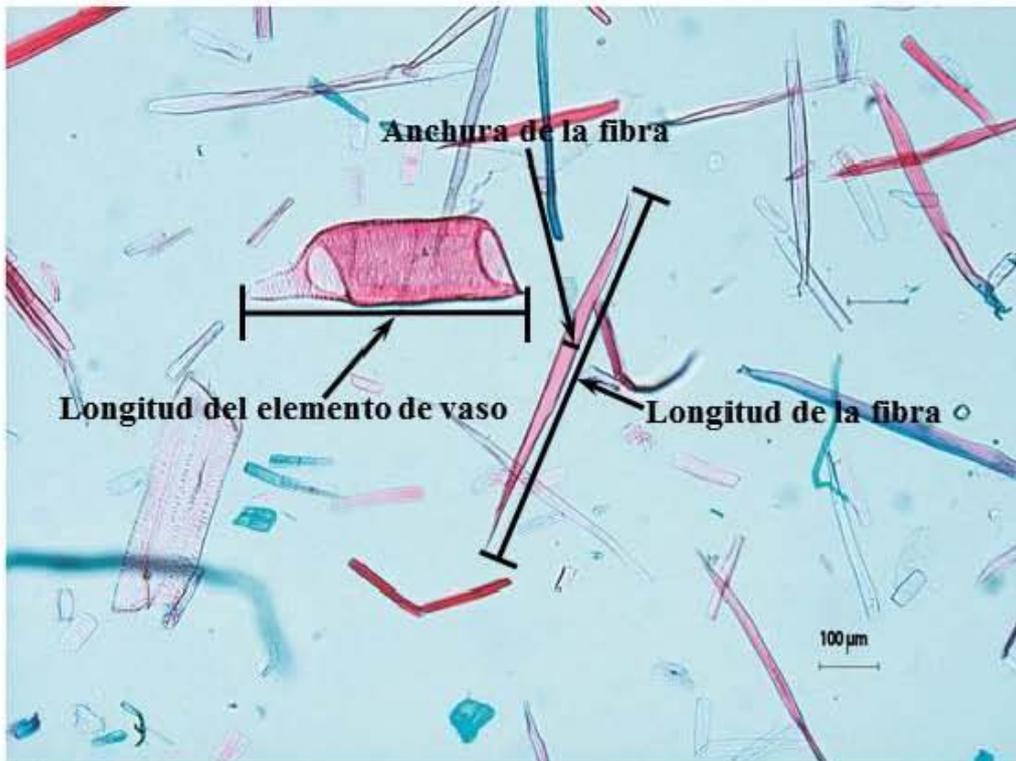


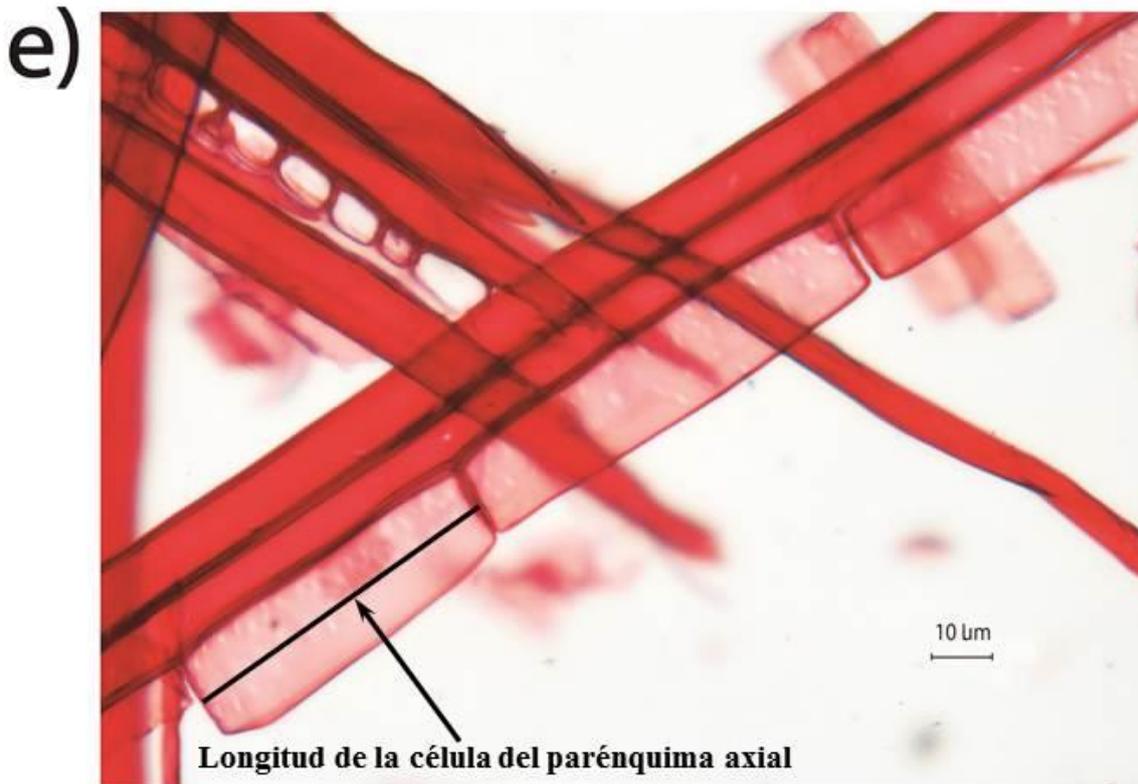
Figura 4.1 Fotografías en las que son mostradas algunas de las células y variables anatómicas medidas. a) Corte transversal observado con un aumento de 10x. b) Detalle del mismo corte transversal observado con un aumento de 40x. c) Corte transversal observado con un aumento de 100x. d) Maceración observada a 10x. e) Maceración observada a 40x.

c)



d)





relacionadas con la precipitación, los atributos vinculados con el área de los elementos de vaso tienen una relación intensa con las mismas (con la excepción de AMV), mientras que los atributos anatómicos relacionados con el parénquima axial y el parénquima radial están menos frecuentemente relacionados con estas variables de lo que lo están con aquellas vinculadas a la temperatura (Fig. 4.3).

Correlaciones entre las variables anatómicas y las variables bioclimáticas no relacionadas con la circunferencia - La mayor parte de los atributos anatómicos relacionados con la circunferencia están correlacionados también con variables bioclimáticas con las que el tamaño corporal no lo está. Entre los patrones encontrados en dichas correlaciones, se tiene que ArCPR tiende a estar positivamente relacionada con la estacionalidad de la precipitación y a estarlo negativamente con las precipitaciones del trimestre más frío y del mes y trimestre más secos. PRMH tiende a estar positivamente relacionada con las precipitaciones anual y del mes y trimestre más húmedos, así como con la estacionalidad de la precipitación; inversamente, tiende a estar negativamente correlacionada con las precipitaciones del trimestre más frío y del mes y trimestre más secos. % Par. Axial y los atributos asociados tienden a estar

Tabla 4.2. Promedio de las variables anatómicas medidas o calculadas para diecinueve especies norteamericanas de *Manihot*. Los números en negritas representan los valores mínimo y máximo de cada atributo. § : atributo con señal filogenética. En el rectángulo gris están reportados los valores de correlación entre la circunferencia y la variable anatómica; *: $0.05 \geq p \geq 0.01$, **: $p \leq 0.01$; para TPA y PAV, el segundo valor reportado es el de la desviación estándar del atributo.

	Circunferencia (cm ²) §	Nv §	IA	TPA	NR §	NH §	PRMH
	$\lambda = 0.625$	$\lambda = 0.659$	$\lambda = 0.0001$	$\lambda = 0.0001$	$\lambda = 0.425$	$\lambda = 0.271$	$\lambda = 0.393$
	K = 0.640	K = 0.574	K = 0.246	K = 0.441	K = 0.574	K = 0.509	K = 0.391
	P = 0.008	P = 0.008	P = 0.542	P = 0.071	P = 0.003	P = 0.015	P = 0.082
	----	-0.774 **	0.497 *	NS/NS	-0.853 **	-0.682 **	0.616 **
<i>M. aesculifolia</i>	12.45	7.52 ± 1.60	0.44 ± 0.15	2.10 ± 0.41	31.36 ± 12.35	37.29 ± 13.00	0.1838 ± 0.10
<i>M. angustiloba</i>	3.83	77.24 ± 23.14	0.79 ± 0.12	4.09 ± 2.30	34.14 ± 7.79	36.18 ± 7.48	0.0632 ± 0.04
<i>M. auriculata</i>	5.00	13.82 ± 3.04	0.78 ± 0.10	2.54 ± 0.72	27.17 ± 5.45	33.46 ± 7.13	0.2291 ± 0.03
<i>M. caudata</i>	72.00	10.80 ± 1.30	0.87 ± 0.09	3.47 ± 1.92	14.80 ± 1.30	24.40 ± 1.52	0.5557 ± 0.05
<i>M. chlorosticta</i>	9.85	22.41 ± 9.43	0.71 ± 0.12	3.64 ± 2.20	27.04 ± 5.60	33.44 ± 3.81	0.3142 ± 0.03
<i>M. crassisejala</i>	39.00	17.04 ± 8.42	0.79 ± 0.13	8.28 ± 5.80	17.58 ± 0.49	21.47 ± 2.60	0.2224 ± 0.16
<i>M. davisiae</i>	4.56	58.23 ± 31.54	0.76 ± 0.12	3.53 ± 2.15	35.34 ± 10.14	38.20 ± 11.05	0.0817 ± 0.05
<i>M. foetida</i>	46.27	9.36 ± 2.32	0.87 ± 0.12	3.17 ± 1.22	17.98 ± 1.44	24.54 ± 2.01	0.3658 ± 0.06
<i>M. mcvaughii</i>	9.64	33.04 ± 6.36	0.75 ± 0.08	4.46 ± 3.26	25.46 ± 2.76	25.88 ± 3.25	0.0149 ± 0.02
<i>M. michaelis</i>	31.00	20.60 ± 9.58	0.69 ± 0.39	3.45 ± 2.94	20.80 ± 1.92	23.80 ± 1.92	0.1458 ± 0.05
<i>M. oaxacana</i>	16.20	24.94 ± 8.00	0.85 ± 0.10	4.48 ± 3.65	29.02 ± 5.78	33.32 ± 6.57	0.1495 ± 0.04
<i>M. obovata</i>	16.47	34.82 ± 14.92	0.80 ± 0.11	3.25 ± 1.82	24.74 ± 3.47	25.74 ± 3.70	0.0404 ± 0.03
<i>M. pauciflora</i>	19.00	34.01 ± 14.25	0.92 ± 0.09	6.17 ± 7.48	20.61 ± 3.45	23.02 ± 4.33	0.1180 ± 0.09
<i>M. pringlei</i>	8.30	43.02 ± 6.68	0.90 ± 0.07	10.26 ± 3.77	23.48 ± 4.31	23.88 ± 3.60	0.0235 ± 0.05
<i>M. rhomboidea</i>	4.06	47.25 ± 9.22	0.62 ± 0.09	3.17 ± 1.50	36.86 ± 3.85	38.28 ± 4.17	0.0385 ± 0.03
<i>M. rubricaulis</i>	3.00	31.18 ± 9.00	0.59 ± 0.27	3.11 ± 1.80	40.50 ± 7.83	42.05 ± 8.48	0.0387 ± 0.09
<i>M. subspicata</i>	1.23	234.38 ± 41.61	0.76 ± 0.05	3.44 ± 2.07	90.46 ± 8.56	90.80 ± 8.15	0.0042 ± 0.01
<i>M. tomatophylla</i>	83.00	10.75 ± 5.37	0.70 ± 0.22	3.08 ± 1.61	11.33 ± 1.31	15.56 ± 1.54	0.3600 ± 0.12
<i>M. websteri</i>	45.00	13.79 ± 9.60	0.84 ± 0.10	3.37 ± 2.13	21.29 ± 2.50	26.60 ± 3.06	0.2523 ± 0.09

	% Vasos	% Par. Radial	% Par. Axial	% ATOPAT	% ATOPT	% Fibras	ATOPT/ATOV
	$\lambda = 0.233$	$\lambda = 0.0001$	$\lambda = 0.0001$	$\lambda = 0.038$	$\lambda = 0.0001$	$\lambda = 0.0001$	$\lambda = 0.0001$
	$K = 0.317$	$K = 0.187$	$K = 0.222$	$K = 0.284$	$K = 0.190$	$K = 0.158$	$K = 0.293$
	$P = 0.259$	$P = 0.895$	$P = 0.704$	$P = 0.386$	$P = 0.863$	$P = 0.991$	$P = 0.325$
	NS	NS	0.612 **	0.662 **	NS	NS	0.474 *
<i>M. aesculifolia</i>	4.25 ± 0.86	24.67 ± 3.20	2.73 ± 0.37	2.49 ± 0.32	0.24 ± 0.10	68.35 ± 2.71	0.06 ± 0.030
<i>M. angustiloba</i>	9.98 ± 1.61	25.25 ± 3.87	2.92 ± 0.27	2.21 ± 0.14	0.71 ± 0.19	61.85 ± 3.34	0.07 ± 0.013
<i>M. auriculata</i>	5.09 ± 1.00	31.37 ± 2.45	4.63 ± 0.83	4.19 ± 0.66	0.44 ± 0.18	58.91 ± 2.47	0.09 ± 0.043
<i>M. caudata</i>	8.00 ± 2.24	27.80 ± 2.61	3.88 ± 1.99	3.47 ± 1.74	0.42 ± 0.28	60.32 ± 4.23	0.06 ± 0.055
<i>M. chlorosticta</i>	9.95 ± 2.79	33.99 ± 1.89	6.34 ± 0.79	5.71 ± 0.78	0.63 ± 0.07	49.71 ± 3.70	0.07 ± 0.022
<i>M. crassisejala</i>	4.77 ± 0.51	22.31 ± 1.22	5.15 ± 0.36	4.86 ± 0.34	0.29 ± 0.09	67.77 ± 1.79	0.06 ± 0.019
<i>M. davisiae</i>	7.38 ± 1.47	28.32 ± 2.61	2.32 ± 0.46	1.91 ± 0.42	0.41 ± 0.13	61.98 ± 3.03	0.06 ± 0.030
<i>M. foetida</i>	4.59 ± 1.15	23.34 ± 2.18	5.44 ± 0.68	5.18 ± 0.59	0.26 ± 0.11	66.62 ± 3.21	0.06 ± 0.012
<i>M. mcvaughii</i>	6.16 ± 0.73	19.32 ± 2.48	1.91 ± 0.17	1.78 ± 0.15	0.13 ± 0.06	72.61 ± 2.13	0.02 ± 0.010
<i>M. michaelis</i>	7.05 ± 2.20	23.97 ± 1.51	3.44 ± 0.37	3.10 ± 0.28	0.34 ± 0.12	65.54 ± 3.12	0.05 ± 0.017
<i>M. oaxacana</i>	7.92 ± 2.30	29.58 ± 2.17	6.17 ± 0.84	5.81 ± 0.84	0.37 ± 0.06	56.33 ± 2.72	0.05 ± 0.013
<i>M. obovata</i>	7.22 ± 1.43	21.57 ± 2.10	4.34 ± 1.07	3.86 ± 1.08	0.48 ± 0.13	66.87 ± 1.83	0.07 ± 0.024
<i>M. pauciflora</i>	6.74 ± 1.06	27.38 ± 1.70	3.49 ± 0.29	3.07 ± 0.42	0.42 ± 0.18	62.39 ± 1.53	0.06 ± 0.020
<i>M. pringlei</i>	6.60 ± 1.00	28.98 ± 3.46	3.61 ± 0.44	3.00 ± 0.49	0.61 ± 0.14	60.80 ± 4.16	0.10 ± 0.036
<i>M. rhomboidea</i>	9.86 ± 0.80	21.79 ± 2.80	1.79 ± 0.55	1.58 ± 0.51	0.21 ± 0.05	66.56 ± 2.85	0.02 ± 0.004
<i>M. rubricaulis</i>	6.13 ± 1.22	26.67 ± 4.03	2.72 ± 0.55	2.37 ± 0.59	0.34 ± 0.12	64.48 ± 3.90	0.05 ± 0.014
<i>M. subspicata</i>	12.70 ± 3.90	25.54 ± 1.55	0.97 ± 0.15	0.67 ± 0.07	0.30 ± 0.10	60.78 ± 4.26	0.02 ± 0.002
<i>M. tomatophylla</i>	7.37 ± 2.84	18.61 ± 2.64	5.58 ± 1.00	4.89 ± 0.92	0.69 ± 0.19	68.44 ± 1.88	0.10 ± 0.035
<i>M. websteri</i>	4.13 ± 1.44	26.00 ± 2.59	4.41 ± 0.25	4.05 ± 0.41	0.36 ± 0.19	65.45 ± 1.98	0.08 ± 0.015

	ATOPAT/ATOPT §	AMV (μ^2)	PAV (μ^2) §	GPV (μ)	GPV/AV	GPF (μ)
	$\lambda = 0.549$	$\lambda = 0.368$	$\lambda = 0.562$	$\lambda = 0.134$	$\lambda = 0.0001$	$\lambda = 0.0001$
	$K = 0.456$	$K = 0.414$	$K = 0.503$	$K = 0.298$	$K = 0.286$	$K = 0.276$
	$P = 0.035$	$P = 0.076$	$P = 0.015$	$P = 0.279$	$P = 0.357$	$P = 0.383$
	0.616 **	0.571 *	0.690 **/0.723 **	NS	NS	NS
<i>M. aesculifolia</i>	11.33 ± 3.68	22,000	12,736.90 ± 5,161.11	2.69 ± 0.40	0.00016 ± 0.00003	1.77 ± 0.33
<i>M. angustiloba</i>	3.28 ± 0.78	17,000	3,109.59 ± 2,885.75	4.54 ± 1.09	0.00062 ± 0.00023	1.76 ± 0.66
<i>M. auriculata</i>	10.64 ± 3.85	25,000	10,264.76 ± 7,036.40	4.35 ± 0.82	0.00029 ± 0.00026	2.23 ± 0.63
<i>M. caudata</i>	9.35 ± 2.96	74,000	17,186.09 ± 19,084.96	6.47 ± 2.04	0.00045 ± 0.00066	2.68 ± 0.62
<i>M. chlorosticta</i>	9.17 ± 1.50	39,000	9,594.26 ± 10,031.22	4.63 ± 1.05	0.00027 ± 0.00010	1.86 ± 0.59
<i>M. crassisejala</i>	18.04 ± 6.41	26,000	6,328.15 ± 7,066.13	4.10 ± 0.63	0.00033 ± 0.00012	2.39 ± 0.53
<i>M. davisiae</i>	5.08 ± 2.11	12,000	3,055.74 ± 839.01	2.88 ± 0.53	0.00039 ± 0.00009	1.92 ± 0.55
<i>M. foetida</i>	22.41 ± 8.68	39,000	10,768.93 ± 9,597.99	4.39 ± 0.88	0.00050 ± 0.00049	2.58 ± 0.49
<i>M. mcvaughii</i>	15.79 ± 5.49	17,000	4,054.66 ± 3,820.24	3.78 ± 1.00	0.00052 ± 0.00030	2.22 ± 0.44
<i>M. michaelis</i>	9.95 ± 3.34	60,000	7,157.07 ± 9,925.27	4.97 ± 0.72	0.00029 ± 0.00022	2.59 ± 0.31
<i>M. oaxacana</i>	16.22 ± 3.94	35,000	6,955.77 ± 7,252.15	5.03 ± 1.08	0.00028 ± 0.00009	2.04 ± 0.53
<i>M. obovata</i>	8.69 ± 3.95	38,000	4,437.32 ± 4,966.50	3.91 ± 1.18	0.00133 ± 0.00213	1.79 ± 0.60
<i>M. pauciflora</i>	8.71 ± 4.18	24,000	4,304.97 ± 4,802.51	5.36 ± 1.06	0.00063 ± 0.00031	2.12 ± 0.58
<i>M. pringlei</i>	5.14 ± 1.67	16,000	3,384.12 ± 3,522.98	4.44 ± 0.58	0.00056 ± 0.00029	2.54 ± 0.49
<i>M. rhomboidea</i>	7.65 ± 1.81	19,000	4,629.16 ± 4,269.85	4.14 ± 0.98	0.00061 ± 0.00049	2.57 ± 0.52
<i>M. rubricaulis</i>	8.74 ± 6.61	19,000	4,219.38 ± 4,009.05	3.98 ± 0.62	0.00049 ± 0.00030	1.89 ± 0.45
<i>M. subspicata</i>	2.43 ± 1.00	12,000	1,197.20 ± 1,711.87	2.96 ± 0.86	0.00071 ± 0.00035	1.82 ± 0.25
<i>M. tomatophylla</i>	7.49 ± 1.94	53,000	14,755.02 ± 14,516.54	5.65 ± 0.84	0.00022 ± 0.00009	2.47 ± 0.45
<i>M. websteri</i>	13.38 ± 5.46	26,000	5,925.15 ± 7,305.04	4.91 ± 0.59	0.00048 ± 0.00038	2.72 ± 0.32

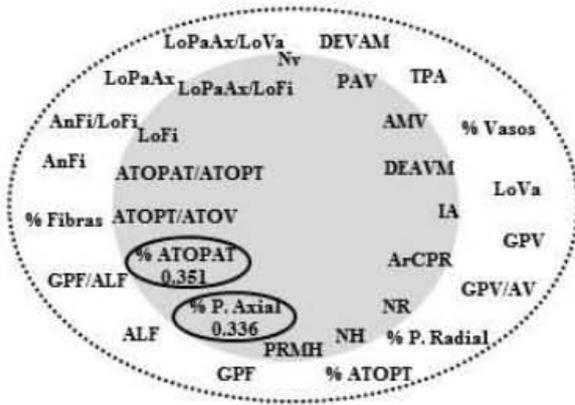
	ALF (μ)	GPF/ALF	ArCPR (μ^2)	LoFi (μ)	AnFi (μ)	AnFi/LoFi
	$\lambda = 0.262$	$\lambda = 0.00001$	$\lambda = 0.100$	$\lambda = 0.173$	$\lambda = 0.123$	$\lambda = 0.0001$
	K = 0.317	K = 0.220	K = 0.313	K = 0.355	K = 0.344	K = 0.201
	P = 0.256	P = 0.709	P = 0.267	P = 0.15	P = 0.191	P = 0.809
	NS	NS	0.704 **	0.606 **	NS	NS
<i>M. aesculifolia</i>	319.79 ± 91.84	0.0060 ± 0.0022	278.81 ± 89.14	899.40 ± 197.58	30.70 ± 5.60	0.0354 ± 0.0090
<i>M. angustiloba</i>	162.72 ± 66.83	0.0139 ± 0.0099	216.62 ± 71.47	772.02 ± 187.78	27.03 ± 2.94	0.0363 ± 0.0067
<i>M. auriculata</i>	272.89 ± 142.85	0.0118 ± 0.0087	323.36 ± 84.09	911.94 ± 124.34	29.31 ± 5.82	0.0324 ± 0.0067
<i>M. caudata</i>	409.90 ± 134.24	0.0072 ± 0.0025	531.95 ± 176.05	876.53 ± 149.18	34.94 ± 6.87	0.0400 ± 0.0048
<i>M. chlorosticta</i>	273.54 ± 63.43	0.0073 ± 0.0033	366.38 ± 90.93	874.63 ± 124.21	31.54 ± 4.57	0.0369 ± 0.0085
<i>M. crassisejala</i>	221.41 ± 103.08	0.0126 ± 0.0050	299.53 ± 63.70	1070.72 ± 195.50	32.54 ± 5.27	0.0313 ± 0.0074
<i>M. davisiae</i>	179.79 ± 85.81	0.0146 ± 0.0111	205.03 ± 82.03	682.52 ± 93.74	25.62 ± 4.88	0.0377 ± 0.0059
<i>M. foetida</i>	280.88 ± 150.95	0.0117 ± 0.0060	488.89 ± 175.47	907.50 ± 101.95	31.09 ± 3.38	0.0345 ± 0.0044
<i>M. mcvaughii</i>	247.66 ± 72.28	0.0100 ± 0.0049	247.17 ± 59.87	708.23 ± 109.71	29.93 ± 4.28	0.0439 ± 0.0128
<i>M. michaelis</i>	339.63 ± 290.65	0.0109 ± 0.0060	401.01 ± 131.34	973.17 ± 96.74	38.45 ± 11.66	0.0398 ± 0.0123
<i>M. oaxacana</i>	202.88 ± 83.78	0.0108 ± 0.0032	357.02 ± 134.48	851.17 ± 185.33	35.88 ± 3.93	0.0436 ± 0.0080
<i>M. obovata</i>	265.49 ± 272.72	0.0136 ± 0.0121	221.09 ± 129.70	877.33 ± 157.61	26.65 ± 3.68	0.0309 ± 0.0051
<i>M. pauciflora</i>	684.02 ± 232.55	0.0036 ± 0.0021	397.33 ± 122.77	813.70 ± 128.42	38.67 ± 4.31	0.0483 ± 0.0072
<i>M. pringlei</i>	288.54 ± 86.95	0.0098 ± 0.0041	287.40 ± 116.73	877.95 ± 53.26	34.27 ± 8.62	0.0389 ± 0.0092
<i>M. rhomboidea</i>	166.35 ± 54.42	0.0170 ± 0.0062	232.18 ± 72.98	727.01 ± 127.78	25.60 ± 3.64	0.0359 ± 0.0071
<i>M. rubricaulis</i>	250.34 ± 102.82	0.0090 ± 0.0049	198.18 ± 77.93	696.95 ± 74.73	34.97 ± 5.63	0.0507 ± 0.0092
<i>M. subspicata</i>	157.68 ± 73.25	0.0163 ± 0.0143	165.43 ± 68.29	638.96 ± 100.22	22.71 ± 4.43	0.0360 ± 0.0073
<i>M. tomatophylla</i>	324.77 ± 180.54	0.0105 ± 0.0070	500.65 ± 264.06	1096.41 ± 241.13	33.22 ± 4.95	0.0318 ± 0.0093
<i>M. websteri</i>	246.27 ± 80.53	0.0120 ± 0.0035	356.77 ± 85.86	1120.77 ± 120.59	35.99 ± 3.75	0.0324 ± 0.0045

	LoVa (μ)	LoPaAx	LoPaAx/LoFi §	LoPaAx/LoVa §
	$\lambda = 0.00001$	$\lambda = 0.212$	$\lambda = 0.527$	$\lambda = 0.746$
	$K = 0.223$	$K = 0.351$	$K = 0.482$	$K = 0.578$
	$P = 0.540$	$P = 0.183$	$P = 0.033$	$P = 0.016$
	NS	NS	-0.476 *	NS
<i>M. aesculifolia</i>	463.55 \pm 112.83	152.40 \pm 51.13	0.1694 \pm 0.0595	0.3288 \pm 0.1355
<i>M. angustiloba</i>	439.08 \pm 125.09	139.07 \pm 27.80	0.1801 \pm 0.0587	0.3167 \pm 0.1263
<i>M. auriculata</i>	435.94 \pm 85.49	155.76 \pm 34.50	0.1708 \pm 0.0588	0.3573 \pm 0.0947
<i>M. caudata</i>	623.27 \pm 86.65	117.59 \pm 20.79	0.1342 \pm 0.0474	0.1887 \pm 0.0471
<i>M. chlorosticta</i>	454.29 \pm 124.84	136.65 \pm 29.92	0.1562 \pm 0.0682	0.3008 \pm 0.1757
<i>M. crassisejala</i>	482.89 \pm 107.88	118.12 \pm 28.96	0.1103 \pm 0.0355	0.2446 \pm 0.0901
<i>M. davisiae</i>	347.67 \pm 115.14	111.82 \pm 29.48	0.1638 \pm 0.0620	0.3216 \pm 0.1146
<i>M. foetida</i>	500.95 \pm 81.51	126.94 \pm 23.55	0.1399 \pm 0.0281	0.2534 \pm 0.0622
<i>M. mcvaughii</i>	486.67 \pm 86.79	114.06 \pm 27.32	0.1610 \pm 0.0508	0.2344 \pm 0.0558
<i>M. michaelis</i>	628.43 \pm 99.39	163.61 \pm 57.43	0.1681 \pm 0.0617	0.2603 \pm 0.1153
<i>M. oaxacana</i>	522.70 \pm 140.67	149.98 \pm 36.06	0.1762 \pm 0.0628	0.2869 \pm 0.1651
<i>M. obovata</i>	538.91 \pm 74.89	109.66 \pm 24.92	0.1250 \pm 0.0326	0.2035 \pm 0.0589
<i>M. pauciflora</i>	477.77 \pm 77.61	132.30 \pm 33.87	0.1626 \pm 0.0379	0.2769 \pm 0.1001
<i>M. pringlei</i>	662.98 \pm 89.76	130.76 \pm 36.45	0.1489 \pm 0.0378	0.1972 \pm 0.0662
<i>M. rhomboidea</i>	397.46 \pm 81.60	139.10 \pm 52.50	0.1913 \pm 0.0910	0.3500 \pm 0.1759
<i>M. rubricaulis</i>	504.18 \pm 49.13	126.35 \pm 24.35	0.1813 \pm 0.0444	0.2506 \pm 0.0531
<i>M. subspicata</i>	530.53 \pm 180.61	99.04 \pm 14.56	0.1550 \pm 0.0379	0.1867 \pm 0.1690
<i>M. tomatophylla</i>	652.16 \pm 96.83	133.86 \pm 57.15	0.1221 \pm 0.0446	0.2053 \pm 0.1480
<i>M. websteri</i>	644.37 \pm 134.66	139.91 \pm 50.68	0.1248 \pm 0.0419	0.2171 \pm 0.0956

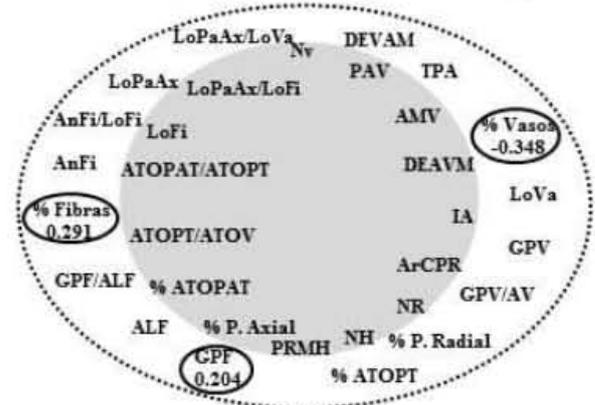
positivamente relacionados con las temperaturas anual, del trimestre más seco y del mes y trimestre más fríos, así como con la estacionalidad de la precipitación; estos atributos tienden a estar negativamente relacionados con la variación anual de la temperatura y las precipitaciones del trimestre más frío y del mes y trimestre más secos. LoFi tiende a estar positivamente relacionada con las temperaturas anual y del mes y trimestre más fríos, tendiendo a estarlo negativamente con la variación anual de la temperatura y las precipitaciones del trimestre más frío y del mes y trimestre más secos.

En cuanto a las variables no correlacionadas con el tamaño corporal, son encontradas las siguientes correlaciones. TPA tiende a estar negativamente correlacionado con las precipitaciones anual, del trimestre más húmedo y del trimestre más cálido. % Vasos tiende a estar correlacionado positivamente con las precipitaciones del mes y trimestre más secos y del trimestre más frío del año, tendiendo a estarlo negativamente con la variación diurna de la temperatura. GPV tiende a estar correlacionado positivamente con la isothermalidad y a estarlo negativamente con la estacionalidad de la temperatura y las temperaturas promedio de los trimestres más húmedo y más cálido del año, así como las precipitaciones de los trimestres más cálido y más frío. GPV/AV tiende a estar correlacionado positivamente con la estacionalidad de la temperatura, la variación anual de la temperatura y la precipitación del trimestre más seco, tendiendo a estarlo negativamente con la isothermalidad, la temperatura mínima del mes más frío, la estacionalidad de la precipitación y las precipitaciones del mes y trimestre más húmedos. DEVAM tiende a estar correlacionada negativamente con la isothermalidad y las precipitaciones anual, del trimestre más cálido y del mes y trimestre más húmedos. % Par. Radial tiende a estar correlacionado positivamente con la estacionalidad de la temperatura y a estarlo negativamente con la isothermalidad, las temperaturas máxima del mes más cálido y promedio del trimestre más frío y las precipitaciones anual y del trimestre más húmedo. % Fibras tiende a estar correlacionado positivamente con la variación diurna de la temperatura, la isothermalidad, la temperatura máxima del mes más cálido y la precipitación del trimestre más húmedo, tendiendo a estarlo negativamente con la estacionalidad de la temperatura y las precipitaciones del trimestre más cálido y del mes y trimestre más secos. GPF tiende a estar correlacionado positivamente con la variación diurna de temperatura y a estarlo negativamente con las temperaturas promedio de los trimestres más húmedo y más cálido. ALF tiende a estar correlacionada negativamente con las

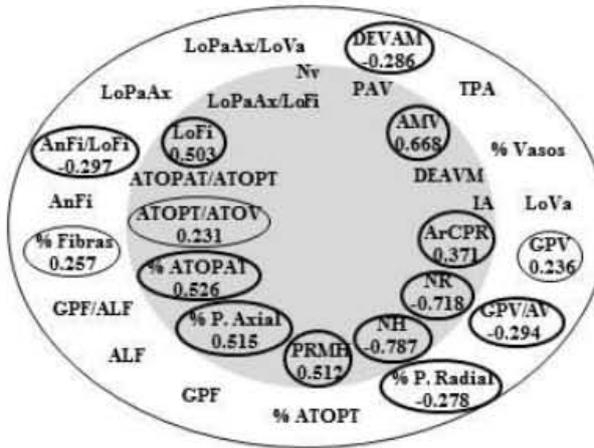
Promedio de la temperatura anual



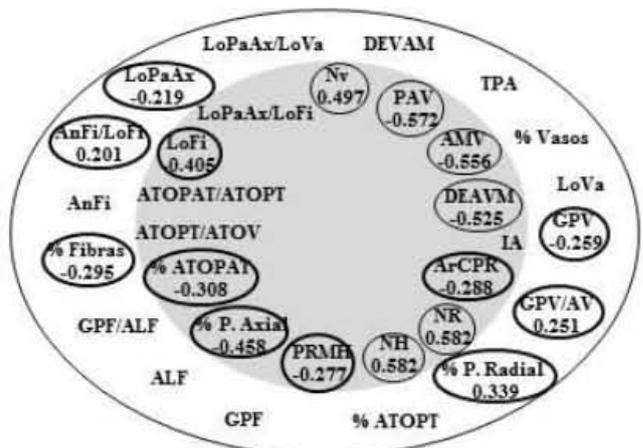
Promedio de la variación diurna de la temperatura



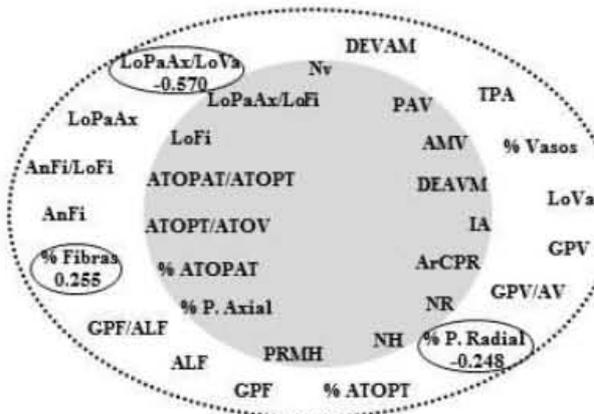
Isotermalidad 0.546



Estacionalidad de la temperatura -0.514



Temperatura máxima del mes más cálido



Temperatura mínima del mes más frío

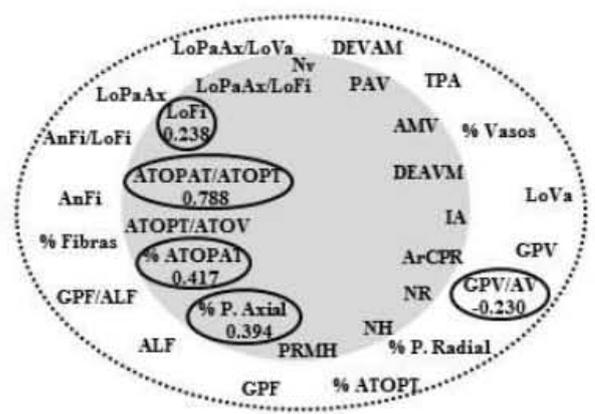
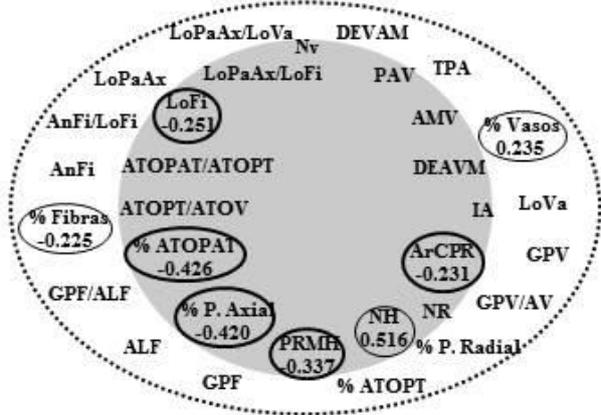
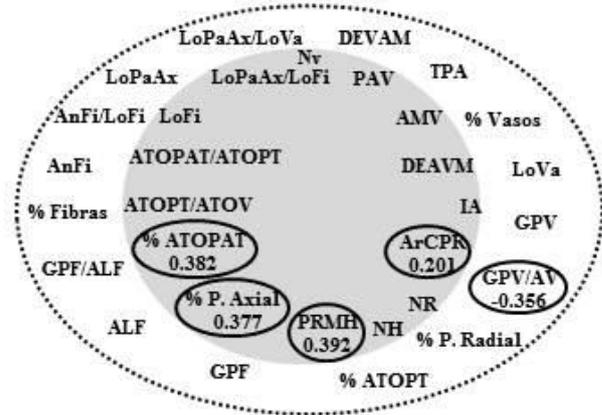


Figura 4.3. Correlaciones superiores a 0.200 encontradas entre la circunferencia, las variables anatómicas y diecinueve variables bioclimáticas. Las variables anatómicas significativamente relacionadas con la circunferencia aparecen dentro de los círculos grises. ○ : correlación con $p \leq 0.01$; ◐ : correlación con $0.05 \geq p \geq 0.01$; ∴ : variable bioclimática no relacionada significativamente con la circunferencia. Los valores de correlación significativos entre la circunferencia y las variables bioclimáticas aparecen en los óvalos que siguen al nombre de dichas variables.

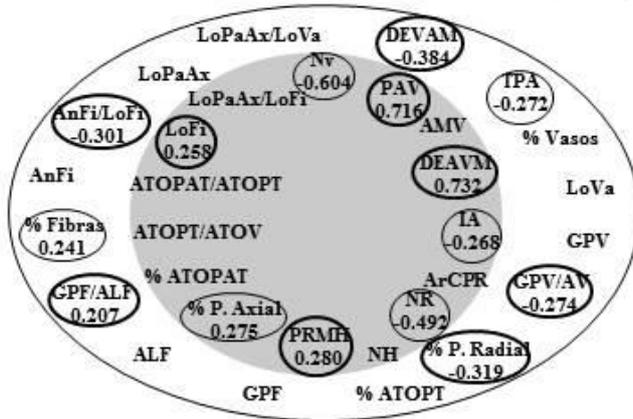
Precipitación del mes más seco



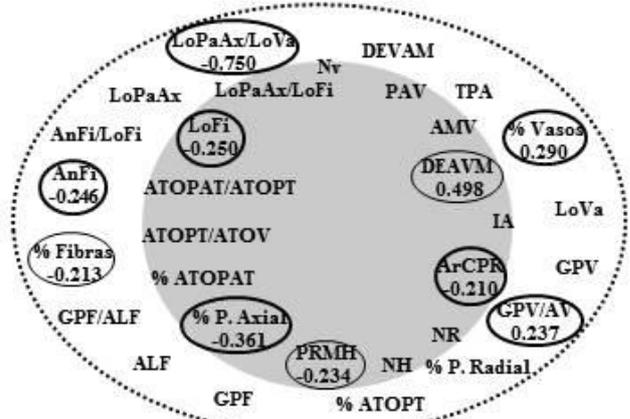
Estacionalidad de la precipitación (coeficiente de variación)



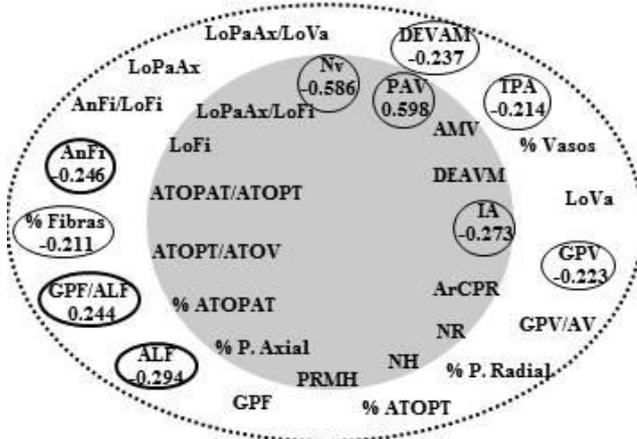
Precipitación del trimestre más húmedo 0.548



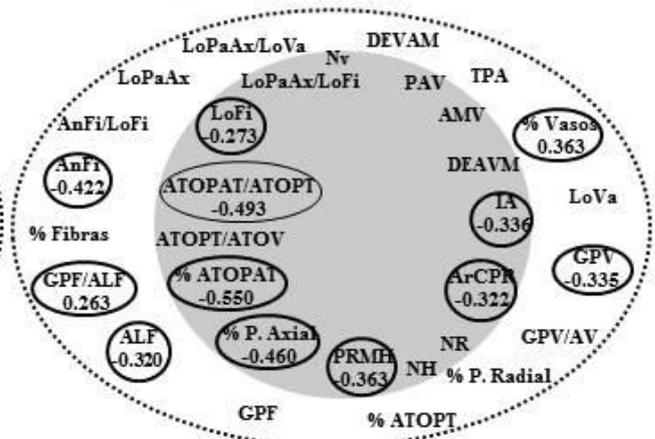
Precipitación del trimestre más seco



Precipitación del trimestre más cálido



Precipitación del trimestre más frío



precipitaciones del mes más húmedo y de los trimestres más cálido y más frío. GPF/ALF tiende a estar correlacionado positivamente con las precipitaciones anual, del mes y trimestre más húmedos, del trimestre más cálido y del trimestre más frío. AnFi tiende a estar correlacionado negativamente con las precipitaciones de los trimestres más cálido, más seco y más frío. AnFi/LoFi tiende a estar correlacionada positivamente con la estacionalidad de la temperatura y a estarlo negativamente con la isothermalidad y las precipitaciones anual y del mes y trimestre más húmedos. LoPaAx/LoVa tiende a estar correlacionado negativamente con la temperatura máxima del mes más cálido y la precipitación del trimestre más seco.

En cuanto a LoVa, %ATOPT y LoPaAx/LoFi, estos atributos no están correlacionados con ninguna variable bioclimática (Fig. 4.3).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los análisis preliminares muestran que la circunferencia exhibe señal filogenética y la longitud no. Por lo tanto, determinar si el tamaño corporal exhibe tal señal requerirá análisis subsecuentes.

Además del tamaño corporal, ocho variables anatómicas exhiben señal filogenética, lo que indica que todo estudio venidero sobre la evolución del tamaño corporal y las variables anatómicas a él asociadas requerirá tomar en consideración explícitamente las relaciones filogenéticas entre las especies norteamericanas de *Manihot*.

Adicionalmente, cerca de la mitad de las variables anatómicas está correlacionada con el tamaño corporal, lo que implica que cualquier investigación sobre la evolución de los caracteres anatómicos también debe tomar en consideración explícitamente la correlación entre estos caracteres y el tamaño corporal. Más aún, los atributos anatómicos relacionados con el tamaño corporal están correlacionados entre sí, indicando que también las correlaciones entre dichos atributos deben ser tomadas explícitamente en cuenta.

El tamaño corporal en las especies norteamericanas de *Manihot* está correlacionado con seis variables bioclimáticas. Lo anterior, además de investigaciones previas (Cervantes *et al.*, 2015), sugiere que este atributo ha evolucionado convergentemente. La mayoría de los atributos anatómicos vinculados con el tamaño corporal está también correlacionada con variables bioclimáticas con las que la

circunferencia está vinculada, además de estarlo con otras con las cuales el tamaño corporal no lo está.

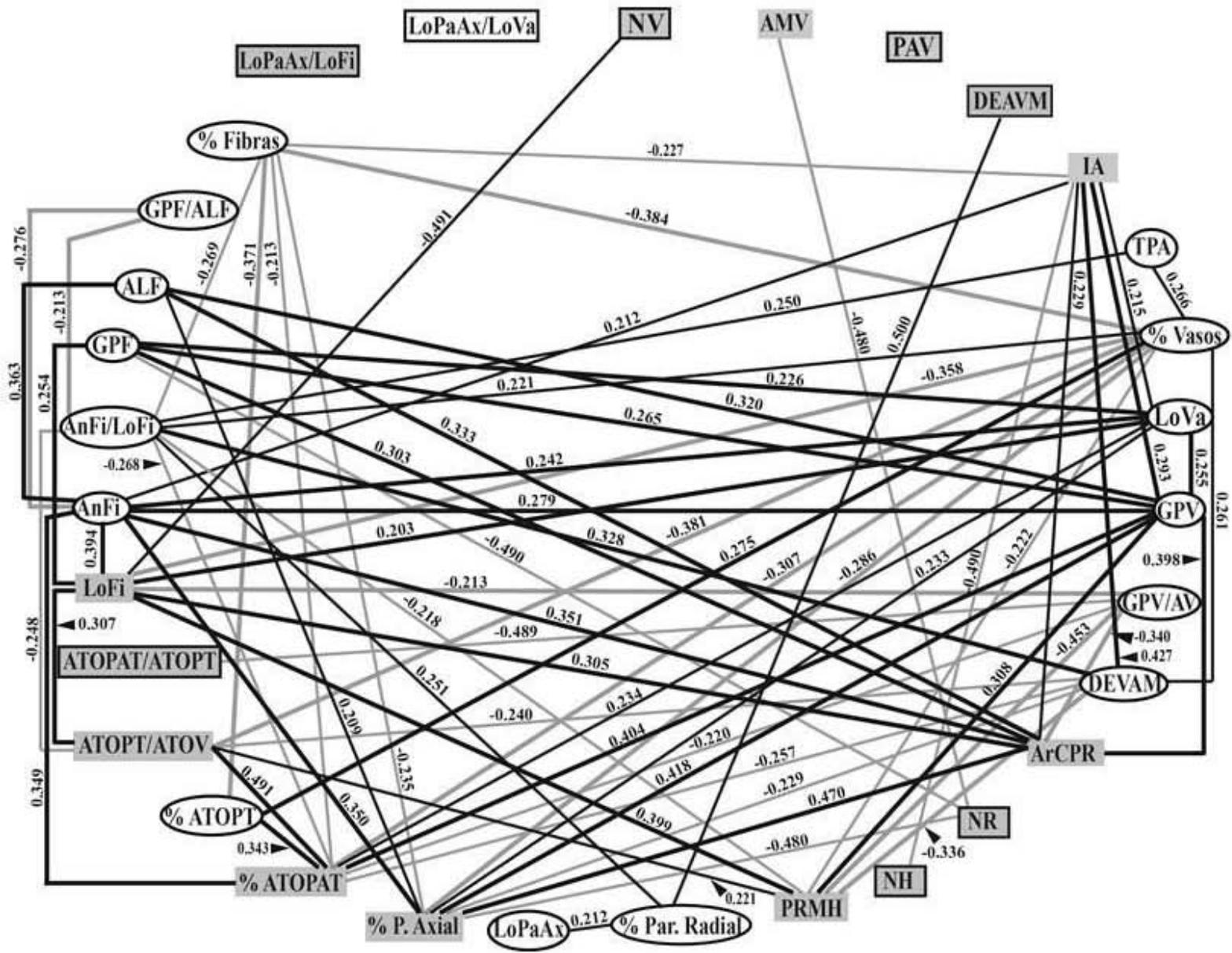
BIBLIOGRAFÍA

- Aarsen L.W., B.S. Schamp y J. Pither. 2006. Why are there so many small plants? Implications for species coexistence. *Journal of Ecology* **94**: 569-580
- Blomberg S. P., T. Garland y A. R. Ives. 2003. Testing for phylogenetic signal in comparative data: behavioral traits are more labile. *Evolution* **57**: 717-745
- Bonner, J. T. 2006. *WHY SIZE MATTERS. FROM BACTERIA TO BLUE WHALES*. Princeton University Press. Princeton, New Jersey. 161 pág.
- Carlquist, S. 1988. *Comparative wood anatomy. Systematic, ecological, and evolutionary aspects of dicotyledon wood*. Springer-Verlag. New York, U.S.A. 436 pág.
- Carlquist S. 2003. Wood anatomy of Polygonaceae: analysis of a family with exceptional wood diversity *Botanical Journal of the Linnean Society* **141**: 25-51
- Cervantes-Alcayde, M. A., M. E. Olson, K. M. Olsen y L. E. Eguiarte. 2015. APPARENT SIMILARITY, UNDERLYING HOMOPLASY: MORPHOLOGY AND MOLECULAR PHYLOGENY OF THE NORTH AMERICAN CLADE OF *MANIHOT*. *American Journal of Botany* **102** (4): 520-532
- Enquist B. J. 2003. Cope's Rule and the evolution of long-distance transport in vascular plants: allometric scaling, biomass partitioning and optimization. *Plant, Cell and Environment* **26**: 151-161
- Felsenstein, J. 1985. Phylogenies and the Comparative Method. *The American Naturalist* **125** (1): 1-15
- Givnish, T.J. 1995. Plant Stems: Biomechanical Adaptation for Energy Capture and Influence on Species Distribution. In *PLANT STEMS. Physiology and Functional Morphology*. Barbara L. Gartner ed. Academic Press. San Diego, California. pág. 3-49
- Hacke U. G. y J. S. Sperry. 2001. Functional and ecological xylem anatomy. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **4** (2): 97-115
- Holbrook N.M. 1995. Stem Water Storage. In *PLANT STEMS: Physiology and Functional Morphology*. Academic Press, San Diego, California. pág. 151-176
- IBM Corp. Released 2012. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 21.0. Armonk, NY: IBM Corp.
- Koehl, M.A.R. 2000. Consequences of Size Change During Ontogeny and Evolution. In *Scaling in Biology*. J.H. Brown y G.B. West eds. Oxford University Press. Nueva York, E.U.A. Pág. 67-86
- Lev-Yadun, S. 2001. Intrusive growth – the plant analog of dendrite and axon growth in animals. *New Phytologist* **150**: 508-512
- Martínez-Cabrera, H. I., C. S. Jones, S. Espino y H. J. Schenk. 2009. Wood anatomy and wood density in shrubs: responses to varying aridity along transcontinental transects. *American Journal of Botany* **96** (8): 1388-1398
- Mauseth J.D. 1988. *PLANT ANATOMY*. The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Park, California. 560 pág.
- Pagel, M. 1999. Inferring the historical patterns of biological evolution. *Nature* **401**: 877-884
- Paradis E., J. Claude y K. Strimmer. 2004. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics (Oxford, England)* **20**: 289-290

- Pearson, K. 1895. Notes on regression and inheritance in the case of two parents. *Proceedings of the Royal Society of London* **58**: 240–242
- Revell, L. J. 2012. phytools: an R package for phylogenetic comparative biology (and other things). *Methods in Ecology and Evolution* **3**: 217–223
- Rosell García J.A. 2010. *DIVERSIFICACIÓN ADAPTATIVA EN LAS PLANTAS LEÑOSAS: SOSTÉN, ALMACENAMIENTO Y CONDUCCIÓN EN TALLOS DEL CLADO SIMARUBA (Bursera, BURSERACEAE)* Tesis de Doctorado en Ciencias. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 175 pág.
- Rosell J. A. y M. E. Olson. 2007. TESTING IMPLICIT ASSUMPTIONS REGARDING THE AGE VS. SIZE DEPENDENCE OF STEM BIOMECHANICS USING *PITTOCAULON* (~*SENECIO*) *PRAECOX* (ASTERACEAE). *American Journal of Botany* **94** (2):161–172
- Ruzin, S. E. 1999. *Plant microtechnique and microscopy*. Oxford University Press, Oxford, UK
- Sandoval-Zapotitla, E, A. Rojas, C. Guzmán, L. Carmona, R. M. Ponce, C. León, C. Loyola, M. A. Vallejo y A. Medina. 2005. Técnicas aplicadas al estudio de la Anatomía Vegetal. *Cuadernos del Instituto de Biología*, Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal, México. **38**: 278 pág.
- Spearman, C. 1904. The proof and measurement of association between two things. *American Journal of Psychology* **15**: 72–101
- Sperry, J. S. 2003. Evolution of water transport and xylem structure. *International Journal of Plant Sciences* **164** (3 Suppl.): S115–S127
- Westoby M., D. S. Falster, A. T. Moles, P. A. Veske e I. J. Wright. 2002. PLANT ECOLOGICAL STRATEGIES: Some Leading Dimensions of Variation Between Species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **33**:125–59
- Wikelski M. 2005. Evolution of Body Size in Galapagos Marine Iguanas. *Proceedings of the Royal Academy of Sciences: Biological Sciences* **272** (1576): 1985–1993
- Ziemińska, K., D. W. Butler, S. M. Gleason, I. J. Wright y M. Westoby. 2013. Fibre wall and lumen fractions drive wood density variation across 24 Australian angiosperms. *AoB PLANTS* **5**: plt046; doi:10.1093/aobpla/plt046
- Ziemińska, K., M. Westoby e I. J. Wright. 2015. Broad Anatomical Variation within a Narrow Wood Density Range—A Study of Twig Wood across 69 Australian Angiosperms. *PLoS ONE* **10** (4): e0124892. doi:10.1371/journal.pone.0124892

Apéndice 4.1 Lista de la 19 variables climáticas cuya relación con el tamaño corporal y los atributos anatómicos fue evaluada.

Variable climática	Cálculo
Promedio de la temperatura anual	(Promedio de las temperaturas mensuales) * 10
Promedio de la variación diurna de la temperatura	Promedio de (Temperatura máxima-Temperatura mínima) mensuales
Isotermalidad	$\frac{(\text{Promedio de la variación diurna de la temperatura})}{\text{Variación anual de la temperatura}} * 100$
Estacionalidad de la temperatura	(Desviación estándar) * 100
Temperatura máxima del mes más cálido	(Promedio de las temperaturas máximas) * 10
Temperatura mínima del mes más frío	(Promedio de las temperaturas mínimas) * 10
Variación anual de la temperatura	Temperatura máxima del mes más cálido – Temperatura mínima del mes más frío
Promedio de la temperatura del trimestre más húmedo	(Promedio de las temperaturas mensuales) * 10
Promedio de la temperatura del trimestre más seco	(Promedio de las temperaturas mensuales) * 10
Promedio de la temperatura del trimestre más cálido	(Promedio de las temperaturas mensuales) * 10
Promedio de la temperatura del trimestre más frío	(Promedio de las temperaturas mensuales) * 10
Precipitación anual	-----
Precipitación del mes más húmedo	-----
Precipitación del mes más seco	-----
Estacionalidad de la precipitación	$\left(\frac{\text{Promedio}}{\text{Desviación estándar}} \right) * 100$
Precipitación del trimestre más húmedo	-----
Precipitación del trimestre más seco	-----
Precipitación del trimestre más cálido	-----
Precipitación del trimestre más frío	-----



Apéndice 4.2. Correlaciones superiores a 0.20 e inferiores o iguales a 0.50 encontradas entre las variables anatómicas. Línea negra gruesa: correlación positiva con $p \leq 0.01$; línea negra delgada: correlación positiva con $0.05 \geq p \geq 0.01$. Línea gris gruesa: correlación negativa con $p \leq 0.01$; línea gris delgada: correlación negativa con $0.05 \geq p \geq 0.01$. : variable significativamente relacionada con la circunferencia. o : variable con señal filogenética.

5. DISCUSIÓN

5.1 Existencia de señal filogenética sobre el tamaño corporal y las variables anatómicas

La existencia de señal filogenética sobre el tamaño corporal en las especies norteamericanas de *Manihot* es dudosa. Si bien la circunferencia exhibe señal filogenética, la longitud no. Sin embargo, sólo fueron analizados 19 datos de circunferencia, mientras que fue posible analizar más de cuatrocientos datos de longitud. Esto abre la posibilidad de que el hallazgo de señal filogenética sobre la circunferencia haya estado determinado, al menos parcialmente, por el tamaño muestral. No obstante, la evaluación de la existencia de correlaciones entre la circunferencia y las variables anatómicas fue efectuada usando contrastes independientes debido a la estrecha relación que ha sido documentada entre el diámetro de los vasos y el tamaño de los individuos que los poseen (Olson *et al.*, 2013; Olson *et al.*, 2014)

El hallazgo de señal filogenética en ocho variables anatómicas posiblemente esté menos condicionado por el tamaño muestral, puesto que el número de mediciones hechas por atributo fluctuó entre 95 y 190. Cuatro de las variables con señal filogenética (*i.e.* Nv, NR, PAV y DEAVM) están entre aquellas más intensa y frecuentemente correlacionadas con el resto de los atributos. Lo anterior ilustra que una interpretación precisa de la evolución morfológica y/o anatómica de las especies norteamericanas de *Manihot* requiere tomar en consideración explícitamente las relaciones filogenéticas de dichas especies.

5.2 Correlación entre el tamaño corporal y las variables bioclimáticas

El tamaño corporal de las especies norteamericanas de *Manihot* está asociado con tres variables relacionadas con la temperatura y tres relacionadas con la precipitación. La circunferencia está positivamente relacionada con regímenes en los que la temperatura es relativamente homogénea en el curso del año, la temperatura del trimestre más frío del año es más elevada y donde la precipitación es relativamente elevada también (Fig. 4.3).

En lo referente a la relación entre la temperatura y el tamaño corporal, ha sido documentado que las plantas de tamaño reducido, como los arbustos, son extremadamente resistentes a estreses ambientales como la baja concentración de nutrientes o el frío (Wilson, 1995), lo que es congruente con lo encontrado en este trabajo. Lo encontrado en esta investigación también coincide con la relación que ha sido documentada entre mayores resistencias a los embolismos inducidos por el incremento en la frecuencia de eventos de congelamiento y descongelamiento y los menores diámetros de los elementos de vaso, que están asociados a menores tamaños corporales (Fisher *et al.*, 2007; Hacke y Sperry, 2001; Sperry, 1995).

En lo referente a la relación entre la precipitación y el tamaño corporal, ha sido reportado que las plantas con mayor tamaño tienden a ocupar áreas en las que el agua no es un recurso tan limitado (Moles *et al.*, 2009), lo cual es congruente con los resultados reportados en este trabajo.

Finalmente, ha sido frecuentemente mencionado que las condiciones en las que el aumento en la estatura resulta beneficioso son aquellas en las que la densidad y la altura de los competidores obstruyen el acceso a la luz (Givnish, 1995; Westoby *et al.*, 2002). Esto es consistente con las observaciones de *Manihot* hechas en el campo, pues las especies con mayor tamaño corporal, a excepción de aquellas usadas como cercas vivas, están ubicadas en áreas donde la cobertura vegetal es más densa si se les compara con las áreas ocupadas por las especies arbustivas y herbáceas.

5.3 Correlación entre el tamaño corporal y las variables anatómicas y correlaciones entre dichas variables

Uno de los resultados obtenidos en este trabajo es que hay numerosas variables anatómicas vinculadas con el tamaño corporal y vinculadas también entre sí. Una de dichas variables es el área de los elementos de vaso (PAV) (Fig. 4.2).

Las implicaciones fisiológicas de este atributo están relativamente bien establecidas. La hipótesis más reciente sobre dichas implicaciones postula que el valor de este atributo podría ser determinado por presiones selectivas que no dependen de las condiciones ambientales locales, sino de presiones selectivas de otro carácter. Éstas fueron planteadas en 1997 por West, Brown y Enquist en el "modelo WBE" (Brown *et al.*, 2000), de acuerdo con el cual es requerida una red de transporte con las siguientes características para alimentar a las células (West *et al.*, 2000):

(a) Tener un patrón de ramificación jerárquico de naturaleza fractal que garantice que la red suministre los recursos necesarios a todas las partes de un cuerpo tridimensional.

(b) Tener ramas finales en las que los nutrientes son intercambiados cuyas dimensiones no dependan del tamaño corporal.

(c) Tener una estructura que garantice que la energía requerida para transportar materiales a través de la red sea minimizada.

Una condición indispensable para el cumplimiento de esta característica es que la resistencia hidrodinámica de la red sea constante en todos los puntos de la misma, pero dicha resistencia tiende a aumentar entre mayor es la longitud del conducto por el que es transportado un fluido. La resistencia hidrodinámica puede ser modificada de manera desproporcionada a través de cambios ligeros en el diámetro de dicho conducto. La resistencia total de un sistema dependerá del exponente con el que el área de los vasos del xilema se reduce de manera paralela a la disminución de la circunferencia de los tallos. Si dicho exponente es menor que $1/6$, la resistencia total de la red se incrementará a medida que la longitud que separa el suelo de los pecíolos se incrementa junto con el tamaño corporal. Si este exponente es $>1/6$, la resistencia total del tubo es constante, independientemente del número de ramificaciones y el tamaño de las plantas, lo que garantiza que todas las hojas tendrán tasas comparables de suministro de recursos. Dado que es físicamente imposible que los vasos del xilema se angosten indefinidamente, el modelo WBE afirma que el angostamiento de dichos vasos debe ser tan cercano a $1/6$ como sea posible (Enquist *et al.*, 2000).

Este modelo ha predicho varios atributos de la anatomía, la fisiología y la arquitectura de las plantas vasculares, como la conductividad de diferentes segmentos o ramas, el área superficial de las hojas alimentada por cada vaso, el diferencial de gradientes de presión entre el tronco y las hojas, la proporción de tejido conductor y no conductor o el radio máximo del tronco y la altura máxima de un árbol (Enquist *et al.*, 2000).

El cumplimiento de las predicciones previamente mencionadas sugiere que las características anatómicas vinculadas con la función conductora de las plantas han sido producidas por presiones selectivas relacionadas con la optimización del transporte de recursos dependiente del tamaño corporal, y no por las condiciones ambientales en las que las plantas son encontradas (Enquist *et al.*, 2000).

Esta hipótesis, respaldada también por trabajos posteriores (Olson *et al.*, 2013; Olson *et al.*, 2014), es congruente con la correlación hallada entre PAV y el tamaño corporal, que es superior a aquella existente entre PAV y la mayor parte de las seis variables bioclimáticas con las que este atributo está relacionado. Lo anterior muestra claramente la relevancia funcional de este atributo, que además es uno de los más intensamente correlacionados con el mayor número de variables anatómicas vinculadas con la circunferencia (Fig. 4.2). Lo anterior parece implicar que la selección sobre el tamaño corporal está indisolublemente vinculada no sólo con PAV, sino con el resto de las variables anatómicas con las que este atributo y el tamaño están relacionados.

Por otro lado, varios de los atributos más intensamente relacionados con el tamaño corporal (% Par. Axial, NR, NH, PRMH, % ATOPAT, ATOPAT/ATOPT, ArCPR) corresponden a los sistemas axial y radial del parénquima del tallo. Esto es parcialmente congruente con lo reportado por Ziemińska *et al.* (2015), quienes encontraron que las fracciones del tallo ocupadas por parénquima axial y radial en alrededor de 60 especies de angiospermas australianas estaban positivamente relacionadas con la altura de las plantas, aunque sólo débilmente.

Finalmente, hay que recordar que las proporciones del área transversal del tallo ocupada por vasos, por fibras y por parénquima radial no están relacionadas con la circunferencia. En el caso del parénquima radial, la falta de correlación entre dicha variable y el tamaño corporal podría deberse a las pequeñas diferencias en el valor absoluto de este atributo exhibidas por las especies. Así, NR, que es un atributo relacionado con % Par. Radial que muestra mayor variabilidad que éste último, exhibe una intensa correlación con el tamaño corporal.

5.4 Correlaciones entre las variables anatómicas y las variables bioclimáticas

5.4.1 GPV y otras variables relacionadas

Ha sido encontrado que el grosor de la pared de las fibras está positiva y fuertemente correlacionado con la densidad de la madera y, por consiguiente, con el sostén de los tallos. Sin embargo, también lo está con la capacidad de transportar agua a presiones sustancialmente bajas (Hacke y Sperry, 2001). Las plantas de climas xéricos no sólo tienen elementos de vaso con gruesas paredes (que presumiblemente reducen el riesgo de implosión), sino también fibras con paredes muy anchas. De hecho, los

valores más elevados de densidad de la madera no corresponden a las plantas de mayor tamaño, sino a especies procedentes de zonas áridas, como diminutos arbustos desérticos (Thomas *et al.*, 2007).

En las especies norteamericanas de *Manihot* no fue encontrada una asociación entre el grosor de la pared de las fibras y la baja disponibilidad de agua, sino fibras con paredes más gruesas respecto al área del lumen (*i.e.* mayor GPF/ALF) en zonas con mayor disponibilidad de agua. Estas zonas son aquellas en las que se encuentran las especies de mayor tamaño, lo que sugiere que en este grupo de taxones dicha combinación de caracteres está fundamentalmente relacionada con el sostén de los tallos. Por el contrario, las fibras con mayores anchuras totales respecto a la longitud (*i.e.* mayor AnFi/LoFi) están asociadas a zonas con menor disponibilidad de agua.

Por otro lado, en las especies norteamericanas de *Manihot* GPV se comporta de manera congruente con lo reportado en la literatura (*e.g.* Carlquist, 1988; Ziemińska *et al.*, 2015). Los valores más elevados de este atributo son encontrados en áreas con baja disponibilidad de agua, como también lo están los valores más elevados de GPV/AV.

5.4.2 % Par. Axial y % Par. Radial

La proporción del tallo ocupada por células del parénquima está positivamente relacionada, entre otras características, con la capacidad de almacenamiento intracelular de agua en los tallos. La maximización de la función de almacenamiento en esa estructura demanda que sus tejidos sean flexibles, lo que requiere que haya una baja densidad de fibras (Holbrook, 1995; Chave *et al.*, 2009; Rosell, 2010). En esta investigación, y en congruencia con lo reportado por los autores previamente citados pero contradiciendo lo reportado por Ziemińska *et al.* (2015), % Par. Radial y % Fibras están correlacionados negativamente (Fig. 4.2).

Por otro lado, en este trabajo fue encontrado que el tamaño corporal y % Par. Axial están correlacionados positivamente. Lo anterior implicaría que en las especies norteamericanas de *Manihot* los organismos de mayor talla asignan mayores proporciones del tallo al almacenamiento. Congruentemente, en este clado las especies de mayor tamaño carecen de raíces tuberosas, de manera que la función de almacenamiento es desarrollada por las partes aéreas.

Finalmente, algunas de las correlaciones más intensas observadas en este trabajo involucran a atributos anatómicos relacionados con el parénquima (% Par. Axial, %

ATOPAT, ATOPT/ATOV, ATOPAT/ATOPT, NR, ArCPR, y atributos anatómicos relacionados con los elementos de vaso (Nv, AMV, PAV, DEAVM, IA, % Vasos). Esto es incongruente con lo mencionado por algunos autores, quienes encontraron correlaciones débiles, o ausencia de correlaciones, entre los atributos del parénquima y los atributos relacionados con los vasos (Ziemińska *et al.*, 2015). La interpretación de las inconsistencias entre los resultados de este trabajo y los resultados de otros investigadores demanda estudios subsecuentes.

5.4.3 Longitud de las fibras y atributos relacionados

Ha sido encontrado que la longitud de las fibras no siempre es proporcional a la altura de las plantas. Las fibras más largas conocidas hasta ahora corresponden a *Boehmeria nivea*, una especie arbustiva que habita en zonas xéricas cuyas fibras pueden alcanzar longitudes de hasta 55 cm. La densidad de la matriz de fibras, debida en buena medida al crecimiento intrusivo de estas células, está relacionada con la resistencia a la cavitación de la red de vasos (Sperry, 2003). El crecimiento intrusivo consiste en el crecimiento longitudinal de extensiones de la pared de las fibras, como resultado del cual estas células invaden otros grupos de células o tejidos. Esto provee a las estructuras vegetales de fuerza y elasticidad, que les permite alcanzar tallas elevadas, y también la capacidad de evitar la cavitación en condiciones de estrés hídrico. En las especies norteamericanas de *Manihot* las fibras más largas están correlacionadas positivamente con el tamaño corporal y no lo están con ninguna variable bioclimática. Por su parte, LoPaAx/LoFi está negativamente correlacionado con la circunferencia y no está asociado con ninguna variable climática. Lo anterior sugiere que en este grupo de especies la longitud de las fibras y el crecimiento intrusivo no están relacionados con la prevención de la cavitación.

Finalmente, la fuerte correlación negativa encontrada entre % Fibras y % Par. Radial es congruente con lo reportado por otros autores, constituyendo una de las correlaciones entre atributos anatómicos del tallo más ampliamente documentadas (Ziemińska *et al.*, 2015)

6. CONCLUSIONES

El tamaño corporal y los hábitos de crecimiento a él asociados han evolucionado convergentemente en las especies norteamericanas de *Manihot*. Sin embargo, análisis preliminares sugieren que la circunferencia exhibe señal filogenética, aunque no la longitud. Por consiguiente, establecer si el tamaño corporal presenta dicha señal requiere análisis subsecuentes.

La circunferencia está correlacionada con cerca la mitad de un conjunto de 31 variables anatómicas examinadas. Este atributo tiende a estar positivamente relacionado con la proporción de vasos agrupados, la proporción de radios con más de una hilera de células de parénquima, las proporciones de área transversal ocupadas por parénquima axial total, parénquima axial paratraqueal y parénquima axial apotraqueal, la proporción de parénquima axial apotraqueal respecto al parénquima axial paratraqueal, el área transversal máxima, área transversal promedio y desviación estándar de las áreas de los elementos de vaso, las áreas transversales de las células del parénquima radial y la longitud de las fibras. De manera inversa, la circunferencia tiende a estar negativamente relacionada con el número de vasos, el número de radios, el número de hileras de células de parénquima radial y el crecimiento intrusivo de las fibras.

Las variables anatómicas correlacionadas con la circunferencia tienden también a estar relacionadas entre sí y a exhibir una mayor integración unas con otras que las variables anatómicas sin relación con la circunferencia. Adicionalmente, análisis preliminares indican que ocho de estas variables exhiben señal filogenética. Por consiguiente, las investigaciones subsecuentes deben tomar en consideración las correlaciones entre el tamaño corporal y los atributos anatómicos, las correlaciones entre dichos atributos y las relaciones genealógicas entre las especies norteamericanas de *Manihot*.

El tamaño corporal parece haber evolucionado, al menos parcialmente, en respuesta a las condiciones ambientales. Análisis preliminares indican que existe una correlación entre seis variables bioclimáticas y la circunferencia, sugiriendo que dichas variables han sido relevantes en la evolución del tamaño corporal. Estos análisis indican que las formas de mayor tamaño ocurren en las áreas con mayor disponibilidad de agua, mayor homogeneidad de la temperatura y temperaturas más altas en el trimestre más frío del año. Esto es congruente con las observaciones hechas en el

campo, que indican que las formas arbustivas y herbáceas, que cuentan con raíces tuberosas, son más tolerantes a la heterogeneidad de la temperatura, a temperaturas inferiores y a la escasez de agua.

Las variables anatómicas correlacionadas con el tamaño y no correlacionadas con dicho atributo exhiben también correlaciones con las variables bioclimáticas. Aquellos atributos relacionados con la circunferencia no sólo presentan relación con las variables bioclimáticas con las cuales la circunferencia está vinculada, sino también con otras.

Las variables bioclimáticas térmicas tienen una relación reducida con los atributos vinculados con el área de los elementos de vaso, pero están fuertemente relacionadas con los atributos anatómicos vinculados con el parénquima axial y el parénquima radial. Por el contrario, las variables bioclimáticas relacionadas con la precipitación tienen una relación intensa con los atributos vinculados con el área de los elementos de vaso, pero la mayor parte de ellas está débilmente relacionada con los atributos anatómicos vinculados con el parénquima axial y el parénquima radial.

Las correlaciones reportadas en la literatura entre algunas variables anatómicas y bioclimáticas no son congruentes con lo observado en las especies norteamericanas de *Manihot* (e.g. longitud de las fibras, grosor de la pared de las fibras). Por el contrario, otras correlaciones entre las variables anatómicas y bioclimáticas sí son congruentes con lo encontrado en este trabajo (e.g. grosor de la pared de los vasos, relación entre el grosor de la pared de los vasos y el área de los mismos).

LITERATURA CITADA

Aarsen L.W., B.S. Schamp y J. Pither. 2006. Why are there so many small plants? Implications for species coexistence. *Journal of Ecology* **94**: 569-580

Beck, C.B. 1981. ARCHAEOPTERIS AND ITS ROLE IN VASCULAR PLANT EVOLUTION. In *PALEOBOTANY, PALEOECOLOGY AND EVOLUTION. VOLUME 1*. K. J. Niklas ed. Praeger Publishers. Nueva York, Estados Unidos. 297 pág.

Biewener, A.A. 2000. Scaling of Terrestrial Support: Differing Solutions to Mechanical Constraints of Size. In *Scaling in Biology*. J.H. Brown y G.B. West eds. Oxford University Press. Nueva York, E.U.A. Pág. 51-66

Bonner, J. T. 2004. PERSPECTIVE: THE SIZE-COMPLEXITY RULE. *Evolution* **58** (9):1883-1890

Bonner, J. T. 2006. *WHY SIZE MATTERS. FROM BACTERIA TO BLUE WHALES*. Princeton University Press. Princeton, New Jersey. 161 pág.

Bonner, J.T. y H. S. Horn. 2000. Allometry and Natural Selection. In *Scaling in Biology*. J.H. Brown y G.B. West eds. Oxford University Press. Nueva York, E.U.A. pág. 25-35

- Braun S.D., T. H. Jones y J. Perner. 2004. Shifting average body size during regeneration after pollution – a case study using ground beetle assemblages. *Ecological Entomology* **29**: 543–554
- Bronikowski A. y D. Vleck. 2010. Metabolism, Body Size and Life Span: A Case Study in Evolutionarily Divergent Populations of the Garter Snake (*Thamnophis elegans*). *Integrative and Comparative Biology* **50** (5): 880–887
- Brischoux F., X. Bonnet, T.R. Cook y R. Shine. 2007. Allometry of diving capacities: ectothermy vs. endothermy. *JOURNAL OF EVOLUTIONARY BIOLOGY* **21**: 324–329
- Brown, J. H., G.B. West y B.J. Enquist. 2000. Scaling in Biology: Patterns and Processes, Causes and Consequences. In *Scaling in Biology*. J.H. Brown y G.B. West eds. Oxford University Press. Nueva York, E.U.A. Pág. 12-24
- Carlquist S. 1966. WOOD ANATOMY OF COMPOSITAE: A SUMMARY WITH COMMENTS ON FACTORS CONTROLLING WOOD EVOLUTION. *Aliso* **6** (2): 25-44
- Carlquist S. 1988. *Comparative Wood Anatomy. Systematic, Ecological and Evolutionary Aspects of Dicotyledon Wood*. Springer-Verlag. Berlin, Germany. 436 pág.
- Carlquist S. 2003. Wood anatomy of Polygonaceae: analysis of a family with exceptional wood diversity *Botanical Journal of the Linnean Society* **141**: 25–51.
- Carlquist S. y S. Zona. 1988. Wood anatomy of Acanthaceae: a survey. *Aliso* **12**: 201-227
- Clark D. A. y D. B. Clark. 2001. GETTING TO THE CANOPY: TREE HEIGHT GROWTH IN A NEOTROPICAL RAIN FOREST *Ecology* **82**(5): 1460–1472
- Chave J., D. Coomes, S. Jansen, S. L. Lewis, N. G. Swenson y A. E. Zanne. 2009. Towards a worldwide wood economics spectrum. *Ecology Letters* **12**: 351–366
- Chacón J., S. Madriñán, D. Debouck, F. Rodríguez y J. Tohme. 2008. Phylogenetic patterns in the genus *Manihot* (Euphorbiaceae) inferred from analyses of nuclear and chloroplast DNA regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **49**: 260–267
- Cowen R. 2002. El origen de las plantas terrestres. In *LECTURAS SELECCIONADAS. Paleobiología*. P. García, M. Montellano, S.A. Quiroz, F. Sour, S. Ceballos y L. Chávez eds. Facultad de Ciencias U.N.A.M.. México D.F. pág.187-196
- Duputié, A., J. Salick y D. McKey. 2011. Evolutionary biogeography of *Manihot* (Euphorbiaceae), a rapidly radiating Neotropical genus restricted to dry environments. *Journal of Biogeography* **38**: 1033–1043.
- Enquist B.J. 2003. Cope's Rule and the evolution of long-distance transport in vascular plants: allometric scaling, biomass partitioning and optimization. *Plant, Cell and Environment* **26**: 151–161
- Enquist, B. J., G.B. West y J.H. Brown. 2000. Quarter-Power Allometric Scaling in Vascular Plants. In *Scaling in Biology*. J.H. Brown y G.B. West eds. Oxford University Press. Nueva York, E.U.A. Pág. 167-198
- Esau K. 1977. *Anatomy of seed plants*. J. Wiley. New York, U.S.A. 550 pág.
- Fisher J. B., G. Goldstein, T. J. Jones y S. Cordell. 2007. WOOD VESSELDIAMETER IS RELATED TO ELEVATION AND GENOTYPE IN THE HAWAIIAN TREE *METROSIDEROS POLYMORPHA* (MYRTACEAE). *American Journal of Botany* **94** (5): 709–715.

Friedman W. E. y M. E. Cook. 2000. The origin and early evolution of tracheids in vascular plants: integration of palaeobotanical and neobotanical data. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **355**: 857-868

Gartner B.L. 1995. Patterns of Xylem Variation within a Tree and Their Hydraulic and Mechanical Consequences. In *PLANT STEMS: Physiology and Functional Morphology*. Academic Press, San Diego, California. pág. 125-150

Givnish, T.J. 1995. Plant Stems: Biomechanical Adaptation for Energy Capture and Influence on Species Distribution. In *PLANT STEMS. Physiology and Functional Morphology*. Barbara L. Gartner ed. Academic Press. San Diego, California. pág. 3-49

Grime, J.P. 1979. *Plant Strategies and Vegetation Processes*. John Wiley and Sons. Bath, Reino Unido. 222 pág.

Hacke U. G. y J. S. Sperry. 2001. Functional and ecological xylem anatomy. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **4** (2): 97-115

Hacke U. G., J. S. Sperry, J. K. Wheeler y L. Castro. 2006. Scaling of angiosperm xylem structure with safety and efficiency *Tree Physiology* **26**: 689-701

Harvey P.H. 2000. Phylogenetic Relationships Incorporated Into Studies of Scaling. In *Scaling in Biology*. J.H. Brown y G.B. West eds. Oxford University Press. Nueva York, E.U.A. Pág. 253-265

Hincley T.M. y P.J. Schulte. 1995. Stems in the Biology of the Tissue, Organism, stand, and Ecosystem. In *PLANT STEMS: Physiology and Functional Morphology*. Academic Press, San Diego, California. pág. 410-428

Holbrook N.M. 1995. Stem Water Storage. In *PLANT STEMS: Physiology and Functional Morphology*. Academic Press, San Diego, California. pág. 151-176

Horn, H.S. 2000. Twigs, Trees, and the Dynamics of Carbon in the Landscape. In *Scaling in Biology*. J.H. Brown y G.B. West eds. Oxford University Press. Nueva York, E.U.A. Pág. 199-220

Huey R. B. y P. E. Hertz. 1982. EFFECTS OF BODY SIZE AND SLOPE ON SPRINT SPEED OF A LIZARD (*STELLIO (AGAMA) STELLIO*) *Journal of Experimental Biology* **97**: 401-409

Huey R. B. y P. E. Hertz. 1984. EFFECTS OF BODY SIZE AND SLOPE ON ACCELERATION OF A LIZARD (*STELLIO STELLIO*) *Journal of Experimental Biology* **110**: 113-123

Knops, J.M.H., W.D. Koenig y W.J. Carmen. 2007. A negative correlation does not imply TRADE-OFF BETWEEN GROWTH AND REPRODUCTION IN CALIFORNIA OAKS. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104** (43): 16982-16985

Kingsolver J.G. y R.B. Huey. 2008. Size, temperature, and fitness: three rules. *Evolutionary Ecology Research* **10**: 251-268

Kingsolver J. G. y D. W. Pfennig. 2004. INDIVIDUAL-LEVEL SELECTION AS A CAUSE OF COPE'S RULE OF PHYLETIC SIZE INCREASE. *Evolution* **58** (7): 1608-1612

Kirk D. L. 2003. Seeking the Ultimate and Proximate Causes of *Volvox* Multicellularity and Cellular Differentiation. *INTEGR. COMP. BIOL.* **43**: 247-253

Koehl, M.A.R. 2000. Consequences of Size Change During Ontogeny and Evolution. In *Scaling in Biology*. J.H. Brown y G.B. West eds. Oxford University Press. Nueva York, E.U.A. Pág. 67-86

Lens F., P. Baas, S. Jansen y E. Smets. 2007. A SEARCH FOR PHYLOGENETICALLY INFORMATIVE WOOD CHARACTERS WITHIN LECYTHIDACEAE S.L. *American Journal of Botany* **94** (4): 483-502.

- Jiménez Ramírez, J. 1990. Una nueva sección y una especie nueva de *Manihot* (Euporbiaceae) de México. *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Auton. Mexico, Bot.* **60**: 49-53
- Little C.H.A. y R.P. Pharis. 1995. Hormonal Control of Radial and Longitudinal Growth in the Tree Stem. In *PLANT STEMS: Physiology and Functional Morphology*. Academic Press, San Diego, California. pág. 281-322
- Lev-Yadun, S. 2001. Intrusive growth – the plant analog of dendrite and axon growth in animals. *New Phytologist* **150**: 508–512
- Makarieva A. M., V. G. Gorshkov, B.L. Li, S. L. Chown, P. B. Reich y V. M. Gavrillov. 2008. Mean mass-specific metabolic rates are strikingly similar across life's major domains: Evidence for life's metabolic optimum. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105** (44): 16994–16999
- Mauseth J.D. 1988. *PLANT ANATOMY*. The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc. Menlo Park, California. 560 pág.
- McCarthy M. C. y B. J. Enquist. 2005. Organismal size, metabolism and the evolution of complexity in metazoans *Evolutionary Ecology Research* **7**: 681–696
- Mencuccini M. 2003. The ecological significance of long-distance water transport: short-term regulation, long-term acclimation and the hydraulic costs of stature across plant life forms *Plant, Cell and Environment* **26**: 163–182
- Moles, A. T., D. I. Warton, L. Warman, N. G. Swenson, S. W. Laffan, A. E. Zanne, A. Pitman *et al.* 2009 . Global patterns in plant height. *Journal of Ecology* **97**: 923 – 932
- Nevo E., A. Beiles, G. Heth y S. Simson. 1986. Adaptive differentiation of body size in speciating mole rats. *Oecologia* **69**:327-333
- Olson M.E. 2007. Wood ontogeny as a model for studying heterochrony, with an example of pedomorphosis in *Moringa* (Moringaceae). *Systematics and Biodiversity* **5** (2): 145–158
- Olson, M. E., T. Anfodillo, J. A. Rosell, G. Petit, A. Crivellaro, S. Isnard, C. León-Gómez, L. O. Alvarado-Cárdenas y M. Castorena. 2014. Universal hydraulics of the flowering plants: vessel diameter scales with stem length across angiosperm lineages, habits and climates. *Ecology Letters* **17**: 988–997
- Olson M. E. y S. Carlquist. 2001. Stem and root anatomical correlations with life form diversity, ecology, and systematics in *Moringa* (Moringaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **135**: 315-348
- Olson, M. E., J. A. Rosell, C. León, S. Zamora, A. Weeks, L. O. Alvarado-Cárdenas, N. Ivalú Cacho y J. Grant. 2013. Convergent vessel diameter–stem diameter scaling across five clades of New and Old World eudicots from desert to rain forest. *International Journal of Plant Sciences* **174** (7):1062–1078
- Pate J.S. y W.D. Jeschke. 1995. Role of Stems in Transport, Storage, and Circulation of Ions and Metabolites by the Whole Plant. In *PLANT STEMS: Physiology and Functional Morphology*. Academic Press, San Diego, California. pág. 177-204
- Payne J. L., A. G. Boyer, J. H. Brown, S. Finnegan, M. Kowalewski, R. A. Krause, S. K. Lyons, C. R. McClain, D. W. McShea, P.M. Novack-Gottshall, F. A.
- Smith, J. A. Stempien y S. C. Wang. 2009. Two-phase increase in the maximum size of life over 3.5 billion years reflects biological innovation and environmental opportunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106** (1): 24-27
- Pfister C. A. y F. R. Stevens. 2002. The genesis of size variability in plants and animals. *Ecology* **83** (1): 59-72
- Roff, D. A. 2002. *Life History Evolution*. Sinauer Associates Inc. Sunderland, Estados Unidos. 527.

- Rogers, D. J. y S. G. Appan. 1973. Manihot and Manihotoides (Euphorbiaceae). In *FLORA NEOTROPICA* Monograph No. 13. Hafner Press, New York. 272 pág.
- Rosell García J.A. 2002. *Análisis de la tendencia evolutiva al aumento de talla en plantas del Devónico. Evaluación del uso de ecuaciones alométricas para la estimación de la altura en plantas fósiles*. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 107 pág.
- Rosell García J.A. 2010. *DIVERSIFICACIÓN ADAPTATIVA EN LAS PLANTAS LEÑOSAS: SOSTÉN, ALMACENAMIENTO Y CONDUCCIÓN EN TALLOS DEL CLADO SIMARUBA (Bursera, BURSERACEAE)* Tesis de Doctorado en Ciencias. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 175 pág.
- Rosell J. A. y M. E. Olson. 2007. TESTING IMPLICIT ASSUMPTIONS REGARDING THE AGE VS. SIZE DEPENDENCE OF STEM BIOMECHANICS USING *PITTOCAULON* (~*SENECIO*) *PRAECOX* (ASTERACEAE). *American Journal of Botany* **94** (2):161–172.
- Rosell J. A., M. E. Olson, R. Aguirre-Hernández y S. Carlquist. 2007. Logistic regression in comparative wood anatomy: tracheid types, wood anatomical terminology, and new inferences from the Carlquist and Hoekman southern Californian data set *Botanical Journal of the Linnean Society* **154**: 331–351.
- Sperry J.S. 1995. Limitations on Stem Water Transport and Their Consequences. In *PLANT Stems: Physiology and Functional Morphology*. Academic Press, San Diego, California. pág. 105-124
- Sperry J. S. 2003. EVOLUTION OF WATER TRANSPORT AND XYLEM STRUCTURE. *Int. J. Plant Sci.* **164** (3 Suppl.):S115–S127
- Steinmann, V. W. 2005. New Euphorbiaceae from Mexico II. *Contributions from the University of Michigan Herbarium* **24**: 173-187
- Stillwell R. C., G. E. Morse y C. W. Fox. 2007. Geographic Variation in Body Size and Sexual Size Dimorphism of a Seed-Feeding Beetle *The American Naturalist* **170** (3): 358-369
- Sterck F. J. y F. Bongers. 1998. ONTOGENETIC CHANGES IN SIZE, ALLOMETRY, AND MECHANICAL DESIGN OF TROPICAL RAIN FOREST TREES. *American Journal of Botany* **85** (2): 266–272.
- Teuschl Y., C. Reim y W. U. Blanckenhorn. 2007. Correlated responses to artificial body size selection in growth, development, phenotypic plasticity and juvenile viability in yellow dung flies. *JOURNAL COMPILATION. EUROPEAN SOCIETY FOR EVOLUTIONARY BIOLOGY* **20**: 87–103
- Thomas D. S., K. D. Montagu y J. P. Conroy. 2007. Temperature effects on wood anatomy, wood density, photosynthesis and biomass partitioning of *Eucalyptus grandis* seedlings. *Tree Physiology* **27**: 251–260
- Tyree M. T. y M. H. Zimmermann. 2002. *Xylem Structure and the Ascent of Sap*. Springer-Verlag, 2a. edición. Berlin, Germany. 283 pág.
- Waller D.M. y D.A. Steingraeber. 1995. Opportunities and Constraints in the Placement of Flowers and Fruits. In *PLANT STEMS: Physiology and Functional Morphology*. Academic Press, San Diego, California. pág. 51-74
- West G. B. y James H. Brown. 2005. The origin of allometric scaling laws in biology from genomes to ecosystems: towards a quantitative unifying theory of biological structure and organization. *The Journal of Experimental Biology* **208**: 1575-1592

West G.B., J.H. Brown y B.J. Enquist. 2000. The Origin of Universal Scaling Laws in Biology. In *Scaling in Biology*. J.H. Brown y G.B. West eds. Oxford University Press. Nueva York, E.U.A. Pág. 87-112

Westoby M., D.S. Falster, A.T. Moles, P.A. Vesk e I. J.Wright. 2002. PLANT ECOLOGICAL STRATEGIES: Some Leading Dimensions of Variation Between Species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **33**:125–59

Wikelski M. 2005. Evolution of Body Size in Galapagos Marine Iguanas. *Proceedings of the Royal Academy of Sciences: Biological Sciences* **272** (1576): 1985-1993

Wilson B.F. 1995. Shrub Stems: Form and Function. In *PLANT STEMS: Physiology and Functional Morphology*. Academic Press, San Diego, California. pág. 91-104

APÉNDICE 1. ARTÍCULO DE REVISIÓN

RESTRICCIONES ONTOGENÉTICAS

RESUMEN

La existencia de restricciones ontogenéticas ha sido comúnmente invocada como una hipótesis alternativa a la selección natural para explicar la ausencia de ciertas variantes morfológicas en los organismos. Adicionalmente, ha sido considerado que dichas restricciones son insensibles a las condiciones ambientales y, por lo tanto, no modificables por la selección. Por lo tanto, fue realizada una revisión de la literatura relacionada con restricciones ontogenéticas poniendo especial énfasis en los artículos que evaluaran empíricamente su existencia y su relación con la evolución morfológica. Esta revisión mostró que, contrariamente a la percepción común de que las restricciones ontogenéticas no son susceptibles a la selección, en la mayoría de los casos en los que se detectó la existencia de restricciones también fue encontrado que éstas son sensibles a las condiciones ambientales y exhiben conductas compensatorias en función de las mismas. Es decir, las restricciones no producen configuraciones rígidas sino configuraciones que exhiben normas de reacción que pueden ser notablemente amplias. Especialmente destacables son los casos de las alometrías que han sido modificadas por selección artificial, puesto que éstas son consideradas el ejemplo por excelencia de restricciones ontogenéticas. La conclusión a la que conduce esta revisión es que las restricciones no constituyen fenómenos independientes de la selección natural, pudiendo incluso ser moldeadas por la misma. Sin embargo, la investigación sobre restricciones ontogenéticas ha estado limitada a organismos modelo (*Drosophila melanogaster* y *Arabidopsis thaliana*), grupos relativamente fáciles de investigar (insectos holometábolos) o grupos estudiados desde hace mucho tiempo (mamíferos). La escasez de investigaciones relacionadas con otros *taxa* es notable.

INTRODUCCIÓN

La teoría de la Síntesis Moderna constituye la conjunción de la teoría de la herencia de Mendel y la teoría de la selección natural. La primera pretende predecir y explicar la transmisión de los genotipos de una generación a otra. La segunda pretende explicar la manera en la que una población cambia en función de los fenotipos exhibidos por los individuos. Si la relación entre el genotipo y el fenotipo fuera transparente o lineal (que es la suposición en la que se basó la teoría de la Síntesis Moderna), los cambios en los tipos y frecuencias de los genotipos provocados por procesos como la segregación, la recombinación o la mutación podrían ser traducidos a cambios en el espacio fenotípico. Consecuentemente, los cambios en las formas biológicas podrían ser adecuadamente explicados por una combinación de procesos operando a nivel genético y por la selección natural operando a nivel fenotípico (Walsh, 2003).

Quizás debido a la suposición de que la relación entre el genotipo y el fenotipo es lineal, los artífices de la Nueva Síntesis desestimaron la relevancia que para el estudio de la evolución podrían tener las investigaciones sobre la embriología y los procesos de

desarrollo de los organismos. En cambio, el desarrollo era considerado por investigadores como Waddington y Schmalhausen la etapa en la que es más probable que las fuerzas evolutivas actúen para originar cambios fenotípicos, habiendo enfatizado la importancia de los procesos ambientales y epigenéticos en la traducción del genotipo al fenotipo (Schlichting y Pigliucci, 1998).

En 1979 S. J. Gould y R. Lewontin publicaron *“The Spandrels of San Marco and the Panglossian paradigm: a critique of the adaptationist programme”*. En este artículo, dichos autores cuestionaron la falta de rigor de los biólogos evolutivos para someter a prueba sus hipótesis adaptativas, además de criticar la tendencia de los mismos a asumir que el efecto de las restricciones estructurales o funcionales de los organismos sobre la selección natural es despreciable. Una de las consecuencias de la aparición de este artículo y de las investigaciones que le siguieron fue la creciente conciencia de que la epigénesis es un fenómeno central que determina la relación entre genotipo y fenotipo (Pigliucci y Kaplan, 2000), no siendo ni unívoco ni directo.

No obstante, la publicación de este artículo también generó una reacción, particularmente intensa en la década de los noventa, consistente en que la mayoría de los investigadores que se referían a las restricciones ontogenéticas las usaban como explicaciones *ad hoc* y no sometían a prueba su existencia. Esto es, asumían su existencia a partir de los patrones observados, sin verificarla independientemente (Antonovics y van Tienderen, 1991; Perrin y Travis, 1992). Lo anterior hizo claro que la adecuada valoración del papel de las restricciones ontogenéticas en la evolución requiere claridad respecto a su definición y a la manera en la que deben ser investigadas.

¿QUÉ SON LAS RESTRICCIONES ONTOGENÉTICAS?

Maynard-Smith *et al.* (1985) definieron la restricción ontogenética como *“desviación en la producción de fenotipos variables causada por la estructura, el carácter, la composición o la dinámica del sistema ontogenético”*. Estos autores atribuyeron la existencia de las restricciones ontogenéticas a factores como las propiedades de los materiales que constituyen a los organismos y los requerimientos que determinan el almacenamiento y la recuperación de la información empleada durante el desarrollo, entre otros.

A pesar de que pareció haber existido por mucho tiempo un fuerte antagonismo entre los investigadores que le otorgaron mayor poder explicativo a las restricciones

ontogenéticas (*e.g.* Gould, 1984) que a la selección natural en la evolución de la forma o viceversa (Walsh, 2003), ha habido también autores que consideran que estos dos procesos están indisolublemente ligados. De acuerdo con Schlichting y Pigliucci (1998), por ejemplo, las restricciones ontogenéticas son el resultado de la interacción de las restricciones genéticas o epigenéticas con las presiones selectivas. Las restricciones genéticas incluyen factores como la carencia o limitación de variación genética, el ligamiento, la pleiotropía, la dominancia o la epistasia. Las presiones selectivas son esencialmente de carácter mecánico, funcional y ecológico, siendo producidas por la interacción del embrión con su ambiente. Esta concepción de las restricciones ontogenéticas, si bien es general y no toma en consideración las numerosas sutilezas que caracterizan al desarrollo ontogenético (Løvtrup, 1988) y a su regulación (Minelli, 2003), respondió a la necesidad de delimitarlas de la manera más clara posible después de que este concepto empezó a ser usado con mucha vaguedad (Pigliucci y Kaplan, 2000)

La existencia de restricciones ontogenéticas es supuesta cuando son encontradas especies fósiles que no exhiben cambios de forma durante periodos muy prolongados de tiempo (Ridley, 1996), cuando una cierta transformación es rara en diferentes especies de un taxón dado, cuando son encontradas zonas vacías en un morfoespacio o cuando embriones que son tratados con teratógenos o sometidos a manipulación genética exhiben anomalías que tienden a estar limitadas a ciertos síndromes o conjuntos (Richardson y Chipman, 2003). Aunque la posible existencia de restricciones ontogenéticas es fácil de diagnosticar, el origen de las mismas puede ser complejo. Así, por ejemplo, ha sido encontrado que caracteres homólogos pueden ser generados y mantenidos por procesos ontogenéticos sorprendentemente diferentes. De esta manera, estructuras homólogas pueden ser generadas, en distintas especies, por diferentes genes (Roth, 1988), diferentes capas germinales (Wagner, 1989b), diferentes estructuras inductoras (Wagner 1989b, 1994; Wagner y Misof, 1993; Gilbert y Bolker, 2001) o diferentes secuencias ontogenéticas (Roth, 1988; Weston, 1988; Wagner, 1989b; Wagner, 2007; Atallah *et al.*, 2009). Inversamente, muchos caracteres que no constituyen homologías táticas (*sensu* Patterson, 1982) son generados por rutas ontogenéticas en las que participan elementos génicos compartidos (*e.g.* los ojos de los insectos y los ojos de los vertebrados; Abouheif, 1997).

Las restricciones ontogenéticas, manifestadas en la existencia de caracteres que son identificados como equivalentes a pesar de ser producidos por rutas ontogenéticas

variables, contribuyó entonces al hallazgo de los sorprendentes procesos que han conducido a la generación de las rutas del desarrollo. Ha sido encontrado, por ejemplo, que la diversidad fenotípica no es tanto el producto de nuevos genes como de permutaciones en el contexto (*i.e.* el tiempo y el lugar) en el que dichos genes son expresados, lo que ha generado que varias rutas de regulación génica hayan sido construidas mediante la cooptación de genes involucrados en el control de procesos ontogenéticos no relacionados (Roth, 1988). También se ha vuelto evidente que la evolución de nuevas rutas es un fenómeno raro y que el cambio evolutivo ocurre preferentemente a través de un extenso rearrreglo de las redes reguladoras génicas más que de las propias secuencias codificantes (Brakefield, 2006). Este ensamblaje de redes epigenéticas ocurrido en la historia evolutiva ha sido posible gracias a la versatilidad de ciertas moléculas (que pueden asumir funciones en rutas ontogenéticas muy diferentes) y a la duplicación de genes (que ha producido familias de genes parálogos cuyos miembros pueden desempeñar un gran número de funciones), entre otras características (Dickinson, 1995)

La estabilidad de los caracteres (a pesar de que en ocasiones los procesos ontogenéticos que los producen son diferentes) es garantizada por ciertas redes reguladoras genéticas, que posiblemente son las más conservadas y que, si bien especifican la identidad de los caracteres, no especifican sus estados de carácter. Estas redes, que son llamadas “Redes de Identidad de Caracteres” (ChIN, por sus siglas en inglés; Wagner 2007) podrían ser identificadas con las restricciones ontogenéticas.

Es pertinente preguntarse qué es lo que otorga robustez a estas redes reguladoras génicas. La respuesta es difícil debido a la gran cantidad de actores y de procesos involucrados, pero una opinión compartida por varios autores (West-Eberhad, 2003; Oster *et al.*, 1988) es que si los genes fueran responsables de la determinación directa de los procesos ontogenéticos que especifican la morfología, los sistemas ontogenéticos serían notablemente inestables e incapaces de compensar cualquier perturbación que afectara el desarrollo normal. Por su parte, Minelli (2003) considera la posibilidad de que la robustez de los sistemas ontogenéticos esté relacionada con la topología de las redes de interacción existentes entre las células u otros componentes del organismo en desarrollo. Este autor afirma que los sistemas ontogenéticos podrían constituir ejemplos de las redes libres de escala, que están caracterizadas por una distribución heterogénea de las interacciones entre nodos. Dichas redes exhiben una gran sensibilidad a ataques

sobre un número limitado de nodos clave pero, en cambio, son resistentes a niveles muy altos de deficiencias en el resto de los nodos (Albert, Jeong y Barabási, 2000).

Las restricciones ontogenéticas en diferentes niveles jerárquicos implican homología en distintos niveles jerárquicos.

La reevaluación del concepto de homología y el reconocimiento de que la homología es un fenómeno jerárquico posiblemente constituyan dos de las consecuencias más interesantes del hallazgo de la diversidad de procesos ontogenéticos que pueden producir caracteres iguales. Dichos hallazgos condujeron a Wagner (1994) a plantear su *concepto biológico de homología* (según el cual las estructuras son homólogas —..si comparten un conjunto de restricciones ontogenéticas, causadas por mecanismos autorreguladores de diferenciación de los órganos que actúan localmente...”), y a subrayar que no había que esperar que caracteres homólogos tuvieran rutas ontogenéticas similares o idénticas, sino sólo ciertas características del sistema ontogenético que necesitaban estar conservadas para producir las tres propiedades que deben exhibir los caracteres homólogos (conservación, individualidad y unicidad) (Wagner, 1989b). Este mismo fenómeno llevó a West-Eberhard (2003) a plantear la *homología en sentido amplio*, que admite la homología debida a un ancestro común distante y según la cual los productos de la evolución paralela o recurrente en los que la similitud en diferentes linajes proviene de la posesión de un plan corporal o propensiones ancestrales comunes son homólogos.

Varios autores han coincidido con West-Eberhard. Wake (1991), por ejemplo, analizó diversos caracteres morfológicos que evolucionaron mediante rutas ontogenéticas convergentes en salamandras de la familia Plethodontidae (*e.g.* fusión de las dos unidades del hueso premaxilar en los individuos adultos, reducción del número de dígitos de 5 a 4 en las extremidades posteriores). Aunque reconoció que la evolución convergente es considerada una prueba de evolución adaptativa, Wake afirmó que la evolución convergente de estos caracteres era probablemente debida a la limitación de opciones estructurales y ontogenéticas exhibidas por estas salamandras, quienes habrían heredado esas opciones de su ancestro común más cercano. Alberch y Gale (1984) encontraron que en los ordenes Anura y Caudata existe la tendencia hacia la reducción y pérdida de falanges y hasta de dedos completos de manera sorprendentemente convergente dentro de cada orden (*i.e.* ciertos elementos esqueléticos siempre son

perdidos antes que otros), lo que consideraron producto de la existencia de ciertos patrones ontogenéticos heredados de los ancestros comunes más cercanos. En el mismo sentido, la homoplasia encontrada en el número de formas con simetría bilateral en las flores del orden Asteridales fue atribuido por Donoghue y Ree (2000) a las restricciones ontogenéticas heredadas de su último ancestro común. Finalmente, Price y Pavelka (1996) afirmaron que las restricciones ontogenéticas son las causantes del paralelismo que encontraron en los patrones de coloración de aves del género *Phylloscopus*.

Brigandt (2003) y Abouheif (1997) se suman a la postura de estos autores, afirmando que la homología existe en diferentes niveles de la jerarquía biológica y que no es posible identificar o traducir de manera directa las homologías de un cierto nivel jerárquico en otro cualquiera.

¿CÓMO INVESTIGAR LA EXISTENCIA DE RESTRICCIONES ONTOGENÉTICAS?

Han sido propuestas cuatro pruebas para determinar si la ausencia de ciertas variantes fenotípicas es atribuible a la selección o a restricciones ontogenéticas. La primera de ellas, llamada predicción adaptativa, establece que si una hipótesis adaptativa predice exitosamente la relación entre un cierto carácter y el ambiente entonces (de no existir una hipótesis embriológica igualmente precisa) se optará por la hipótesis adaptativa (o, de existir una hipótesis embriológica que se ajuste a las observaciones pero no una hipótesis selectiva que lo haga, se optará por la hipótesis embriológica). La segunda prueba consiste en efectuar medidas directas del efecto de la selección sobre un carácter; si dicho carácter es sensible al régimen adaptativo impuesto, no hay razón para suponer que se trate de una restricción ontogenética (*e.g.* Frankino *et al.*, 2005; Frankino *et al.* 2007; Beldade *et al.*, 2002). La tercera prueba consiste en medir la heredabilidad de un carácter bajo el supuesto de que, si dicho carácter constituye una restricción, no debe ser genéticamente variable; la hipótesis de restricción es rechazada si el carácter en cuestión muestra una heredabilidad significativa. La cuarta y última prueba es la evidencia comparada, en la que los valores exhibidos por dos o más caracteres en diversas especies son graficados y analizados (Ridley, 1996). Utilizar exclusivamente cualquiera de estas cuatro pruebas podría llevar a resultados erróneos, por lo que es deseable utilizar simultáneamente más de una de ellas. Más aún, la investigación experimental resulta invaluable para establecer los

mecanismos causales de las restricciones ontogenéticas o evaluar de manera confiable si ciertos caracteres constituyen restricciones ontogenéticas (Futuyma *et al.*, 1995).

RESULTADOS OBTENIDOS EN LAS INVESTIGACIONES SOBRE RESTRICCIONES ONTOGENÉTICAS

Los experimentos realizados para evaluar la existencia de restricciones ontogenéticas han sido particularmente fructíferos en el caso de los insectos holometábolos, que constituyen modelos particularmente útiles para este propósito porque en ellos es posible evaluar la competencia entre diferentes estructuras en desarrollo cuando los recursos son limitados. Estas estructuras, que formarán parte del animal adulto, no crecen de manera sincronizada respecto al resto del cuerpo, sino que son generadas a partir de los discos imaginales entre las fases prepupal y pupal, una vez que el organismo ha dejado de comer y que el crecimiento somático ha concluido. El crecimiento de los tejidos imaginales ocurre en un sistema cerrado en el que se usan los nutrientes adquiridos durante la vida larval y, por consecuencia, en el que dichos tejidos compiten por nutrientes y la trayectoria de crecimiento y el tamaño final de un tejido (o disco) están influenciados por el crecimiento de los otros (Nijhout y Wheeler, 1996; Nijhout y Emlen, 1998; Stern y Emlen, 1999). Así, por ejemplo, Emlen (2001) encontró que la producción de cuernos en los escarabajos reduce el tamaño de las estructuras morfológicas adyacentes (antenas, ojos o alas, dependiendo de la ubicación de los cuernos) y que la fuerza de esta interacción disminuye al aumentar la distancia física entre los cuernos y las estructuras antagonistas.

Casi todas las investigaciones realizadas para evaluar la existencia de restricciones ontogenéticas, con las excepciones de la de Narita y Kuratani (2005, quienes encontraron que en la mayor parte de los mamíferos el número de vértebras toracolumbares es 19) y la de Richardson y Chipman (2003, que encontraron que el número de falanges en la mano de la mayoría de los mamíferos modernos tiene la fórmula 2-3-3-3-3) identificaron una fuerte interacción entre los sistemas ontogenéticos y las condiciones ambientales (*e.g.* Lieberman *et al.*, 2000; Oster *et al.*, 1988, Arthur, 2002; Hollander *et al.*, 2006; Pigliucci, 2007). Así, por ejemplo, las alas de *Drosophila melanogaster*, aunque tienen siempre la misma forma debido a interacciones compensatorias entre sus compartimentos, son fuertemente sensibles a la temperatura, que determina que los compartimentos contribuyan de manera diferencial a la

morfogénesis de la estructura (Guerra *et al.*, 1997). Por su parte, las coronas de los molares de los ratones de la subfamilia Murinae (en los que el segundo molar siempre contribuye con la tercera parte del área molar total y en los que las áreas de los sucesivos molares están fuertemente determinadas por el área de los que brotaron primero) muestran una fuerte relación con la dieta de los animales (Kavanagh *et al.*, 2007). A su vez, el número de vértebras cervicales en todos los mamíferos (con excepción de dos géneros) es siempre 7, habiendo sido encontrado que, en las personas, las anomalías en el desarrollo de las vértebras cervicales están asociadas con el Síndrome de Evacuación Torácica y con un porcentaje relativamente alto de varios tipos de cáncer infantil; esto parecería indicar que en la prevalencia del número de vértebras cervicales ha tenido un papel determinante la selección natural (Galis, 1999).

Los resultados mencionados son particularmente interesantes porque gran parte de los biólogos parece asumir que los factores ambientales afectan a los organismos exclusivamente cuando éstos han culminado su desarrollo, lo que constituye una idea equivocada. La selección opera sobre los fenotipos durante toda la ontogenia de los mismos, puesto que los genes no ejecutan un “plano” predeterminado, sino que perciben y reaccionan a los ambientes celulares y tisulares locales que son, a su vez, sensibles a las condiciones ambientales que experimenta el embrión, como aquellas de carácter mecánico, funcional y ecológico (Schlichting y Pigliucci, 1998). En todo caso, e ignorando el hecho de que algunos autores consideran que dichas condiciones no son selectivas (puesto que su efecto no depende de las diferencias existentes entre los individuos de una población), si se piensa que éstas interactúan con los sistemas ontogenéticos por múltiples generaciones, se llegará inevitablemente a la conclusión de que las restricciones ontogenéticas no constituyen un concepto puramente interno (Sansom, 2008).

Por otro lado, gran número de experimentos y de análisis comparados (Eberhard y Gutiérrez, 1991) ha mostrado que las relaciones alométricas (el ejemplo paradigmático de restricción ontogenética; Gould y Lewontin, 1979) pueden ser modificadas tras periodos de selección natural (Churchill, 1996) o de selección artificial sorprendentemente cortos. Tal es el caso del intercepto de la alometría de una especie de mariposa (Frankino *et al.*, 2007) o de la relación entre el área del ala anterior y el tamaño corporal en dicha especie (Frankino *et al.*, 2005). En otro caso, Beldade *et al.* (2002), encontraron que el tamaño relativo de las manchas en las alas de una especie de mariposa (que son formadas por un mecanismo ontogenético común y que, dada su

correlación genética positiva, deberían responder preferentemente, bajo selección artificial, a los cambios de tamaño de manera concertada) respondieron de manera muy intensa tanto a la selección concertada (para que ambas manchas fueran grandes o pequeñas) como a la desacoplada (para que una fuera pequeña mientras que la otra fuera grande), exhibiendo fenotipos que no son encontrados en las poblaciones naturales.

Es importante mencionar que el estudio de las restricciones ontogenéticas ha sido particularmente limitado en el caso de las plantas. Estos organismos exhiben un desarrollo esencialmente diferente al de los animales. Así, mientras que la mayor parte de éstos se caracteriza por exhibir una construcción unitaria, en las plantas el cuerpo completo del organismo es formado durante el desarrollo ontogenético pero, tras el mismo, sobreviene la organogenia, que implica el desarrollo de órganos individuales a partir de sus primordios (Weston, 1988). En los animales el desarrollo de órganos completos una vez que los individuos han alcanzado la madurez sexual es un fenómeno muy poco común, mientras que en las plantas las secuencias organogenéticas son repetidas, a menudo indefinidamente, durante el resto de sus vidas. A pesar de estas singularidades, o quizás debido a que el desarrollo de las plantas es considerado relativamente sencillo en relación con el de los animales (en virtud de que las plantas exhiben un número de tipos celulares y de tejidos muy inferior), el estudio de las restricciones ontogenéticas en las plantas es sorprendentemente escaso (al menos si se le compara con el que se ha hecho en animales), concentrándose fundamentalmente en organismos modelo como *Arabidopsis thaliana* (e.g. Pigliucci, 2007). En cuanto a investigaciones con otros organismos, en palmas del género *Geonoma* ha sido encontrado que la generación de un solo tallo está asociada con ejes más gruesos, mientras que múltiples tallos (ejes ramificados) están asociados con ejes más delgados. En plantas trepadoras de la familia Araceae, por otra parte, ha sido encontrada una aparente disyuntiva entre el tamaño de la hoja y la longitud de los internodos, que podría evidenciar la competencia por los mismos recursos (West-Eberhard, 2003).

¿LAS RESTRICCIONES SON PROCESOS QUE SE OPONEN AL CAMBIO EVOLUTIVO O QUE GENERAN EVOLUCIONABILIDAD?

Tradicionalmente la selección natural y las restricciones ontogenéticas han sido concebidas como fuerzas que actúan en direcciones opuestas en la evolución. A la

primera se le atribuye la generación del cambio fenotípico y a la segunda se le atribuye el evitar el cambio evolutivo y la adaptación (Brigandt, 2007).

Sin embargo, debe tenerse en consideración que la mayor parte de las restricciones no constituyen prohibiciones absolutas sobre la producción de ciertas variantes, sino que determinan sus probabilidades, que suelen ser bajas (Sansom, 2008). Así, aún sistemas cuyo cambio está altamente restringido son capaces de sufrir alteraciones radicales, como sucedió con el surgimiento del desarrollo directo en muchos *phyla*, en los cuales las restricciones más básicas del desarrollo temprano fueron rotas (Richardson y Chipman, 2003). Hay, incluso, varios investigadores que opinan que las restricciones ontogenéticas tienen un papel fundamental en la evolución morfológica (Grantham, 2004). Así, Walsh (2003) considera que las restricciones ontogenéticas, operando a través de la acción de genes reguladores y de módulos ontogenéticos, promueve la estabilidad de fenotipos adaptativos y predispone a los sistemas ontogenéticos a generar novedades fenotípicas adaptativas. Las restricciones son, según este autor, las responsables de generar tanto estabilidad como mutabilidad, que son las condiciones necesarias para la evolución adaptativa.

CONCLUSIONES

Como ha sido mencionado en reiteradas ocasiones, la gran ausente en la Síntesis Moderna fue la embriología. Probablemente una de las causas de esta omisión fue la errónea percepción de que el mapeo genotipo-fenotipo es lineal (Walsh, 2003). A pesar de que una gran cantidad de evidencia empírica ha indicado claramente que esta presunción es errónea, como consecuencia de ella fueron generadas una serie de creencias que han obstaculizado la investigación sobre la evolución de los fenotipos.

Una de esas creencias es que las restricciones ontogenéticas y la selección natural constituyen procesos estrictamente separados y antagónicos. En este esquema dicotómico, las restricciones ontogenéticas serían producto de las características internas de los organismos mientras que la segunda sería producto de factores externos a éstos. También de acuerdo con esta concepción, mientras que las restricciones obstaculizarían el cambio evolutivo, la selección lo provocaría (Sansom, 2008). Las dicotomías son útiles para interpretar y estructurar nuestras concepciones sobre determinados fenómenos. Sin embargo, el interpretarlas literalmente conduce a concepciones equivocadas. Tal es el caso de la dicotomía selección-restricciones

ontogenéticas. Así, se ha encontrado que las restricciones no son producto exclusivamente de las características internas de los organismos, sino que constituyen manifestaciones directas de selección, han sido moldeadas por ésta o podrían contribuir a la adaptación (Schwenk y Wagner, 2004). En cuanto al presunto antagonismo entre las restricciones y la selección, ha sido argumentado que éstas pueden ser indispensables para la evolución adaptativa al brindar a los organismos estabilidad y mutabilidad, que son las condiciones necesarias para dicha evolución (Walsh, 2003).

En el curso de este trabajo fue revisada literatura relacionada con la investigación sobre restricciones ontogenéticas. Gran parte de estas investigaciones fue efectuada con organismos modelo (*Drosophila melanogaster* o *Arabidopsis thaliana*) o con organismos en los cuales la investigación sobre restricciones es relativamente sencilla debido a las características de los mismos (*i.e.* insectos holometábolos). Hay que mencionar, también, la abundancia las investigaciones realizadas con vertebrados, particularmente anfibios y mamíferos.

Sin embargo, la mayoría de las investigaciones previamente mencionadas utilizó sólo una o dos de las cuatro pruebas con las cuales es posible investigar las restricciones (*i.e.* predicción adaptativa, selección sobre un carácter, heredabilidad y evidencia comparada; Ridley, 1996). En todo caso, una verdadera comprensión de la evolución morfológica requiere una investigación conjunta en la que sean evaluadas la variación genética, los mecanismos ontogenéticos, la selección natural y el desempeño de los fenotipos conjuntamente (Brakefield, 2006). Desafortunadamente, esta clase de investigaciones es extremadamente difícil debido a la enorme cantidad de recursos teóricos, analíticos, experimentales y sistemáticos que demanda.

BIBLIOGRAFÍA

Abouheif, E. 1997. Developmental genetics and homology: a hierarchical approach. *Trends in Ecology and Evolution* **12** (10): 405-408

Alberch, P. y E. A. Gale. 1984. A Developmental Analysis of an Evolutionary Trend: Digital Reduction in Amphibians. *Evolution* **39** (1): 8-23

Albert R., Jeong H. y A. L. Barabási. 2000. Error and attack tolerance of complex networks. *Nature* **406**: 378-382

Antonovics J. y P. H. van Tienderen. 1991. Ontoecogenophyloconstraints? The Chaos of Constraint Terminology. *Trends in Ecology and Evolution* **6** (5): 166-168

- Arthur W. 2002. The interaction between developmental bias and natural selection: from centipede segments to a general hypothesis. *Heredity* **89**: 239–246
- Atallah J., N. H. Liu, P. Dennis, A. Hon y E. W. Larsen. 2009. Developmental constraints and convergent evolution in *Drosophila* sex comb formation. *Evolution and development* **11** (2): 205–218
- Beldade P., K. Koops y P. M. Brakefield. 2002. Developmental constraints versus flexibility in morphological evolution. *Nature* **416**: 844-846
- Brakefield P. M.. 2006. Evo-devo and constraints on selection. *TRENDS in Ecology and Evolution* **21** (7): 362-368
- Brigandt I. 2003. Homology in Comparative, Molecular, and Evolutionary Developmental Biology: The Radiation of a Concept. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL ZOOLOGY (MOL DEV EVOL)* **299 B**: 9-17
- Brigandt I. 2007. Typology now: homology and developmental constraints explain evolvability. *Biology and philosophy* **22**: 709-725
- Cheverud J. M. 1984. Quantitative Genetics and Developmental Constraints on Evolution by Selection *Journal of Theoretical Biology* **110**:155-171
- Churchill S. E. 1996. Particulate Versus Integrated Evolution of the Upper Body in Late Pleistocene Humans: A Test of Two Models. *American Journal Of Physical Anthropology* **100**:559-583
- Dickinson, W. J. 1995. Molecules and morphology: where's the homology? *TIG* **11** (4):119-121
- Donoghue M. J. y R. H. Ree. 2000. Homoplasy and Developmental Constraint: A Model and an example from Plants. *AMERICAN ZOOLOGIST* **40**: 759-769
- Dworkin I. M., Tanda S. y E. Larsen. 2001. Are entrenched characters developmentally constrained? Creating biramous limbs in an insect. *Evolution and Development* **3** (6): 424–431
- Eberhard, W. G. y E. E. Gutiérrez. 1991. Male Dimorphisms in Beetles and Earwigs and the Question of Developmental Constraints. *Evolution* **45** (1): 18-28
- Emlen, D. J. 2001. Costs and the Diversification of Exaggerated Animal Structures. *Science* **291** (5508):1534-1536
- Frankino W. A., B. J. Zwaan, D. L. Stern y P. M. Brakefield. 2005. Natural Selection and Developmental Constraints in the Evolution of Allometries. *Science* **307**: 718-720
- Frankino W. A., B. J. Zwaan, D. L. Stern, y P. M. Brakefield. 2007. Internal and External Constraints in the Evolution of Morphological Allometries in a Butterfly. *Evolution* **61** (12): 2958–2970
- Futuyma, D. J., Keese, M. C. y D. J. Funk. 1995. Genetic Constraints on Macroevolution: The Evolution of Host Affiliation in the Leaf Beetle Genus *Ophraella*. *Evolution* **49** (5): 797-809
- Galis F. 1999. Why Do Almost All Mammals Have Seven Cervical Vertebrae? Developmental Constraints, *Hox* Genes, and Cancer. *Journal of Experimental Zoology (Mol Dev Evol)* **285**: 19-26
- Gilbert S. F. y J. A. Bolker. 2001. Homologies of Process and Modular Elements of Embryonic Construction. *Journal of Experimental Zoology (Mol Dev Evol)* **291**:1–12

- Gould S. J. y R. C. Lewontin. 1979. The Spandrels of San Marco and the Panglossian paradigm: a critique of the adaptationist programme. *Proc. R. Soc. London B Biol. Sci.* **205**: 581-598
- Grantham T. A. 2004. Constraints and Spandrels in Gould's *Structure of Evolutionary Theory*. *Biology and Philosophy* **19**: 29-43
- Guerra D., M. C. Pezzoli, G. Giorgi, F. Garoia y S. Cavicchi. 1997. Developmental constraints in the *Drosophila* wing. *Heredity* **79**: 564-571
- Hollander J., D. C. Adams y K. Johannesson. 2006. Evolution of Adaptation Through Allometric Shifts in a Marine Snail. *Evolution* **60** (12): 2490-2497
- Kavanagh K. D., A. R. Evans y J. Jernvall. 2007. Predicting evolutionary patterns of mammalian teeth from development. *Nature* **449**: 427-433
- Klingenberg, C. P. 2005. Developmental Constraints, Modules and Evolvability. In *VARIATION. A CENTRAL CONCEPT IN BIOLOGY*. B. Hallgrímsson y B. K. Hall eds. Elsevier Academic Press. San Diego, U.S.A. pág. 219-247
- Lieberman D. E., O. M. Pearson, K. M. Mowbray. 2000. Basicranial influence on overall cranial shape. *Journal of Human Evolution* **38**: 291-315
- Løvtrup, S. 1988. Epigenetics. In *Ontogeny and Systematics*. C. J. Humphries ed. Columbia University Press. Nueva York, U.S.A. pág. 189-227
- Maynard-Smith J., R. Burian, S. Kauffman, P. Alberch, J. Campbell, B. Goodwin, R. Lande, D. Raup y L. Wolpert. 1985. DEVELOPMENTAL CONSTRAINTS AND EVOLUTION. *THE QUARTERLY REVIEW of BIOLOGY* **60** (3):265-286
- Minelli A. 2003. The development of animal form. *Ontogeny, morphology and evolution*. Cambridge University Press. Cambridge, U.K. 323 pág.
- Müller, G.B y G. P. Wagner. 1996. Homology, Hox genes and Developmental Integration. *American Zoologist* **36**: 4-13
- Narita Y. y S. Kuratani. 2005. Evolution of the Vertebral Formulae in Mammals: A Perspective on Developmental Constraints. *Journal of Experimental Zoology (Mol Dev Evol)* **304 B**: 91-106
- Nijhout H. F. y D. J. Emlen. 1998. Competition among body parts in the development and evolution of insect morphology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 3685-3689.
- Nijhout H. F. y D. E. Wheeler. 1996. Growth Models of Complex Allometries in Holometabolous Insects. *The American Naturalist* **148** (1): 40-56
- Oster G. F., N. Shubin, J. D. Murray y Pere Alberch. 1988. Evolution and Morphogenetic Rules: The Shape of the Vertebrate Limb in Ontogeny and Phylogeny *Evolution* **42** (5): 862-884
- Patterson C. 1982. Morphological Characters and Homology. In *PROBLEMS IN PHYLOGENETIC RECONSTRUCTION*. K. A. Joyse y A. C. Friday eds. Academic Press. Londres, U.K. pág. 21-74
- Perrin N. y J. Travis. 1992. On the Use of Constraints in Evolutionary Biology and Some Allergic Reactions to Them. *Functional Ecology* **6** (3): 361-363
- Pigliucci M. 2007. Finding the Way in Phenotypic Space: The Origin and Maintenance of Constraints on Organismal Form. *Annals of Botany* **99** (6): 1-6
- Pigliucci M. y J. Kaplan. 2000. The fall and rise of Dr Pangloss: adaptationism and the *Spandrels* paper 20 years later. *Trends in Ecology and Evolution* **15** (2): 66-70
- Price T. y M. Pavelka. 1996. Evolution of a colour pattern: history, development, and selection. *Journal of Evolutionary Biology* **9**: 451-470
- Richardson M. K. y A. D. Chipman. 2003. Developmental Constraints in a Comparative Framework: A Test Case Using Variations in Phalanx Number During Amniote Evolution. *Journal of Experimental Zoology (Mol Dev Evol)* **296 B**: 8-22

- Ridley, M. 1996. *Evolution*. Blackwell Science. Cambridge, U.S.A. 719 pág.
- Roth, V. L. 1988. The Biological Basis of Homology. In *Ontogeny and Systematics*. C. J. Humphries ed. Columbia University Press. Nueva York, U.S.A. pág. 1-25
- Sansom, R. 2008. The nature of developmental constraints and the difference-maker argument for externalism. *Biology and philosophy* ¿?
- Schlichting C. D. y M. Pigliucci. 1998. *PHENOTYPIC EVOLUTION. A Reaction Norm Perspective*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, U.S.A. 387 pág.
- Schwenk, K. y G. P. Wagner. 2004. The Relativism of Constraints on Phenotypic Evolution. In *Phenotypic Integration. Studying the Ecology and Evolution of Complex Phenotypes*. M. Pigliucci y K. Preston eds. Oxford University Press. Nueva York, U.S.A. pág. 390-408
- Stern, D. L. y D. J. Emlen. 1999. The developmental basis for allometry in insects. *Development* **126**: 1091-1101
- Travisano M., J. A. Mongold, A. F. Bennett y R. E. Lenski. 1995. Experimental Tests of the Roles of Adaptation, Chance, and History in Evolution. *Science New Series* **267** (5194): 87-90
- Wagner, G. P. 1989a. THE BIOLOGICAL HOMOLOGY CONCEPT. *Annual Review of Ecology and Systematics* **20**: 51-69
- Wagner, G. P. 1989b. THE ORIGIN OF MORPHOLOGICAL CHARACTERS AND THE BIOLOGICAL BASIS OF HOMOLOGY. *Evolution* **43** (6): 1157-1171
- Wagner, G. P. 1994. Homology and the mechanisms of development. In *Homology. The hierarchical basis of comparative biology*. B. K. Hall ed. Academic Press. San Diego, U.S.A. pág. 274-299.
- Wagner G. P. 2007. The developmental genetics of homology. *Nature Reviews. Genetics* **8**: 473-479
- Wake, D. B. 1991. Homoplasy: the Result of Natural Selection, or Evidence of design limitation? *The American Naturalist* **138** (3): 543-567
- Walsh D. M. 2003. Fit and Diversity: Explaining Adaptive Evolution. *Philosophy of Science* **70** (2): 280-301
- West-Eberhard M. J. 2003. *Developmental Plasticity and Evolution*. Oxford University Press. Oxford, U. K. 794 pág.
- Weston, P. H. 1988. Indirect and Direct Methods in Systematics. In *Ontogeny and Systematics*. C. J. Humphries ed. Columbia University Press. Nueva York, U.S.A. pág. 27-56

APÉNDICE 2. ARTÍCULO DE REVISIÓN

OPTIMALIDAD Y MÉTODO COMPARATIVO

RESUMEN

Las hipótesis adaptativas pueden ser sometidas a prueba utilizando modelos de optimalidad, estudios de genética cuantitativa, el método comparativo y experimentos de selección. Este artículo está relacionado con la primera y la tercera de estas aproximaciones. El uso de modelos de optimalidad consiste en la comparación de las características de los organismos con las predichas por hipótesis de diseño óptimo, buscando la mejor solución posible a las más diversas características. Las virtudes de esta aproximación es que los modelos plantean explícitamente las restricciones y las suposiciones en las que están basados, por lo que la falta de correspondencia entre las predicciones del modelo y la realidad pueden ayudar a detectar los elementos incorrectos del modelo. Entre sus desventajas está que los resultados extraídos a partir de una especie no necesariamente son aplicables a otras. Esto puede ser resuelto usando el método comparativo, que consiste en la búsqueda de características comunes a varias especies y en el análisis de los ambientes en los que tales convergencias existen. Supone que el hallazgo de covariación entre los mismos caracteres en diversas especies sugiere adaptación, particularmente si los taxones estudiados están distantemente relacionados. Sus mayores cualidades son que permite demostrar la generalidad de presuntas adaptaciones y posibilita la inspección de áreas del morfoespacio que el análisis de especies individuales no permite alcanzar. Entre sus desventajas se encuentra el hecho de que está basado en la detección de correlaciones, pero éstas no necesariamente involucran causalidad. Por lo tanto, sin la acumulación de datos a niveles jerárquicamente inferiores, el método comparativo no puede revelar las causas de una cierta observación. Por consiguiente, dicho método debe ser complementado no sólo con modelos de optimalidad, sino también por estudios de genética de poblaciones y experimentos de selección natural.

Introducción

En la actualidad, las hipótesis adaptativas pueden ser sometidas a prueba utilizando alguno de los siguientes recursos teórico-metodológicos (Balász *et al.*, 2009):

1) Diseño de modelos de ingeniería (en el caso de caracteres estructurales) o de modelos basados en supuestos económicos (en el caso de gran número de caracteres) en los que las características de los organismos son comparadas con aquellas predichas por las hipótesis de diseño óptimo (esto es, modelos de optimalidad).

2) Estudios de genética cuantitativa, los cuales investigan la evolución de caracteres cuantitativos correlacionados que están determinados genéticamente en buena medida (Steppan *et al.*, 2002)

3) El método comparativo, basado en la predicción de que las comparaciones interespecíficas permiten detectar alteraciones en un cierto carácter adaptativo producidas por diferentes presiones de selección.

4) La realización de experimentos en los que el carácter o los caracteres de interés son manipulados experimentalmente y su(s) desempeño(s) es(son) evaluado(s). Desafortunadamente, los experimentos de evolución adaptativa no son posibles más que en microorganismos, tales como bacterias o levaduras, debido a la relativa sencillez fenotípica de los mismos, su facilidad para ser propagados y sus breves tiempos generacionales. En esta clase de experimentos, los microorganismos son cultivados por periodos de entre 500 y 1000 generaciones en ambientes relativamente constantes.

Con la salvedad de las hipótesis sometidas a prueba con la cuarta de estas metodologías, una de las peculiaridades de las otras tres es que a menudo tienen que recurrir a la evaluación indirecta de la adecuación, puesto que ésta es extremadamente difícil de estimar en la mayoría de los organismos (Balász *et al.*, 2009).

Esta revisión tocará temas vinculados con la primera y la tercera de las metodologías previamente mencionadas. Aunque quizás resulte innecesario mencionarlo, hay que recordar que ambas metodologías intentan responder al “¿por qué?” de las características exhibidas por los organismos (esto es, a las causas finales de las mismas) y no a la pregunta “¿cómo?” (que es aquella que aborda las causas próximas o mecánicas de tales características) (Barnes y Partdridge, 2003). Por tal razón, ninguno de estos métodos hace referencia explícita a los posibles determinantes genéticos de los caracteres que estudian, lo que ha llevado a algunos investigadores a criticarlos (Bull y Wang, 2010).

Esta revisión está dividida en cuatro secciones. La primera de ellas aborda los modelos de optimalidad, estando subdividida a su vez en cuatro apartados. En el primero se mencionan los supuestos en los que se basan estos modelos y la estructura de los mismos, en el segundo se mencionan de manera breve algunos de los incontables modelos de optimalidad que han sido planteados y se desarrollan de manera más amplia dos que no han sido sometidos a prueba con evidencia empírica. En el tercer apartado, se mencionan brevemente algunas predicciones exitosas hechas por los modelos de optimalidad.

La segunda sección está dedicada al método comparativo, habiéndose subdividido a su vez en cuatro apartados. El primero de ellos examina brevemente los fundamentos y los supuestos que subyacen al método comparativo, además de subrayar las diferencias

entre éste y las pruebas de hipótesis adaptativas haciendo uso de los modelos de optimalidad. El segundo menciona brevemente los requerimientos, la estructura y los tipos de método comparativo, así como los métodos de reconstrucción filogenética que constituyen un requisito indispensable para éstos. El tercer apartado menciona por qué es necesaria la utilización de estos métodos para realizar inferencias adaptativas y menciona algunos ejemplos de lo que puede ocurrir cuando no son tomadas en cuenta de manera implícita las relaciones filogenéticas entre las especies. Finalmente, en el cuarto apartado son mencionados algunos ejemplos en los que el método comparativo ha sido utilizado exitosamente para someter a prueba modelos de optimalidad.

En la tercera sección son mencionados los aportes que puede hacer el método comparativo a la anatomía ecológica del tallo, que es un área de la biología que a pesar de su prolongada historia y el gran número de datos que ha generado, ha empleado en muy contadas ocasiones los nuevos desarrollos del método comparativo e, incluso, ha ignorado el efecto que podrían tener las relaciones filogenéticas sobre las hipótesis adaptativas que han sido hechas en este campo (Rosell *et al.*, 2007).

En la última sección de este artículo se mencionan los aspectos en los que el sometimiento a prueba de hipótesis adaptativas por medio de modelos de optimalidad y por medio del método comparativo pueden ser complementarios y brindar una comprensión más completa de la relevancia adaptativa de ciertos caracteres o conjuntos de caracteres.

1. Modelos de optimalidad

1.1 Estructura y supuestos de los modelos de optimalidad

La teoría de la optimización, en la cual están basados los modelos de optimalidad, es una rama de las matemáticas que fue desarrollada fundamentalmente por personas vinculadas con la economía. Esta teoría busca la mejor solución posible a problemas de diversa índole, que en biología pueden ser desde la mejor estrategia para la inversión reproductiva en un ave hasta el mejor diseño para una viga o un hueso (Alexander, 2001).

El principal supuesto de los modelos de optimalidad es que la selección natural maximiza la adecuación, de manera que si los modelos planteados son correctos, deben

ser capaces de predecir la estrategia observada en la naturaleza, que es aquella que conduce a una mayor adecuación de los individuos, el genotipo o el grupo (Holland Jones, 2011).

Un modelo de optimalidad requiere una función objetivo o un criterio de optimalidad (una característica presumiblemente vinculada a la adecuación) que debe ser maximizado, un conjunto de restricciones que define lo que es biológicamente factible, y un conjunto de estrategias que conducen a tácticas o a fenotipos alternativos. Otra de las suposiciones centrales de todos estos modelos es que existen relaciones negativas o *trade-offs* entre los componentes de la adecuación (Ho *et al.*, 2004), o entre los caracteres que los sustituyen en los modelos, debido a que la energía a la que pueden recurrir los organismos es limitada (Holland Jones, 2011). Lo anterior restringe considerablemente el conjunto de posibles combinaciones de caracteres (Ho *et al.*, 2004) y, adicionalmente, provoca que la adopción de una u otra táctica alternativa por parte de los organismos produzca soluciones diferentes al problema de garantizar la persistencia evolutiva (Holland Jones, 2011).

Es importante mencionar que cualquiera de los criterios de optimización capaces de maximizar la adecuación darwiniana en un caso particular podría no tener el mismo efecto en otras circunstancias (Harvey y Pagel, 1991). Por consiguiente, los modelos de optimalidad no sólo especifican los criterios de optimización y los conjuntos de estrategias alternativas, así como los beneficios de cada una de ellas, sino también las condiciones en las cuales una u otra estrategia sería la óptima (Ho *et al.*, 2004; Pearcy y Valladares, 1999).

Como se mencionó, el atributo que idealmente es maximizado en los modelos de optimización es la adecuación individual (definida por Parker y Maynard-Smith -1990- como el número de descendientes producidos durante toda su vida por un individuo que siguió una estrategia dada). Sin embargo, esta variable es difícil de medir, de manera que en su lugar son utilizadas otras que se piensa que están fuertemente asociadas con ella. Así, la asimilación de carbono o la tasa de ganancia de energía durante el forrajeo son utilizadas como sustitutos de la adecuación por los fisiólogos y los ecólogos, respectivamente (Fansworth y Niklas, 1995). En el siguiente apartado serán mencionados otros atributos empleados como sustitutos de la adecuación.

Los modelos de optimalidad pueden ser generales (como sucede a menudo cuando se hacen las primeras aproximaciones) o específicos, en cuyo caso sus autores deben contar con un conocimiento mecanístico muy profundo del sistema que se está

sometiendo a prueba (Harvey y Pagel, 1991). Los modelos generales involucran pocas suposiciones y sólo son capaces de hacer predicciones cualitativas o de mostrar tendencias generales de algún tipo (aunque la existencia de varias predicciones independientes cualitativamente correctas es considerada una prueba sólida de la corrección del modelo –Haufe, 2008), mientras que los segundos son construidos en torno a un caso particular y pueden dar predicciones cuantitativamente correctas. Sin embargo, hay autores que consideran, no sin razón, que los modelos específicos ganan precisión a costa de sacrificar la generalidad de sus hallazgos (Houston, 2011), como se verá en el siguiente apartado.

La principal virtud de la teoría de la optimalidad no radica en que las predicciones emanadas de sus modelos sean correctas. De hecho, en muchos casos tales predicciones no lo son. Así, por ejemplo, una suposición frecuente de algunos modelos de selección de hospederos por parte de insectos fitófagos era que las hembras adultas podían evaluar a los hospederos en función de la adecuación que conferirían a sus descendientes, predicción que rara vez fue ratificada por las pruebas empíricas. Casos como el anterior permiten examinar de manera detallada el realismo de las suposiciones del modelo (Mayhew, 1997), lo que conduce a la que sin duda es una de las grandes virtudes de los modelos de optimalidad. Tal virtud es que dichos modelos plantean explícitamente tanto las restricciones como las suposiciones en las que están basados (Harvey y Pagel, 1991; Mayhew, 2001), de manera que cuando son comparados con las observaciones hechas en la naturaleza o en experimentos (Percy y Valladares, 1999) y es encontrado que su ajuste con dichas observaciones es pobre, puede ser hecho un examen detallado de los supuestos que fundamentan el modelo, los cuales pueden ser reevaluados y se puede detectar cuáles son los elementos incorrectos (Mayhew, 2001; Hedenström, 2008).

En este sentido, hay que destacar que el objetivo de los modelos de optimalidad no es probar que el proceso evolutivo conduce a incrementos en la adecuación, sino evaluar el conocimiento que tenemos de ese proceso. Así, si las predicciones de un modelo indican que cierta conducta o combinación de caracteres debe presentarse en ciertas circunstancias y esta predicción no es apoyada por las observaciones, es muy posible que los elementos y las interacciones que constituyen el fenómeno modelado no estén siendo correctamente comprendidos (Alexander, 2001).

La optimización no es, pues, un sustituto de investigaciones detalladas (Berninger y Hari, 1993), pero sí pretende ser un medio para construir hipótesis de las circunstancias en las que se generará una estrategia evolutivamente estable (o ESS, por sus siglas en

inglés), que es aquella que, de ser adoptada por todos los miembros de una población, no podrá ser sustituida por ninguna otra estrategia bajo la influencia de la selección natural (Alerstam y Hedenström, 1998).

Para finalizar, hay que mencionar que una de las mayores dificultades enfrentadas para someter a prueba las hipótesis de optimalidad consiste en la relativa escasez de las observaciones requeridas para hacerlo (Fansworth y Niklas, 1995).

1.2 Algunos ejemplos de modelos de optimalidad

Los modelos de optimalidad han tenido un gran impacto en muchas disciplinas de la biología y han sido formulados para áreas tan disímboles como la relación entre ciertos caracteres vegetales y la disminución del ataque de patógenos o de la herbivoría, para algunas conductas de evasión de depredadores en ciertas especies de animales (Maurer y Sih, 1998), para las características del sistema inmunológico de los mamíferos (Graham, 2001), para la migración en las aves y en los murciélagos (Alerstam y Hedenström, 1998; Hedenström, 2008; Hedenström, 2009), para el forrajeo tanto en animales (Aigner, 2001) como en plantas (Fansworth y Niklas, 1995; Magnani *et al.*, 2000), para el vuelo de los insectos (Berman y Wang, 2007), para las rutas metabólicas en las bacterias (Balász *et al.*, 2009) y, por supuesto, para numerosos caracteres relacionados con la historia de vida (como el tamaño de las crías o la edad y el tamaño a los cuales se alcanza la madurez sexual) (Maurer y Sih, 1998).

A continuación se describen, de manera sintética, tres de estos modelos de optimalidad a fin de ilustrar de manera somera la estructura y las predicciones a las que arriban dichos modelos. Los dos primeros están relacionados con la adquisición de recursos abióticos por parte de las plantas y uno de ellos con la polinización de las mismas. Sólo uno de ellos fue sometido a prueba con evidencia empírica.

1.2.1 Modelo de optimalidad relacionado con la adquisición de CO₂

Anten (2002) formuló un modelo cuyo criterio de optimización fue la ganancia de carbono diaria por unidad de nitrógeno en una comunidad vegetal. Demostró matemáticamente que, para una cantidad dada de nitrógeno en el dosel de dicha comunidad, existe un índice de área foliar (*i.e.* área foliar por unidad de superficie) por encima del cual ninguna planta podrá incrementar su tasa fotosintética aun cuando

incremente su área foliar. Este modelo, en el cual la respuesta de los individuos depende de lo que sea hecho por sus competidores, es un ejemplo de la llamada “optimización competitiva” u “optimización dependiente de la frecuencia” (Parker y Maynard-Smith, 1990)

1.2.2 Modelo de optimalidad relacionado con la interacción entre plantas y polinizadores

La increíble variación en la forma de las flores ha dado lugar a la formulación de un gran número de modelos de optimalidad y ha sido atribuida a las relaciones de coevolución entre las plantas y sus polinizadores. A partir de la década de los setentas del siglo XX fueron formuladas tres ideas generales sobre la evolución morfo-funcional de las flores. De acuerdo con la primera de ellas, llamada “principio del polinizador más efectivo”, las plantas deben desarrollar especializaciones cuyo objetivo sean sus polinizadores más efectivos, mientras que de acuerdo con la tercera una gran diferencia en la efectividad de los diferentes polinizadores es un prerrequisito para que las plantas desarrollen especializaciones que atraigan preferentemente a los polinizadores más eficientes. Aigner (2001) planteó un modelo de optimalidad, basado a su vez en modelos básicos de selección fenotípica, de acuerdo con el cual las plantas sólo desarrollarán una mayor especialización que les permita atraer a los polinizadores más eficientes cuando la ganancia marginal en la adecuación exceda la pérdida marginal en la adecuación provocada por la disminución en la adaptación a todos los demás polinizadores.

1.3 Predicciones exitosas hechas por los modelos de optimalidad

El estudio de la adaptación por medio de modelos de optimalidad ha tenido algunos éxitos notables. Tal es el caso de la explicación sobre las desviaciones en la proporción de uno y otro sexo en la progenie de ciertas especies (Bull y Wang, 2010; Mayhew, 2001), de la conducta altruista y de ciertos hábitos de forrajeo, en los que ha habido una impresionante correspondencia entre la teoría y los datos (Mayhew, 2001). Sin embargo, el respaldo a la teoría de asignación sexual será mencionado en la sección correspondiente al método comparativo puesto que en él se utilizaron análisis interespecíficos.

Existen otros ejemplos de éxitos menos espectaculares en los que los modelos de optimalidad han sido sometidos a prueba y han contado con el respaldo de observaciones

empíricas efectuadas en una sola especie. A continuación se mencionan brevemente tres de ellos.

1.3.1 Modelo de optimalidad relacionado con la adquisición de fósforo y agua

Ho *et al.* (2004) presentaron un modelo de crecimiento de las raíces de frijol en condiciones de disponibilidades uniformes de agua y de fósforo en el perfil edáfico, de disponibilidad uniforme de agua en dicho perfil pero disponibilidad superficial de fósforo, de disponibilidad profunda del agua y disponibilidad uniforme de fósforo y, finalmente, de disponibilidad profunda de agua y disponibilidad superficial de fósforo. Estos autores predijeron que la conducta óptima de una planta debe ser colocar sus raíces por debajo del recurso ubicado más superficialmente hasta que el beneficio marginal de hacerlo sea exactamente igual al costo marginal.

1.3.2 Modelo de optimalidad sobre el tamaño de la progenie

La teoría predice que las madres deben producir descendientes de un tamaño tal que maximice la adecuación de sus madres. Dado que éstas tienen una cantidad limitada de recursos disponibles para la reproducción, ellas pueden tener muchas crías de talla pequeña o menos crías de tallas más grandes. La primera solución será adoptada por las madres si la relación entre la sobrevivencia y el tamaño de las crías es débil y, a la inversa, si tal relación es muy intensa, las madres producirán pocas crías de mayor tamaño.

Observaciones empíricas han mostrado, por otro lado, que las madres tienden a producir crías de mayor tamaño a temperaturas más bajas. En congruencia con las predicciones mencionadas en el párrafo anterior y con las observaciones empíricas mencionadas en éste, Bownds *et al.* (2010) encontraron que el tamaño de las crías está relacionado con la adecuación de las hembras del pez cebra (*Danio rerio*) y que dichas crías exhiben el mayor tamaño a las temperaturas más bajas, aunque exhibieron el tamaño intermedio en las temperaturas más altas. Lo anterior parece apoyar, en buena medida, las predicciones del modelo de optimalidad.

2. El método comparativo

2.1 Fundamentos y supuestos del método comparativo. Diferencias entre éste y los modelos de optimalidad.

El método comparativo se ubica en la interfase entre las dos tradiciones clásicas de la biología comparada, que son la reconstrucción de árboles filogenéticos y el estudio de la adaptación (Harvey y Pagel, 1991).

En términos laxos, puede decirse que el método comparativo es, simple y llanamente, la búsqueda interespecífica de características o conjuntos de características comunes a más de un *taxa* (esto es, la búsqueda de convergencias), así como el análisis de los ambientes en los que tales convergencias presuntamente existieron o en los que tales convergencias existen en la actualidad.

Si se enfoca en la observación de conjuntos de especies actuales, el método comparativo busca, entonces, respuestas fenotípicas similares a condiciones ambientales semejantes, asumiendo que la asociación entre los caracteres y el ambiente puede ser considerada evidencia de adaptación (Harvey y Pagel, 1991). Para numerosos autores vinculados con la Sistemática (*e.g.* Ackerly, 1999), la ocurrencia independiente del mismo carácter o conjunto de caracteres en condiciones ambientales similares brinda una de las evidencias más fuertes de la acción de la selección natural. Como ejemplos canónicos de este tipo de inferencia se tienen la evolución reiterada de la fotosíntesis C₄ en varios linajes que habitan en ambientes calientes y/o con altas concentraciones de CO₂ o el surgimiento múltiple de la carnivoría en las plantas (Ackerly, 1999). Más aún, varios científicos consideran que el solo hecho de encontrar una covariación semejante entre los mismos caracteres en diversas especies constituye una fuente fundamental de inferencias de adaptación, particularmente si se trata de *taxa* distantemente relacionados, puesto que en estos casos no puede ser invocada la existencia de restricciones ontogenéticas compartidas que hayan sido heredadas de un ancestro común como origen de la semejanza en sus respuestas fenotípicas (Ackerly, 1999; Olson *et al.*, 2009). Quizás una de las covariaciones entre caracteres más generalizada y más sugerente sea la relación positiva entre la longitud del cuerpo o el tamaño corporal y el tiempo generacional (Bonner, 2006). Otros casos igualmente sugerentes serán mencionados en el apartado 2.4.

Sin embargo, a pesar de que los científicos dedicados al estudio de las convergencias consideran que éstas constituyen pruebas más contundentes de adaptación entre más lejanamente relacionadas estén las especies que las exhiben, investigaciones realizadas en especies del mismo género a menudo han demostrado que aún en el caso de taxones tan cercanamente relacionados, las similitudes funcionales y fisiológicas han surgido independientemente (Ackerly, 1999). En todo caso, no debe olvidarse que la fuerza de cualquier inferencia de convergencia adaptativa se incrementa si la aparición de caracteres similares ocurre en condiciones ambientales semejantes (Ackerly, 1999)

A partir de lo mencionado en los párrafos anteriores, es claro que una de las diferencias esenciales entre los modelos de optimalidad y el método comparativo es el nivel de análisis en el que tradicionalmente trabaja cada uno de ellos. Así, mientras que gran parte de los modelos de optimalidad se ha concentrado en investigar a nivel poblacional o intraespecífico si un cierto carácter o conjunto de caracteres está optimizado para desempeñar una cierta función, el principal estímulo de las investigaciones comparadas ha sido el hallazgo de sorprendentes regularidades en la relación entre caracteres a nivel interespecífico, lo cual ha sugerido nuevas ideas sobre la relevancia adaptativa de tales regularidades (Harvey y Pagel, 1991) y ha conducido a evaluar si un cierto carácter o conjunto de caracteres está asociado de manera predecible con una cierta función (Hansen, 1997) o con ciertas características medioambientales. En cuanto al tipo de caracteres empleados en los estudios comparativos, éstos pueden ser aquellos usados por los genetistas de poblaciones o los empleados en los modelos de optimalidad (Harvey y Pagel, 1991).

Tradicionalmente, el método comparativo fue considerado mucho menos riguroso que la investigación sobre adaptaciones basada en modelos de optimalidad. Sin embargo, a partir de finales de la década de los setentas del siglo XX, hubo drásticas mejorías en las metodologías empleadas en investigaciones comparativas. Tales metodologías serán mencionadas brevemente en el siguiente apartado.

2.2 Requerimientos, estructura y tipos de método comparativo

Como se mencionó en el apartado anterior, las investigaciones comparadas no necesariamente tienen que ser efectuadas utilizando especies cercanamente emparentadas. Sin embargo, un requisito más que deseable para realizar cualquier análisis comparativo es tener una hipótesis relativamente robusta de las relaciones de

parentesco entre las especies que van a ser comparadas. Las hipótesis filogenéticas simplemente nos dicen qué pares de especies comparten ancestros comunes más recientes (Harvey y Pagel, 1991), lo que constituye un primer paso para la inferencia de la evolución de caracteres convergentes.

En la actualidad, las hipótesis filogenéticas son construidas utilizando el método de parsimonia, el método de máxima verosimilitud o la estadística bayesiana. El método de parsimonia está basado en el principio de la navaja de Occam, según el cual las hipótesis más probables son aquellas que hacen el menor número de nuevas suposiciones. Cuando este principio se traslada al marco de las reconstrucciones filogenéticas, implica favorecer aquella hipótesis que sea sustentada por el menor número de cambios evolutivos (Morrone, 2000). En el método de máxima verosimilitud, la hipótesis filogenética escogida es aquella que maximiza la probabilidad de los datos dadas las relaciones de parentesco propuestas en la hipótesis y el modelo de sustitución molecular más plausible; el término verosimilitud es utilizado para enfatizar el hecho de que la hipótesis filogenética, y no los datos, constituye la variable. Finalmente, cuando se utilizan análisis bayesianos es escogida aquella hipótesis que exhibe la mayor probabilidad dados los datos y su propia probabilidad anterior o *prior* (esto es, la probabilidad que le asignan los científicos a dicha hipótesis antes de ver los datos) (Holder y Lewis, 2003)

Todos los análisis comparativos dependen críticamente de las hipótesis filogenéticas que son generadas, por lo que es particularmente importante seleccionar de manera cuidadosa la hipótesis filogenética en la cual estarán basados los análisis comparativos subsecuentes (Harvey y Pagel, 1991). Por consiguiente, normalmente es empleada aquella filogenia que haya sido obtenida por dos o más de los métodos de reconstrucción filogenética mencionados en el párrafo anterior, pues se asume que dado que éstos se basan en supuestos diferentes, la filogenia en la que convergen está sólidamente respaldada por los datos biológicos.

Una vez que se cuenta con la filogenia, es posible evaluar el grado de influencia que tienen las relaciones de parentesco entre las especies sobre los valores de los caracteres exhibidos por las mismas. Para ello existen varios procedimientos, pero dos de los más utilizados son el método de contrastes independientes de Felsenstein (Ackerly, 1999) o la aproximación de mínimos cuadrados generalizados filogenéticos, de Martins y Hansen (Olson y Rosell, 2006), que permite estimar la disminución experimentada por la similitud entre caracteres dada la distancia filogenética de las especies que los exhiben.

Una vez contándose con una hipótesis filogenética, la adaptación puede ser inferida empleando estudios direccionales (que son aquellos que comparan los caracteres de los ancestros con los de sus descendientes) o métodos no direccionales (en los que son comparados los estados de carácter entre especies sin considerar explícitamente los estados de carácter exhibidos por los ancestros de las mismas) (Harvey y Pagel, 1991).

Para realizar investigaciones direccionales es indispensable especificar los estados de carácter que presumiblemente exhibieron los ancestros hipotéticos situados en cada nodo de la hipótesis filogenética. Si nodos consecutivos de dicha hipótesis comparten el mismo estado de carácter, se asume que no ocurrió ningún cambio en dicho carácter a lo largo de la línea que vincula a los nodos. De manera contraria, si nodos consecutivos tienen diferentes estados de carácter, se concluye que un cambio evolutivo ocurrió a lo largo de esa rama (Harvey y Pagel, 1991). En lo referente a los métodos de reconstrucción de estados ancestrales, uno de los más comúnmente utilizados es el método de máxima verosimilitud de Felsenstein, puesto que éste estima la probabilidad de cada uno de los posibles estados de carácter en cada uno de los nodos (Olson, 2007).

Los métodos direccionales permiten evaluar si un cierto carácter que confiere una ventaja adaptativa para los organismos en la actualidad es una adaptación (esto es, si su fijación dentro de las poblaciones fue producto de la selección natural porque en las condiciones en las que surgió incrementaba la adecuación de sus portadores) o si se trata de una exaptación (es decir, una característica que en la actualidad incrementa la adecuación de los individuos, pero que no lo hacía en el momento de su surgimiento) (Gould y Vrba, 1982). Sin embargo, para ser capaz de discriminar entre una opción o la otra es necesaria la reconstrucción precisa del régimen selectivo en el que vivieron las especies ancestrales hipotéticas, lo cual constituye una tarea llena de dificultades (Hansen, 1997).

Aunque muy frecuentemente se asocia al método comparativo fundamentalmente con los análisis direccionales, existe un gran número de investigaciones comparativas que son llevadas a cabo con especies actuales que ni siquiera tienen que estar cercanamente emparentadas (*e.g.* Hedenström, 2008; Berman y Wang, 2007; Hedenström, 2008; Milo, 2009; Olson *et al.*, 2009). Las cualidades de esta clase de análisis serán mencionadas en el próximo apartado, aunque algunas de las investigaciones citadas tengan el defecto de no haber considerado de manera explícita las relaciones filogenéticas (*e.g.* Hedenström, 2008; Berman y Wang, 2007; Milo, 2009)

2.3 ¿Por qué es necesaria la utilización del método comparativo?

La utilidad de las hipótesis filogenéticas es evidente en el caso de los estudios comparativos direccionales, pero no resulta tan obvia en el caso de aquellas investigaciones comparativas no direccionales. Lo que las hipótesis filogenéticas robustas permiten distinguir son orígenes evolutivos independientes de los caracteres de casos en los que éstos son atribuibles a la semejanza entre especies debido a su cercana relación filogenética (Harvey y Pagel, 1991). Dadas las relaciones de parentesco entre las especies (una de cuyas consecuencias es que las más cercanamente emparentadas tienden a parecerse más entre sí que a otras especies más distantemente relacionadas), éstas pueden no representar conjuntos de datos estadísticamente independientes, que son aquellos para los cuales la estadística convencional fue desarrollada. Consecuentemente, si uno empleara métodos estadísticos convencionales (paramétricos o no paramétricos), para analizar datos sin tomar en cuenta las relaciones filogenéticas entre las especies, los grados de libertad serían sobreestimados y los niveles de significancia comúnmente utilizados en los análisis estadísticos no serían dignos de confianza. A menos que las especies comparadas hayan divergido del mismo ancestro común más o menos simultáneamente, los fenotipos de las mismas probablemente no son estadísticamente independientes (Garland *et al.*, 1993), particularmente en el caso de las especies estrechamente relacionadas, puesto que una vez que la especiación ha ocurrido, tiene que transcurrir un cierto tiempo para que las nuevas especies diverjan morfológicamente, ya sea por deriva génica o en respuesta a la selección natural (Harvey y Pagel, 1991). Una de las consecuencias de la sobreestimación de los grados de libertad es el incremento en la probabilidad de cometer errores de Tipo I (esto es, de rechazar hipótesis nulas cuando éstas son verdaderas), un menor poder para detectar relaciones significativas y estimaciones ineficientes de los parámetros evolutivos (Garland *et al.*, 1993).

Esto fue ejemplificado por Garland *et al.* (1993), quienes realizaron un análisis estadístico para comparar las dimensiones de los ámbitos hogareños de 19 especies de carnívoros y 30 especies de ungulados. La teoría ecológica tradicional predice que los carnívoros deben tener ámbitos hogareños mucho más extensos que los de los herbívoros de tamaños comparables. Sorprendentemente, cuando estos autores emplearon métodos estadísticos filogenéticos encontraron que los carnívoros no tenían ámbitos hogareños significativamente más extensos que los de los herbívoros de tamaños comparables. Sin embargo, cuando estos autores no contemplaron en el análisis estadístico el hecho de que

las especies de carnívoros y las de ungulados no constituyen datos independientes, sino dos conjuntos de datos cuyos componentes están correlacionados por razones genealógicas, llegaron a la conclusión predicha por la teoría ecológica.

Otro caso que ejemplifica que el ignorar las relaciones filogenéticas entre las especies conduce a un incremento en la probabilidad de cometer un error de Tipo I es mencionado por Ackerly (1999), quien reanalizó junto con Reich una base de datos previamente analizada sin tener en consideración la información filogenética. Dicha base contenía datos sobre la longevidad de las hojas y el tamaño de las mismas en 100 especies de plantas con semilla (*i.e.* gimnospermas y angiospermas). Cuando dicha base fue analizada nuevamente utilizando contrastes independientes, fue encontrado que no existía una correlación significativa entre estas dos características ni dentro de las angiospermas ni dentro de las gimnospermas.

Lo mencionado en los párrafos precedentes alude a las consecuencias estadísticas derivadas de no tomar en consideración las relaciones filogenéticas entre las especies. Sin embargo, esta es sólo una de las razones por las cuales es deseable la utilización del método comparativo. Si por un momento se considera que el método comparativo consiste, simplemente, en la realización de comparaciones interespecíficas (tal como fue mencionado en el apartado 2.1) con la debida corrección estadística, será posible arrojar luz sobre las ventajas que presenta, las cuales serán mencionadas a continuación.

La primera de ellas es que permite separar los efectos que tienen sobre las variables fenotípicas de interés variables confusoras distintas de aquellas en las que el investigador está interesado. Aunque la vulnerabilidad del método comparativo a las variables confusoras es una de las mayores críticas que varios autores han hecho al mismo, parece que éste no es más vulnerable al efecto de tales variables que otros métodos para abordar la adaptación. Por el contrario, podría argumentarse que el método comparativo permite reconocer el efecto de las variables confusoras al estudiar la relación entre las mismas variables fenotípicas en un gran número de especies, por lo que los factores aleatorios sobre los cuales los investigadores carecen de control serían ponderados de manera que su efecto fuera casi nulo (Hansen, 1997).

La segunda ventaja que tiene el método comparativo es que permite identificar las diferentes soluciones “óptimas” o “más adecuadas” con las que distintas especies reaccionan a diferentes condiciones ambientales. En vista de que estas soluciones pueden variar incluso dentro de la misma especie en respuesta a diferencias en la disponibilidad de ciertos recursos (Barnes y Partridge, 2003), no hay ninguna razón para

suponer que las mismas soluciones “óptimas” o “más adecuadas” sean exhibidas por diferentes especies ni siquiera en ambientes relativamente semejantes. Adicionalmente, hay que recordar que la selección natural no sólo modifica el carácter o la conducta que está siendo analizada, sino el conjunto completo de caracteres que influyen sobre la adecuación (Alexander, 2001), de manera que la optimización de las variables bajo análisis podría tener efectos muy divergentes sobre el resto de los caracteres en función de la especie que se esté estudiando. Las diferentes respuestas fenotípicas acarreadas por la optimización de ciertas variables en diferentes especies sólo pueden ser evaluadas adecuadamente usando el método comparativo.

Finalmente, y teniendo en consideración que la mayoría de las especies ocupa una porción reducida del espacio disponible de ambientes y una porción reducida también del morfoespacio real, hay que destacar que la utilización de comparaciones interespecíficas permite examinar una variedad comparativamente mayor de caracteres ecofisiológicos, de distintas historias de vida y de distintas condiciones ambientales y climáticas de las que podrían ser examinadas si utilizáramos comparaciones limitadas a una sola especie. Si el análisis simultáneo de las diferencias entre las especies, que revela patrones de divergencia evolutiva, es complementado con análisis detallados a nivel poblacional o intraespecífico, podría incluso ser posible determinar si los mecanismos funcionales observados a nivel poblacional e individual son reproducidos por divergencias evolutivas bajo condiciones ecológicas contrastantes (Ackerly, 1999).

2.4 Algunos ejemplos de corroboración de inferencias adaptativas usando el método comparativo

En este apartado se describirán brevemente algunas inferencias adaptativas para cuya corroboración resultó esencial la utilización de datos provenientes de diferentes especies. Sólo dos de las investigaciones (*i.e.* Roper *et al.* 2008 y Olson *et al.* 2009) consideraron de manera explícita las relaciones filogenéticas de las especies comparadas, a pesar de lo cual todas ellas produjeron resultados relevantes que deberían ser reevaluados considerando las relaciones filogenéticas de los *taxa* implicados. Sin embargo, posiblemente en dos de ellas (*i.e.* Hedenström 2008 y Milo 2009) la reevaluación de los datos no modificaría radicalmente las conclusiones **generales** de los autores. Las especies utilizadas por Milo (2009) y, aunque más cercanamente emparentadas, también por Hedenström (2008), parecen lo suficientemente distantes

filogenética y fenotípicamente como para que la consideración expresa de sus relaciones filogenéticas modifique las conclusiones **generales** obtenidas por estos autores (aunque quizás sí alteraría de manera significativa los resultados particulares obtenidos por Hedenström).

2.4.1 Inferencia adaptativa relacionada con caracteres de las historias de vida

La edad a la que ocurre el primer evento reproductivo es uno de los caracteres fundamentales de todas las historias de vida que han sido planteadas utilizando análisis de optimalidad. Con la ayuda de esta aproximación han sido generados tres modelos básicos. El primero considera la existencia de dos disyuntivas: una relación positiva entre la edad en la que se alcanza la madurez y la sobrevivencia de la progenie y otra relación positiva entre la edad en la que se alcanza la madurez y la fecundidad. El segundo modelo se concentra en las relaciones existentes entre la edad a la que ocurre el primer evento reproductivo, el crecimiento y la fecundidad. En el tercer modelo fueron conjuntadas todas las consideraciones planteadas en los dos anteriores. De acuerdo con este modelo sintético, debería observarse una correlación positiva entre la edad a la que ocurre el primer evento reproductivo y la sobrevivencia del adulto. Cuando esta predicción fue sometida a prueba, se encontró que era correcta en numerosos grupos vertebrados sin que importara el tamaño corporal de los mismos (Ferrière y Clobert, 1992).

2.4.2 Inferencia adaptativa relacionada la estrategia óptima de migración en aves

Hedenström (2008) realizó una revisión de varios modelos de optimización de la migración en las aves. Estos modelos consideraban como criterios de optimización la minimización del tiempo de migración, el incremento en la velocidad de la misma, la disminución en la energía requerida para llevarla a cabo, la disminución del riesgo de mortalidad o la disminución del riesgo de depredación. Paralelamente, este autor revisó datos empíricos provenientes de 13 especies de aves, habiendo encontrado que el criterio de optimización más relevante en todas ellas parecía ser la minimización del tiempo de migración. Como se mencionó previamente, Hedenström no consideró de manera explícita las relaciones filogenéticas entre las especies estudiadas, pero éstas exhiben una distancia filogenética tal y características tan divergentes (pues tomó en consideración datos procedentes de aves marinas, de aves rapaces y de otras aves terrestres con hábitos alimenticios y patrones de vuelo muy distintos), que resulta probable que la disminución

de la duración de la migración sea, de hecho, una característica de relevancia adaptativa en todos estos grupos y no un artefacto estadístico.

2.4.3 Inferencia adaptativa sobre la proporción de sexos en las avispas de los higos

Herre *et al.* (en Haufe, 2008) investigaron las modificaciones en la proporción de sexos provocadas por diferentes factores selectivos en 15 especies de avispas de los higos. Posteriormente, compararon las proporciones observadas con aquellas predichas por la teoría de competencia intraespecífica local (LMC por sus siglas en inglés). De acuerdo con dicha teoría, debía ser observado que la disminución en el número de hembras ovipositoras por fruto estaba asociada con un incremento en la proporción de hembras en la progenie. Adicionalmente, para un número dado de hembras ovipositoras, una mayor endogamia estaría asociada con un incremento en la proporción de hembras en la progenie. Los resultados encontrados por estos autores fueron que existía una coincidencia cualitativa y, en algunos casos, cuantitativa, entre las predicciones teóricas y la respuesta observada en la proporción de sexos en la progenie (Haufe, 2008).

2.4.4 Inferencia adaptativa relacionada con caracteres funcionales en las plantas

A pesar de la gran variación fenotípica exhibida por los árboles en lo referente al tamaño de las hojas y a los patrones de ramificación, el análisis de la covariación de estas características en un gran número de especies ha hecho emerger un patrón conocido como las Reglas de Corner, que fue uno de los primeros patrones globales ampliamente documentados en plantas (Olson *et al.*, 2009). La primera de estas reglas explica que los individuos con hojas grandes presentan ramas gruesas, mientras que los individuos con hojas pequeñas exhiben ramas delgadas. La segunda regla explica que los árboles con ramas gruesas se ramifican escasamente, mientras que los árboles con ramas delgadas se ramifican intrincadamente (Westoby y Wright, 2003).

Olson *et al.* (2009) midieron la relación entre el área de la copa de los árboles y el diámetro de los tallos, así como entre el área foliar sostenida por las ramas y el diámetro de las mismas, en 11 especies pertenecientes a clados muy distantes filogenéticamente y en individuos que crecían en ambientes distintos y que exhibían tamaños de hojas y atributos biomecánicos de los tallos que diferían por varios ordenes de magnitud. Estos autores encontraron que la relación entre estas dos variables (diámetro de los tallos y

superficie fotosintética y de intercambio de gases sostenida por éstos) era similar sin importar la especie, el ambiente o el nivel de ramificación en el que eran hechas las mediciones. Al conjuntar estas observaciones con las Reglas de Corner, hipotetizaron que la relación alométrica entre estas dos variables, que se mantuvo prácticamente inalterada a pesar de la distancia filogenética entre las especies, de las diferencias ambientales y del nivel de ramificación, era probablemente un carácter adaptativo que reflejaba el imperativo metabólico generalizado de producir cantidades similares de fotosintatos por unidad de área de la copa sin importar los desafíos ambientales o las particularidades ontogenéticas propias de cada especie. Para lo anterior, resulta necesario tener una arquitectura tal que minimice las distancias de transporte y maximice las superficies de intercambio de gases y de captación de luz, lo cual explicaría las observaciones descritas por las Reglas de Corner.

La investigación de Olson *et al.* (2009) es particularmente interesante porque destaca las virtudes del método comparativo. En primer lugar, el haber utilizado especies que fueran tan distantes filogenéticamente permitió, por un lado, contar con valores enormemente variables de los atributos biológicos de interés; también posibilitó descartar la hipótesis de que la constancia en la relación alométrica observada hubiera sido consecuencia de restricciones ontogenéticas heredadas de un ancestro común próximo (cf. Gould y Lewontin, 1979), puesto que algunas de las especies utilizadas en esta investigación divergieron hace alrededor de 100 millones de años. Finalmente, la inclusión de diferentes especies permitió someter a prueba la existencia de esta relación alométrica en condiciones ecológicas contrastantes, habiendo encontrado que ésta se mantiene y, por consiguiente, habiendo reforzado la idea de que resulta esencial para el funcionamiento de las plantas.

2.4.5 Inferencia adaptativa relacionada con el dimorfismo sexual en los primates

En los setentas no era claro para muchos primatólogos si el dimorfismo sexual en la masa corporal entre los monos y los simios era el resultado de la selección de diferentes nichos alimentarios entre los sexos o era producto de la selección sexual. Si la selección sexual fuera la causante de las diferencias en el tamaño entre los machos y las hembras, el dimorfismo sexual debería ser más pronunciado en las especies poligínicas, puesto que la poliginia favorece tamaños corporales masculinos más grandes que permiten que

los machos de mayor tamaño derrotan a los de tallas más pequeñas durante las peleas. Si la diferenciación de los nichos alimentarios fuera la causa de las diferencias en tamaño entre los machos y las hembras, las máximas divergencias en tamaño entre uno y otro sexo deberían ser encontradas en las especies monógamas. Con el paso de los años y la adquisición de datos provenientes de un número cada vez mayor de especies, se encontró que la hipótesis de la selección sexual era la correcta no sólo en el caso de los primates, sino también en el de otros órdenes de mamíferos, así como en el de algunos reptiles y anfibios (Harvey y Pagel, 1991). Tal como en los casos de Hedenström (2008) y de Milo (2009), la amplia variedad de taxa muestreados en esta investigación (que pertenecen a varios órdenes de vertebrados) permite suponer que si los datos fueran reanalizados considerando explícitamente el efecto de las relaciones filogenéticas, la conclusión **general** no se modificaría (Harvey y Pagel, 1991)

2.4.6 Inferencia adaptativa relacionada con la eficiencia fotosintética

Como es bien sabido, la energía solar cosechada a través de la fotosíntesis es la principal fuente de energía para la vida en la Tierra. Las plantas, las algas verdes y las cianobacterias, que son los organismos que fundamentalmente realizan la fotosíntesis, poseen centros de reacción que utilizan longitudes de onda ubicadas entre los 680 y los 700 nm. Milo (2009) realizó una investigación tratando de saber por qué es precisamente en este intervalo, y no en algún otro, en el que operan los fotosistemas de prácticamente todos los organismos fotosintéticos existentes en la Tierra. Este autor analizó la eficiencia de la conversión de luz en energía química en este intervalo comparándola con aquella modelada para otras longitudes de onda y evaluando el costo asociado con la separación de cargas en esas condiciones. Este investigador encontró que, cuando se considera el costo de separación de cargas empírico, el rango comprendido entre los 680 y los 720 nm es aquel que maximiza la eficiencia de la conversión de la energía lumínica en energía química. Lo anterior sugiere que la estructura de los fotosistemas I y II fue optimizada en algún punto de su evolución de manera que fueran capaces de sacar el máximo provecho del espectro de luz emitido por el Sol. El caso de esta investigación, en la que no se consideró el efecto de las relaciones filogenéticas sobre los atributos estimados, fue discutido al principio de esta sección y en el párrafo anterior.

2.4.7 Inferencia adaptativa relacionada con la eficiencia en la dispersión de esporas en los hongos

Los hongos ascomicetos lanzan sus esporas a algunos milímetros del cuerpo fructífero de tal manera que éstas alcancen corrientes de aire que permitan su dispersión. Las esporas son tan pequeñas que resultan fácilmente arrastradas por los fluidos. Esto puede favorecer su transporte, pero también puede desacelerarlas rápidamente tras haber sido expulsadas del cuerpo fructífero, haciendo que caigan en las proximidades del individuo que las produjo. Por esa razón, Roper *et al.* (2008) hipotetizaron que las formas de las esporas deben maximizar su desplazamiento de manera que abandonen el aire que está inmóvil alrededor de los cuerpos fructíferos. Para someter a prueba dicha hipótesis, calcularon numéricamente las formas óptimas de las esporas (*i.e.* aquellas con el menor arrastre dados sus volúmenes) y compararon estas formas óptimas con aquellas exhibidas por más de 100 especies de hongos. Estos autores encontraron que gran parte de las esporas tenía un desempeño biomecánico muy próximo al que ellos estimaron que tendrían las esporas “óptimas” para ese fin, lo que fue congruente con la hipótesis de que las formas de estas estructuras han sido seleccionadas de manera que minimizan el arrastre al que se ven expuestas y les permiten ser dispersadas con mayor eficacia.

3. Potenciales aportes del método comparativo para la formulación y corroboración de hipótesis adaptativas en la anatomía ecológica de maderas

A pesar de constituir un área de la Biología relativamente antigua, la anatomía ecológica de la madera ha empleado tradicionalmente análisis estadísticos estándar que no consideran la influencia que podrían tener las relaciones filogenéticas sobre los caracteres que evalúan y que tampoco consideran las asociaciones o las carencias de éstas en un gran número de especies y no sólo en unas cuantas. El primero de estos dos aspectos (la desestimación de las relaciones filogenéticas en los análisis estadísticos o, peor aún, en la interpretación de los datos) es lamentable porque muchas asociaciones entre caracteres anatómicos, o entre dichos caracteres y el ambiente, están restringidos a ciertos grupos taxonómicos o linajes. Es poco probable que estas semejanzas entre parientes cercanos representen eventos evolutivamente independientes, habiendo sido

probablemente heredados de un ancestro común. Por consiguiente, las especies que exhiban esta asociación no deben ser consideradas observaciones independientes. El segundo de los aspectos mencionados en el primer párrafo de esta sección (*i.e.* la ausencia de una búsqueda de asociaciones entre caracteres, o de su carencia, en un gran número de *taxa*) resulta lamentable porque contar con tal información brindaría alguna idea de las posibles rutas por las que podría transcurrir el cambio fenotípico en ciertos linajes. Así, por ejemplo, la falta de relación entre dos o más atributos indicaría que estos pueden responder independientemente a la selección, mientras que la asociación entre ellos apuntaría en sentido contrario (Rosell *et al.*, 2007).

En las pocas ocasiones en las que el método comparativo (entendido éste como la búsqueda reiterada y el análisis de correlaciones entre características anatómicas o entre éstas y las condiciones ambientales en un gran número de especies) ha sido aplicado en la anatomía ecológica de maderas, ha permitido identificar atributos que por su persistencia y su relación con ciertas condiciones climáticas pueden ser considerados adaptaciones. Tal es el caso, por ejemplo, de la presencia de grandes agrupaciones de vasos acompañados de traqueidas vasicéntricas (células conductoras que brindan rutas transportadoras de agua más lentas, aunque más seguras, que las de los vasos a los que acompañan). Ambas características han surgido independientemente en varios linajes y están tan fuertemente asociadas entre sí, presentándose además con tanta frecuencia en las plantas esclerófilas de zonas secas, que probablemente constituyan adaptaciones a este tipo de condiciones ambientales. En condiciones más húmedas, por el contrario, han sido encontrado una y otra vez un bajo agrupamiento de vasos, la carencia de traqueidas vasicéntricas y de ornamentaciones helicoidales en la pared de los vasos y la ausencia de anillos de crecimiento (Carlquist, 1988).

Otra de las observaciones más recurrentes en los tallos de las plantas es la existencia, tanto dentro como entre especies, de una relación negativa entre el diámetro de los vasos del xilema secundario y el número de vasos por unidad de área transversal en el xilema. Esta asociación ha sido interpretada como una disyuntiva adaptativa entre la conducción rápida u óptima de agua que caracteriza a los vasos anchos y la resistencia al embolismo (fenómeno que puede producir severos daños –Tyree y Zimmermann, 2002) que caracteriza a los vasos más delgados (Rosell *et al.*, 2007).

El método comparativo permite, por otro lado, detectar combinaciones inusuales o poco frecuentes de caracteres. Si se conocen las relaciones filogenéticas o los linajes a los que pertenecen las especies que presentan tales combinaciones, éstas pueden ser

interpretadas a la luz de lo que se sabe de la historia natural de tales clados. Así, por ejemplo, se tiene el caso de *Philadelphus microphyllus*, que es la única especie del sur de California de entre las muchas inspeccionadas por Carlquist y Hoekman que exhibe verdaderas traqueidas (células conductoras con gran número de punteaduras) y ornamentaciones helicoidales en los vasos. El clado al que pertenece esta especie proviene de ambientes menos áridos que el desierto del sur de California (Rosell *et al.*, 2007), lo que parecería dar sentido a esa mezcla de caracteres que parece una transición entre aquellos encontrados en clados de climas más húmedos (aunque no necesariamente tengan relevancia adaptativa) y aquellos encontrados en ciertos clados de climas secos (como las ornamentaciones en los vasos).

4. Complementareidad de los modelos de optimalidad y del método comparativo

En esta sección serán analizados brevemente las cualidades y los defectos del método comparativo, tras lo cual se mencionará brevemente la manera en la que éste y la inferencia de adaptaciones por medio de modelos de optimalidad se complementan.

Quizás dos de las mayores cualidades del método comparativo es que permite demostrar la generalidad de las características adaptativas y posibilita el acceso o la inspección de áreas del morfoespacio mucho más amplias (esto es, con un mayor rango de valores e, incluso, con valores atípicos o insospechados de las variables fenotípicas de interés) que los análisis intraespecíficos o los análisis circunscritos a pocas especies (Olson y Arroyo, 2015). Adicionalmente, entre mayor sean el número de especies analizado y su diversidad morfológica, presumiblemente estaremos observando también las respuestas de los sistemas biológicos a un mayor espectro de condiciones climáticas y ecológicas. También hay que destacar que la detección de correlaciones entre ciertas características fenotípicas y ciertas condiciones ambientales, particularmente en especies distantemente relacionadas, constituye una de las observaciones que más fuertemente indican que tales características constituyen una adaptación. Sin embargo, no hay que olvidar que el método comparativo está basado en la detección de correlaciones y que una correlación no es sinónimo de causalidad, por lo que el conocimiento íntimo de la biología de las especies es necesario para demostrar que un carácter es, de hecho, de relevancia funcional. Por lo tanto, sin la acumulación de datos a niveles inferiores de la

jerarquía biológica, este método no es capaz de someter a prueba o de exhibir los detalles finos que son los objetos de estudio de los modelos de optimalidad y que sólo son aclarados recurriendo a ellos. Otra desventaja del método comparativo es que, si bien permite sugerir escenarios adaptativos, no puede distinguir las causas de los efectos, como sí lo pueden hacer los experimentos de selección artificial o de evolución intraespecíficos controlados, que además pueden ser diseñados de tal manera que sólo una variable (la variable de prueba) difiera entre los varios tratamientos (Olson y Arroyo, 2015). En el caso del método comparativo, en cambio, es probable que muchas variables no controladas difieran entre los taxa además de la variable de interés (Harvey y Pagel, 1991). Es evidente, entonces, que un análisis comparativo no debe ser desarrollado sin que sea complementado por otro tipo de aproximaciones o sin que sea apoyado por una hipótesis explícita acerca de la base funcional de la presunta adaptación detectada (Hansen, 1997).

Por otro lado, una de las desventajas de los modelos de optimalidad que de alguna manera puede ser subsanada con la ayuda del método comparativo es que el hecho de que los miembros de una especie tengan un carácter al que ha sido encontrada una función particular no necesariamente implica que el mismo carácter sirva a la misma función en otros taxones (Olson y Arroyo, 2015). El grado de generalidad del uso de ese atributo sólo puede ser evaluado mediante el método comparativo. Los modelos de optimalidad deben ser probados empíricamente, y entre mayor sea el número de especies en los que tales pruebas son hechas, más fuertes o robustas serán las conclusiones de las mismas. Estas pruebas de modelos de optimalidad han hecho uso de comparaciones interespecíficas aún cuando no hayan tomado explícitamente en cuenta la filogenia (*e.g.* Alerstam y Hedenström, 1998; Milo, 2009; Roper *et al.*, 2008).

En resumen, la aproximación comparativa complementa otras aproximaciones destinadas a explicar la evolución, tales como la teoría de la optimalidad, los modelos de genética de poblaciones y la experimentación (Harvey y Pagel, 1991; Olson y Arroyo, 2015).

LITERATURA CITADA

Ackerly D.D. 1999. Comparative plant ecology and the role of phylogenetic information. In *Physiological Plant Ecology*. M. C. Press, J. D. Scholes y M. G. Barker eds. Blackwell Science Ltd. Londres, Reino Unido. pág. 391-415

Aigner P. A. 2001. Optimality modeling and fitness trade-offs: when should plants become pollinator specialists? *OIKOS* **95** (1):177-184

- Alerstam T. y A. Hedenström. 1998. The development of bird migration theory. *JOURNAL OF AVIAN BIOLOGY* **29**: 343-369
- Alexander R. McN. 2001. Design by numbers. *NATURE* **412**: 591
- Anten N. P. R.. 2002. Evolutionarily Stable Leaf Area Production in Plant Populations. *Journal of Theoretical Biology* **217**: 15-32
- Balázs P., B. Teusink y R. A. Notebaart. 2009. A critical view of metabolic network adaptations. *HFSP Journal* **3** (1): 24-35
- Barnes A. I y L. Partridge. 2003. Costing reproduction. *Animal Behaviour*. **66**: 199-204
- Belanger J.H. 2005. Contrasting Tactics in Motor Control by Vertebrates and Arthropods. *Integrative and Comparative Biology* **45** (4): 672-678
- Berman G. J. y Z. J. Wang. 2007. Energy-minimizing kinematics in hovering insect flight. *Journal of Fluid Mechanics* **582**:153-168
- Berninger F. y P. Hari. 1993. Optimal Regulation of Gas Exchange: Evidence from Field Data. *Annals of Botany* **71**: 135-140
- Bonner, J. T. 2006. *WHY SIZE MATTERS. FROM BACTERIA TO BLUE WHALES*. Princeton University Press. Princeton, New Jersey. 161 pág.
- Boonman A., N. P. R. Anten, T. A. Dueck, W. J. R. M. Jordi, A. van der Wef, L. A. C. J. Voeseek y T. L. Pons. 2006. Functional Significance of Shade-Induced Leaf Senescence in Dense Canopies. An Experimental Test Using Transgenic Tobacco. *THE AMERICAN NATURALIST* **168** (5): 597-607
- Bownds C., R. Wilson y D. J. Marshall. 2010. Why do colder mothers produce larger eggs? An optimality approach. *The Journal of Experimental Biology* **213**: 3796-3801
- Bull J.J. y I. N. Wang. 2010. Optimality models in the age of experimental evolution and genomics. *JOURNAL OF Evolutionary Biology* **23**: 1820-1838
- Charnov E. L. 1997. Trade-off-invariant rules for evolutionarily stable life histories. *NATURE* **387**: 393-394
- Enquist M., A. Arak, S. Ghirlanda y C. A. Wachtmeister. 2002. Spectacular Phenomena and Limits to Rationality in Genetic and Cultural Evolution. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* **357** (1427):1585-1594
- Farnsworth K. D. y K. J. Niklas. 1995. Theories of Optimization, Form and Function in Branching Architecture in Plants. *Functional Ecology* **9** (3): 355-363
- Ferrière R. y J. Clobert. 1992. Evolutionarily Stable Age at First Reproduction in a Density-dependent Model. *Journal of Theoretical Biology* **157**: 253-267
- Garland T., A.W. Dickerman, C. M. Janis y J. A. Jones. 1993. PHYLOGENETIC ANALYSIS OF COVARIANCE BY COMPUTER SIMULATION. *Systematic Biology* **42** (3): 265-292
- Graham A. L. 2001 Use of an optimality model to solve the immunological puzzle of concomitant infections. *Parasitology* **122**: S61-S64
- Goetz, S.J. y S.D. Prince. 1999. Modelling Terrestrial Carbon Exchange and Storage: Evidence and Implications of Functional Convergence in Light-use Efficiency. In *ADVANCES IN ECOLOGICAL RESEARCH Volumen 28*. A. H. Fitter y D. Raffaelli eds. ACADEMIC PRESS. Londres, Reino Unido. pág. 57-92
- Gould S.J. y E.S. Vrba. 1982. Exaptation: a missing term in the science of form. *Paleobiology* **8**: 4-15
- Hansen T. F. 1997. Stabilizing Selection and the Comparative Analysis of Adaptation. *Evolution* **51** (5): 1341-1351
- Harvey P. H. y M. D. Pagel. 1991. *The Comparative Method in Evolutionary Biology*. Oxford University Press. Nueva York, Estados Unidos. 239 pág.
- Haufe C. 2008. Sexual selection and mate choice in evolutionary psychology. *Biology and Philosophy* **23**: 115-128
- Hedenström A. 2008. Adaptations to migration in birds: behavioural strategies, morphology and scaling effects. *Philosophical Transactions of the Royal Society* **363**: 287-299
- Hedenström A.. 2009. Optimal Migration Strategies in Bats. *Journal of Mammalogy* **90** (6):1298-1309

- Ho M.D., B. C. McCannon y J. P. Lynch. 2004. Optimization modeling of plant root architecture for water and phosphorus acquisition. *Journal of Theoretical Biology* **226**: 331–340
- Holder M. y P. O. Lewis. 2003. PHYLOGENY ESTIMATION: TRADITIONAL AND BAYESIAN APPROACHES. *NATURE REVIEWS | GENETICS* **4**: 275-284
- Holland Jones J. 2011. Primates and the Evolution of Long, Slow Life Histories. *Current Biology* **21**: R708–R717
- Houston A. I. 2011. Assessing models of optimal diving. *Trends in Ecology and Evolution* **26** (6): 292-297
- Kiflawi M. 2000. Adaptive gamete allocation when fertilization is external and sperm competition is absent: Optimization models and evaluation using coral reef fish. *Evolutionary Ecology Research* **2**: 1045–1066
- Magnani F., M. Mencuccini y J. Grace. 2000. Age-related decline in stand productivity: the role of structural acclimation under hydraulic constraints. *Plant, Cell and Environment* **23**: 251–263
- Marks C. O. y M. J. Lechowicz. 2006. Alternative Designs and the Evolution of Functional Diversity. *THE AMERICAN NATURALIST* **167** (1): 55-66
- Martins E. P. y T. Garland, Jr. 1991. Phylogenetic Analyses of the Correlated Evolution of Continuous Characters: A Simulation Study. *Evolution* **45** (3): 534-557
- Maurer E. F. y A. Sih. 1998. Ephemeral habitats and variation in behavior and life history: comparisons of sibling salamander species. *OIKOS* **76**: 337-349
- Mayhew P.J. 1997. Adaptive patterns of host-plant selection by phytophagous insects. *OIKOS* **79**: 417-428
- Mayhew P. J. 2001. Herbivore host choice and optimal bad motherhood TRENDS in Ecology & Evolution **16** (4): 165-167
- Milo R. 2009. What governs the reaction center excitation wavelength of photosystems I and II? *Photosynthesis Research* **101**:59–67
- Morrone, J.J. 2000. EL LENGUAJE DE LA CLADÍSTICA. Dirección General de Publicaciones y Fomento Editorial. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 109 pág.
- Olson M. E. 2007. Wood ontogeny as a model for studying heterochrony, with an example of pedomorphosis in *Moringa* (Moringaceae). *Systematics and Biodiversity* **5** (2): 145-158
- Olson M. E., R. Aguirre-Hernández y J. A. Rosell. 2009. Universal foliage-stem scaling across environments and species in dicot trees: plasticity, biomechanics and Corner's Rules. *Ecology Letters* **12**: 210–219
- Olson M. E. y J. A. Rosell. 2006. USING HETEROCHRONY TO DETECT MODULARITY IN THE EVOLUTION OF STEM DIVERSITY IN THE PLANT FAMILY MORINGACEAE. *Evolution* **60** (4): 724–734.
- Olson, M. E., and A. Arroyo-Santos. 2015. HOW TO STUDY ADAPTATION (AND WHY TO DO IT THAT WAY). *Quarterly Review of Biology* **90**: 167-191.
- Pearcy, R. W. y F. Valladares. 1999. Resource acquisition by plants: the role of crown architecture. In *Physiological Plant Ecology*. M. C. Press, J. D. Scholes y M. G. Barker eds. Blackwell Science Ltd. Londres, Reino Unido. pág. 45-66
- Parker G. A. y J. Maynard Smith. 1990. Optimality theory in evolutionary biology. *Nature* **348** (6296): 27-33
- Press M. C. 1999. The Functional Significance of Leaf Structure: A Search for Generalizations. *New Phytologist* **143** (1): 213-219
- Read A.F. y J. E. Allen. 2000. The Economics of Immunity. *Science* **290**: 1104-1105
- Roper M., R. E. Pepper, M. P. Brenner y A. Pringle. 2008. Explosively launched spores of ascomycete fungi have drag-minimizing shapes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105** (52): 20583–20588
- Rosell J.A., M. E. Olson, R. Aguirre-Hernández y S. Carlquist. 2007. Logistic regression in comparative wood anatomy: tracheid types, wood anatomical terminology, and new inferences from the Carlquist and Hoekman southern Californian data set. *Botanical Journal of the Linnean Society* **154**: 331–351

Simpson S. J. y D. Raubenheimer. 1993. A Multi-Level Analysis of Feeding Behaviour: The Geometry of Nutritional Decisions. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* **342** (1302): 381-402

Steppan S. J., P.C. Phillips y D. Houle. 2002. Comparative quantitative genetics: evolution of the G matrix. *TRENDS in Ecology & Evolution* 17 (7): 320-327

Tyree M. T. y M. H. Zimmermann. 2002. *Xylem Structure and the Ascent of Sap*. Springer-Verlag, 2a. edición. Berlin, Germany. 283 pág.

Westoby M. e I. J. Wright. 2003. The leaf size – twig size spectrum and its relationship to other important spectra of variation among species. *Oecologia* **135**:621–628