



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

Centro de Investigaciones en Ecosistemas

**HISTORIA EVOLUTIVA DEL COMPLEJO *Caesalpinia hintonii* (Leguminosae: Caesalpinioideae):
FILOGENIA, ESTRUCTURA GENÉTICA Y
AISLAMIENTO REPRODUCTIVO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Jeny Solange Sotuyo Vázquez

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa

MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

A mi padre el Dr. J. G. Sotuyo y Reza quien sé se sentiría orgulloso.

A los dos hombres más importantes en mi vida

Benjamín, *mi hermanito*, por su apoyo continuo,
por obligarme a ser mejor persona,
por las discusiones sobre el país,
la vida, cuántica y astronomía,
por siempre estar ahí.

Javier por su amistad, amor,
por su apoyo incondicional en todo lo que realizo,
por la paciencia cuando le hablo de plantas,
por todo lo que hemos vivido juntos,
por lo que nos falta aún vivir.

Reconocimientos

Primeramente a mi tutor el Dr. Ken Oyama y a los miembros del comité tutorial los Dres., César Domínguez Pérez-Tejada y Gerardo Pérez Ponce de León por su orientación y retroalimentación sobre todo en las etapas iniciales del proyecto.

A todos los miembros del jurado Dra. Gladys Cassab, Dra. Alicia González, Dr. Carlos Montaña y Dr. Mauricio Quesada; en especial a los Dres. Helga Ochoterena y Daniel Piñero.

Mi más sincero y profundo agradecimiento al Profesor Mark W. Chase por haberme aceptado en su grupo de trabajo en el Jodrell, por su jovialidad, todo lo que me ha enseñado y el tiempo y entusiasmo que ha dedicado a este trabajo. Debo reconocer la contribución de los Dres. Alfonso Delgado-Salinas y Gwilym Lewis, mil gracias por su entusiasmo y disponibilidad, por las enriquecedoras discusiones en diversos puntos del proyecto y la vida académica. Por ese arte tan especial de convertir en buenos los puntos malos, por su gran apoyo en ocasiones casi paternal. Por acrecentar mi interés y pasión por las leguminosas. Mi interacción con Alfonso, Gwil y Mark influyó mucho en mi formación.

Al M. en C. Mario Sousa-Sánchez por su gran ayuda en el herbario, por proporcionarme información no publicada sobre selvas bajas y las leguminosas de México. La ayuda de Luca Ferrari con la parte geológica fue crucial para reconstruir el escenario donde el complejo *Caesalpinia hintonii* hizo de las suyas. Así mismo, agradezco a Ricardo Ayala por la determinación de las abejas visitantes del complejo *C. hintonii*.

A la Dra. Lourdes Rico-Arce (Lulú) por proveerme de alojamiento durante mis estancias en Kew, por su amistad, consejos, por su enorme generosidad, por acogerme tan bien y hacerme sentir como en casa en Londres.

Las siguientes personas merecen mi gratitud por su ayuda ya sea recolectando o enviándome muestras, por su ayuda en el laboratorio, los consejos en el análisis de datos y por la ayuda en los trámites del doctorado. Se encuentran listados en orden alfabético: Samuel Aguilar, Donovan Bailey, Jeremy Bruhl, Richard Brummitt, Jim Clarkson, Lazlo Csiba, Omar Chassin, José Luis Contreras-Jiménez, Dion Devey, Jeff Doyle, Carolina Espinosa, Félix Forest, Tim Fulcher, Antonio González-Rodríguez, Stephen Harris, Colin Hughes, José Luis Ibarra, Monserrat Ibarra-González, Matt Lavin, Lola Lledó, Christian Lexer, David Lorence, Rosaura Luna, Olivier Maurin, Laura Márquez, Vivian Munday, Yohan Pillon, Martyn Powell, Mauricio Quesada, Nina Røstend, Jerzy Rzedowski, Sebastian Schuster, Alejandra Serrato-Díaz, Benjamín Sotuyo, Ofir Sotuyo, David Springate, Victor Steinmann, Ian Telford y Michael Van der Banks.

A Gerardo Salazar y Lidia Cabrera, por su amistad, la ayuda y compañía en el Jodrell hasta altas horas de la madrugada o los fines de semana haciendo PCR's, por las discusiones sobre

sistemática y evolución de plantas en casi todo momento y el préstamo de la G5 para los últimos análisis.

A todas las amistades que hice durante estos años en las distintas Instituciones: Dennis Adams†, Lucy Bores, Neil Brummitt, Tania Durt, Martha Esteva, Félix Forest, Ana Juan, Eve Lucas, Laura Márquez, Claire Micheneau, Kazue Matsumoto, Elide Pereira Do Santos, Patricia Soffiatti, Nigel Taylor, Jovita Yesilyurt y Daniela Zappi.

A mis amigos Julio Carrasco, Euler Pedraza-Ortega, Mariana Pérez-Escobar y María Ventura Rosas-Echeverría quienes me apoyaron en todo durante estos años, por hacerme reír tanto, por los ánimos aún en las crisis, por las inolvidables y divertidísimas sobremesas y con quienes he compartido muchos de los mejores momentos en mi vida.

Mi gratitud a las siguientes instituciones y a todo su personal que hicieron posible el desarrollo y la culminación de este proyecto: Centro de Estudios en Ecosistemas (CIEco), UNAM; Instituto de Biología, UNAM y Royal Botanic Gardens, Kew.

Gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por permitirme desarrollarme y aprender en sus instalaciones, por ser mi casa académica.

A mi madre quien en más de una ocasión me apoyó de distintas formas durante las salidas al campo, estancias nacionales y en el extranjero y quien ha tenido que cuidar de todas las plantas de *Caesalpinia* coleccionadas a lo largo de estos años.

Este estudio fue posible gracias a las becas otorgadas por CONACyT (15291811144), beca complementaria UNAM, programa DGEP UNAM y el presupuesto operativo de los laboratorios de Sistemática Molecular (Jodrell-RBG, Kew), Biología Molecular (IBUNAM) y Ecología Genética y Molecular (CIEco, UNAM).

INDICE		
RESUMEN		6
CAPÍTULO I	Introducción general	11
	Conceptos de especie	12
	Especiación	15
	Cambios climáticos y especiación	17
	El efecto de los cambios climáticos en las leguminosas	22
	Relevancia del estudio	27
	Sistema de estudio	29
	Información genética previa	30
	Área de estudio	32
	Valle de Tehuacan-Cuicatlán	32
	Depresión del Río Balsas	33
CAPÍTULO II	Análisis filogenético de las especies mexicanas de Poincianella (<i>Caesalpinia</i>: Caesalpinioideae) usando morfología y secuencias de cuatro regiones plastidio: provando la monofilia del complejo <i>C. hintonii</i>	36
CAPÍTULO III	A new species of <i>Caesalpinia</i> from the Río Balsas Depression, Mexico, and an updated taxonomic circumscription of the <i>Caesalpinia hintonii</i> complex (Leguminosae: Caesalpinioideae: Caesalpinieae: Poincianella Group)	68
CAPÍTULO IV	Cryptic speciation in the <i>Caesalpinia hintonii</i> complex (Leguminosae: Caesalpinioideae) in a seasonally dry Mexican forest	73
CAPÍTULO V	Análisis filogeográfico y fechamiento del complejo <i>Caesalpinia hintonii</i> (Leguminosae: Caesalpinioideae: Poincianella) en México	102
CAPÍTULO VI	Discusiones generales	139
CONCLUSIONES		144
LITERATURA CITADA		146
APÉNDICE I	Especímenes de herbario examinados por especie para el análisis filogenético con caracteres morfológicos	155
APÉNDICE II	Clave taxonómica para el complejo <i>C. hintonii</i>	161
APÉNDICE III	Métodos moleculares	162

Resumen

El complejo *Caesalpinia hintonii* está formado por cinco especies que habitan selvas secas en la Provincia morfotectónica de la Sierra Madre del Sur. Las poblaciones de estas especies se distribuyen en parches a lo largo de la Depresión del Río Balsas y el Valle de Tehuacán Cuicatlán. Todas las especies del complejo forman un grupo monofilético de acuerdo a cuatro regiones no codificadoras de plastidio (intron *trnL*, IGS *trnL-F*, IGS *psbA-trnH* y *accD-psaI*) y morfología; la especie hermana al complejo resultó ser *C. pannosa* de la porción sur de la Península de Baja California. Se describe una nueva especie, *Caesalpinia oyamae* S. Sotuyo y G.P. Lewis (2007) en la porción este del Balsas basándose en marcadores moleculares y morfología. Un estudio filogeográfico fue llevado a cabo en las especies del complejo, exceptuando *C. laxa* que no pudo colectarse, en donde se emplearon las mismas regiones de plastidio. Las cuatro regiones de plastidio mostraron estructuración filogeográfica separando a las especies del complejo en dos linajes, los cuales coinciden geográficamente con las porciones oriental y occidental de la Planicie morfotectónica de la Sierra Madre del Sur. Todas las regiones de plastidio muestran que existe divergencia genética dentro de la nueva especie *C. oyamae* y bajos valores de flujo (0.16-1.35) génico entre sus poblaciones sugiriendo la existencia de especies crípticas dentro de ella. Los mismos análisis muestran que *C. macvaughii* de la porción oeste del Balsas está formada por dos linajes divergentes en los que aún existe flujo génico ($Nm=1.41$). Así mismo, los resultados indican que el complejo se encuentra bajo divergencia y radiación morfoestática debido a adaptaciones locales, pero si la estasis morfológica se debe a selección o a una restricción filogenética que se desconoce. Los resultados obtenidos abren la posibilidad de realizar un mayor número de estudios

filogeográficos dentro de la Depresión del Balsas en busca de patrones filogeográficos comunes dentro de la región.

Entender cómo se originan las especies es un problema fundamental de la biología evolutiva. Generalmente es aceptado que muchas de las especies se han originado mediante divergencia alopátrica. Estos patrones de subdivisión poblacional han sido estudiados desde hace varios años con el empleo de técnicas moleculares, la interpretación de dichos patrones casi siempre adjudica un efecto pasivo a los efectos de la deriva y migración. Sin embargo, con el empleo de marcadores de ADN es ahora posible estudiar esas subdivisiones con mayor detalle y establecer cómo han ocurrido.

Existe un número creciente de ejemplos en donde se atribuye a las barreras geográficas un papel importante en las subdivisiones taxonómicas. De la misma manera, se ha empezado a considerar la existencia de mecanismos activos de separación entre poblaciones, posiblemente ocasionados por variaciones geográficas, adaptaciones locales y aislamiento reproductivo. Recientemente, se ha considerado que los cambios climáticos (e.g., Cuaternario) jugaron un papel importante en muchas de las fragmentaciones geográficas y en los eventos de especiación para distintos grupos taxonómicos. Particularmente en las selvas secas mexicanas como las contenidas en el Balsas, los cambios en el Cuaternario podría ser responsables de la fragmentación de dichas selvas.

Este proyecto inició analizando la variación genética de poblaciones disjuntas de *Caesalpinia hintonii* Sandwith. (Leguminosae: Caesalpinioideae), las cuales fueron propuestas como morfoespecies por Contreras (1991) debido al aislamiento geográfico y la variación morfológica de diversos caracteres florales y vegetativos. Los resultados de ese estudio inicial (Sotuyo 1999; Sotuyo et al. 2004) demostraron que efectivamente esas variantes morfológicas eran distintas y que debido al grado de diferenciación genética y

diferenciación morfológica tal vez se encontraban en una fase temprana de especiación probablemente como producto de adaptaciones locales y separación espacial.

Dada esta diversificación se optó por estudiar a especies cercanas a *C. hintonii* que han sido denominadas como el complejo *Caesalpinia hintonii*. Al complejo lo conforman cinco especies: *C. epifanioi*, *C. hintonii*, *C. laxa*, *C. macvaughii* y *C. melanadenia* (Contreras 1991; Lewis 1998) distribuidas disjuntamente a lo largo de la Depresión del Balsas y Valle de Tehuacán-Cuicatlán. La distribución presentada por el complejo también la comparten otras especies. Los objetivos principales de este proyecto fueron la reconstrucción filogeográfica del complejo *Caesalpinia hintonii* y establecer si dicho complejo podría ser utilizado como un modelo de especiación para otras plantas endémicas de la Depresión del Balsas que tienen una distribución similar.

Para el tratamiento filogeográfico del complejo fue necesario demostrar primeramente la monofilia del grupo de estudio, por lo que se realizó un análisis filogenético de *Poincianella*, el grupo fenético al cual pertenece el complejo y que se reinstauró como género en el 2005 (Lewis et al. 2005). Para la reconstrucción empleamos morfología y marcadores moleculares (Capítulo II). Los resultados indicaron que el complejo contenía una especie más, *Caesalpinia oyamae* (Sotuyo y Lewis 2007). En el Capítulo III se hace la descripción morfológica de la nueva especie y se discute la circunscripción del complejo.

Una vez probada la monofilia del complejo realizamos un análisis genealógico desde la perspectiva filogenética (Capítulo IV) en donde se propone que la divergencia poblacional encontrada en las especies del complejo puede deberse a los cambios climáticos ocurridos durante el Cuaternario así como a la compleja historia geológica de la Planicie Morfotectónica de la Sierra madre del Sur. En el capítulo V se calcula la

diversidad genética de las especies del complejo y se hace una construcción de redes de haplotipos para complementar el análisis filogenético realizado en el capítulo IV. Así mismo, se muestran datos preliminares sobre qué tan antigua fue la separación del complejo *C. hintonii* empleando una filogenia no publicada para *Caesalpinia sensu lato* (S. Sotuyo, M.W. Chase y G.P. Lewis en prep.) generada con dos regiones de plastidio: el espaciador *trnL* y el intron *trnL-F*. Finalmente en el Capítulo VI se discuten los resultados de los capítulos anteriores.

CAPÍTULO I

Introducción general

En la última década se ha incrementado el interés por el estudio de la variación genética y morfológica, pues se piensa que la variación por debajo del nivel específico encierra la clave para entender cómo se forman las especies. El estudio de la especiación se considera como la interfase entre la genética de poblaciones y la reconstrucción filogenética (Barraclough y Nee 2001). Debido a la complejidad del fenómeno en donde se encuentran involucrados un gran número de factores (e.g. genéticos, ecológicos, ambientales) unidos por la escala temporal; los estudios teóricos y experimentales sobre especiación aún son insuficientes (Orr y Smith 1998; Gavrillets 1999).

El empleo de la cladística y las filogenias moleculares han ayudado a reconstruir los procesos evolutivos subyacentes en los patrones de variación geográfica y el significado de la adaptación espacial en condiciones ambientales cambiantes (Malhotra et al. 1996). Al mismo tiempo, el desarrollo de técnicas genético-moleculares y los avances teóricos en genética de poblaciones, especialmente en la teoría de coalescencia, han generado herramientas poderosas para el análisis de datos intraspecíficos (Posada y Crandall 2001).

Las radiaciones evolutivas son ideales para estudiar el proceso de la formación de especies (Danley et al. 2001; Rüber et al. 2003). Análisis paleontológicos y de sistemática molecular sugieren que durante los estadios iniciales de radiación adaptativa ocurren múltiples eventos de cladogénesis y rápida divergencia ecológica y morfológica entre linajes (Foote 1997; Lovette y Bermingham 1999; Schluter 2000; Luke et al. 2003). Si lo anterior es cierto, comparando los eventos entre grupos estrechamente relacionados podemos identificar los factores comunes que influyeron durante el proceso de especiación, y las radiaciones de taxa relativamente jóvenes pueden simplificar la identificación de los factores involucrados dentro de los procesos de especiación (Gavrillets 1999; Kocher 2003).

Conceptos de especie.

Entre los diversos rangos de la escala jerárquica de clasificación, el de especie recibe particular atención considerándose como la unidad biológica básica. El concepto de especie no es fácil, pues conlleva implícita cierta carga filosófica (de Haro 1999). La naturaleza y definición de especie han sido ampliamente discutidas en sistemática (Wiley 1978); a pesar de los múltiples conceptos de especie (alrededor de 30, Hey 2001) no se ha llegado a un acuerdo sobre qué es una especie, cuáles pueden ser los criterios para definirla o si existen límites claramente definidos y definibles para agrupar a los organismos en la categoría de especie. Ereshefsky (1992), Claridge et al. (1997) y Wilson (1999) discuten el concepto de diferentes maneras, haciendo énfasis en diversos atributos de los organismos. Todos ellos, sin embargo, pueden interpretarse como parte del concepto evolutivo de especie (Mayden 1997) o variaciones de un único concepto evolutivo (concepto general de linaje, de Queiroz 1998, 1999).

Este capítulo no pretende hacer un ensayo sobre los distintos conceptos de especie por lo tanto no se hará una revisión exhaustiva de ellos y solo listaremos algunos de los más conocidos. En el cuadro 2.1 resumimos algunos de los criterios de reconocimiento de especies de cuatro conceptos que en cierta forma fueron empleados al trabajar con el complejo *Caesalpinia hintonii*.

Especie tipológica (Linnaeus 1758) es una entidad que se diferencia de otras especies por características constantes. Este concepto ha sido defendido por todos los filósofos que desde Platón hasta la época moderna han considerado las especies como “tipos” o “clases naturales”. No aplicable a evolución convergente y a especies con variación intraespecífica (variación fenotípica por edad, sexo, gradiente ambiental, etcétera). **Especie morfológica** bajo este concepto cada especie es distinguible de sus afines por su morfología. Las limitaciones de este concepto son evidentes y aplicables solo a ciertos casos en los que la “apariencia” es suficiente para distinguirlas y no es aplicable a especies polimórficas. **Especie biológica** (Dobzhansky 1935,

Mayr 1942) es un grupo (o población) de individuos que pueden cruzarse entre si, pero que están aislados reproductivamente de otros grupos afines. Este es el concepto más ampliamente aceptado a pesar de las críticas (e.g. inaplicable a organismos fósiles, asexuales, híbridos). El asumir una especie como biológica, implica evolutivamente asumir que es una población reproductivamente aislada, por lo que constituye un linaje evolutivo separado y que es reforzado por una serie de barreras que pueden ser de carácter geográfico o biológico. La especie biológica es libre de seguir su propio curso en respuesta a los procesos genéticos e influencias ambientales que causan los cambios evolutivos. **Especie evolutiva** (Wiley 1978) es un linaje (una secuencia ancestrodescendiente) de poblaciones u organismos que mantienen su identidad de otros linajes y que poseen sus propias tendencias históricas y evolutivas. Este concepto considera que ante la existencia de barreras geográficas o biológicas, el flujo génico entre las mismas, será tan bajo, que se producirá divergencia genética. El concepto de especie evolutiva toma en cuenta que la evolución cladogenética puede ser reticulada. Esto significa que aquellas poblaciones que inicialmente se separaron y que comenzaron a divergir genéticamente, vuelven a juntarse truncando de esta manera el aislamiento y produciendo especies híbridas de las que emerge una nueva población que puede ser reconocida como unidad independiente. **Especie filogenética** (Cracraft 1989, de Queiroz y Donoghue 1990) es cualquier grupo de organismos en el cual todos ellos comparten un único carácter derivado o apomórfico (no presente en sus ancestros o afines). Si este concepto fuera utilizado rigurosamente, poblaciones locales aunque ubicadas cercanamente entre sí serían consideradas especies diferentes debido a que cada población puede tener variantes genético-moleculares únicas. **Especie ecológica** (Van Valen 1976) es un linaje (o conjunto de linajes cercanamente relacionados) que ocupa una zona adaptativa y que se desarrolla independientemente de todos los linajes establecidos fuera de su distribución.

Cuadro 1.1 Criterios de reconocimiento y comparaciones entre los conceptos biológico, morfológico, filogenético y genético de especie.

Criterio o circunstancia	Biológico	Morfológico	Filogenético	Genético
Poblaciones distintas diagnosticables reconocidas como especies separadas	Algunas veces	La mayoría de las veces	Siempre	Si, si las distancias genéticas son las típicas de especies hermanas
Las especies incluyen poblaciones alopátricas diagnosticables	Si, el concepto de subespecie esta aceptado ampliamente	Si, las subespecies son aceptadas	Nunca, las especies son un concepto no relevante	Si, las subespecies son relevantes pero definidas genéticamente
Las especies representan taxa terminales que pueden utilizarse en análisis biogeográficos y filogenéticos	Algunas veces	Algunas veces	Siempre	Siempre
Provee información histórica	No	No	Si	Si
Flujo génico entre especies	Raramente	No directamente	Algunas veces	Aceptable
Poblaciones asiladas reproductivamente	Siempre	Siempre	Siempre	Siempre
Hibridización extensiva, poblaciones distintas diagnosticables importante para establecer el estatus de especies	Raramente	Raramente	Casi siempre	Si, si la integridad de las dos pozas génicas esta protegida
Poblaciones alopátricas potencialmente entrecruzables importante para establecer el estatus de especie	Si	Si, estimado por divergencia morfológica	Nunca	Si, estimado mediante la distancia genética de ADN
Delimitación de áreas de endemismo	Menos preciso	Menos preciso	Bueno, más preciso	Bueno, más preciso
Biodiversidad genética inter e intraespecífica documentada	Algunas veces	Raramente	Algunas veces	Siempre, con muestreo adecuado
Tiempo estimado de origen	No	Algunas veces, si los fósiles están disponibles	Algunas veces	Siempre
Da pie a la iniciativa del código de barras	No	Si, a través de especímenes voucher/nombres binomiales	Algunas veces	Siempre
Resuelve límites geográficos para especies crípticas	No	No	Algunas veces si se usa un árbol de genes	Siempre, con muestreo adecuado
Puede ser influenciado por condiciones ambientales locales	Si, si se usa una base de datos morfológica	Si	Si, si se usa una base de datos morfológica	No

Especiación.

Modelos de especiación.

La especiación es un proceso no fácilmente observable de manera directa en condiciones naturales (Kondrashov y Mina 1993) y la distinción entre los modelos de especiación es difícil (Coyne 1992; Ödeen y Florin 2000). El modelo más aceptado es el de *especiación alopátrica* (Mayr 1942; Jeanmonod 1984) o geográfica, y es probablemente el de mayor aceptación (Coyne y Orr 1989). De acuerdo con este modelo, el proceso entero ocurre en disyunción, debido a la presencia de alguna barrera geográfica (Eldredge 1989; Turelli et al. 2001); enfatiza la importancia de la interrupción del flujo génico (Rice y Hostert 1993) y sugiere que este tipo de especiación no es posible sin aislamiento (Johannesson 2001).

Como teoría sostiene que las razas geográficas son los precursores de especies en un proceso continuo de divergencia evolutiva, en donde el aislamiento geográfico permite a las poblaciones adquirir y mantener nuevas combinaciones génicas que determinan sus caracteres morfológicos y fisiológicos distintivos. Este tipo de especiación puede ocurrir rápidamente (*e.g.*, efecto fundador o especiación peripátrica; Carson 1975; Barton 1985) o mediante un proceso gradual que conduce a explotar distintos recursos o ambientes conduciendo a la evolución de diferencias principalmente por aislamiento reproductivo (Rice y Hostert 1993; Schluter 1996, 1998, 2001) separando a las poblaciones en picos adaptativos que corresponden a distintos “*nichos ecológicos*” (Hatfield y Schluter 1999). A esto último también se le conoce como especiación ecológica (Endler 1989; Templeton 1989; Hatfield y Schluter 1999).

Maynard Smith (1966) fue uno de los primeros en mostrar la viabilidad del modelo simpátrico de especiación y Bush (1975) mostró que existe en algunas especies de insectos. En la

especiación simpátrica no hay segregación espacial entre las poblaciones divergentes y los miembros de cada una permanecen en el área de distribución de la otra (Eldredge 1989). Puede ocurrir vía polimorfismo sin incluir etapas intermedias de aislamiento geográfico o microgeográfico en donde la especie progenitora ocupa un ambiente con diversos nichos dentro de un territorio común en el que está actuando la selección disruptiva (Grant 1981); así como por competencia de recursos (Kisdi y Geritz 1999; Dieckmann y Doebeli 1999; Doebeli y Dieckmann 2000). En la actualidad, existe información sustancial tanto de que la especiación simpátrica tiene un papel predominante en ciertos grupos (e.g., Kondrashov y Mina 1986; Tauber y Tauber 1989; Tregenza y Butlin 1999) como de que el aislamiento por barreras geográficas no es un prerrequisito para la especiación (Bush 1975, 1994; Templeton 1980; Kondrashov y Mina 1986; Endler 1989).

La variación juega un papel central en muchas de las discusiones sobre los mecanismos de especiación, particularmente en la controversia concerniente a los modelos alopátrico y simpátrico. La principal diferencia de opinión reside en si las poblaciones necesitan o no estar geográficamente separadas o aisladas antes de que la diferenciación ocurra. Lo anterior, lleva a preguntarnos, ¿qué es realmente importante durante el proceso de especiación? el aislamiento reproductivo de acuerdo al concepto biológico de especie, o las restricciones ambientales como lo dice el concepto ecológico de especie. Estudios recientes (e.g., Rundle et al. 2000; Hey et al. 2000) apuntan a que de manera primaria la especiación es producto de las diferencias ambientales, más que del aislamiento geográfico. Otros trabajos consideran que las restricciones ambientales y el flujo génico son parte de los mecanismos intrínsecos de cohesión responsables de la especiación (Templeton 1989). La discusión, entonces, reside en qué es importante durante el proceso de especiación: el aislamiento reproductivo tal como lo indica el concepto biológico, o las restricciones ambientales argüidas en el concepto ecológico.

En resumen, podríamos postular tres variables involucradas en la especiación 1) los mecanismos genéticos, que pueden incluir uno o más rearrreglos cromosómicos; 2) mecanismos de aislamiento reproductivo que juegan un papel primario en la iniciación de la dicotomía, los cuales pueden ser etológicos o estacionales; y 3) el componente geográfico. Estos tres tipos de variables proveen las bases de un gran número posible de modelos de especiación (White 1978). Considerando la especiación en función del flujo de genes, y no de distribuciones geográficas, puede decirse que existen tres modos posibles de especiación: 1) después de un periodo de diferenciación, el aislamiento reproductivo es alcanzado por el desarrollo de barreras reproductivas en presencia de flujo de genes; 2) después de un periodo de diferenciación, el aislamiento reproductivo es alcanzado por barreras al flujo de genes; y 3) la ruptura irreversible del flujo de genes produce un aislamiento reproductivo "instantáneo", como el cambio en el nivel de ploidía. Para completar el proceso de especiación es necesario alcanzar el aislamiento reproductivo, el cual comprende el estado final en todos los casos, es decir, la ruptura completa e irreversible de la continuidad genética. Sin embargo, no importa cómo ocurra la diferenciación no hay una garantía de que el aislamiento reproductivo completo será alcanzado, como tampoco las distribuciones finales de los organismos proveen indicaciones, en sí mismas, del modo de especiación que ha estado involucrado. La adquisición de la distribución geográfica actual, así como de otras características, pueden ser fenómenos post-especiación (Barraclough y Vogler 2000).

Cambios climáticos y especiación.

Las distribuciones geográficas actuales de las especies son el resultado de eventos climáticos, ecológicos e históricos. Las fluctuaciones climáticas ocurridas a partir del Terciario se han propuesto como el factor principal que moldeó la distribución actual de múltiples especies

(Hewitt 1996; Cruzan y Templeton 2000; Knowles 2000; Bermingham y Dick 2001; Richardson et al. 2001; Tzedakis et al. 2002; Near et al. 2003) haciendo que las poblaciones se hicieran alopátricas y subsecuentemente especiaron (Holder et al. 1999; Clarke et al. 2001). Los mismos estudios parecen indicar que los periodos repetidos de frío y calor promovieron la divergencia y especiación en ciertos grupos taxonómicos (Cope 1994; Hewitt 1996; Zlicka y Zink 1997; Avise et al. 1998; Veith et al. 2002, 2003) pero no en otros (Klicka y Zink 1997; Dynesius y Jansson 2000; Knowles 2000).

Los cambios en la distribución y ambiente generaron las diferentes zonas climáticas (boreal, templada y tropical), trayendo consecuencias genéticas y ecológicas (Hewitt 2000). Durante las fluctuaciones climáticas, las poblaciones fueron forzadas a fragmentarse y expandirse repetidamente, siendo el tiempo en algunos casos, insuficiente para la diferenciación a especies (Tzedakis et al. 2002). Sin embargo, datos moleculares muestran considerable divergencia entre poblaciones para otras especies (e.g., Hewitt 1996, 1999, 2000). El grado de divergencia en DNA indica que las especies se formaron con antelación al Cuaternario mientras que los taxa hermanos han divergido recientemente, encontrándose éstos, con frecuencia distribuidos en regiones montañosas (Fjeldsa y Lovett 1997; Roy 1997).

De la misma manera, debieron aparecer refugios en las costas que también promovieron los procesos de divergencia y especiación, mediante el aislamiento de poblaciones en las zonas recientemente fragmentadas (Clarke et al. 2001). Las expansiones secundarias y la rápida colonización pudieron producir áreas de variabilidad genómica en las cuales hubo selección y adaptación a los diferentes ambientes (Hewitt 2000).

Se ha postulado la existencia de “centros de especiación” durante los ciclos interglaciares en donde la estabilidad ecológica permitió la supervivencia de especies antiguas y de poblaciones residuales así como, la acumulación de divergencia genética (Fjeldsa y Lovett 1997; Knowles

2001; Tzedakis et al. 2002). Las poblaciones supervivientes en estos hábitats aislados pudieron diferenciarse por selección natural y deriva génica y bajo estas condiciones fluctuantes cada taxón pudo seguir su propia ruta de divergencia y especiación (Hewitt 1996; Tzedakis et al. 2002).

Las diferencias poblacionales en constitución genética con respecto a las áreas colonizadas nos indican zonas en donde la diversidad genética disminuye y por ende rutas de migración. Un gran número de comunidades desaparecieron y nuevas surgieron como consecuencia de la migración individual de sus componentes, las especies (David 1989). Sin embargo, para las especies de zonas secas que tienen los mismos requerimientos ecológicos y distribuciones, las barreras geográficas pueden haber dejado similitudes en los refugios y rutas de migración, incluso cuando estas migraciones no fueran sincrónicas (Taberlet 1991).

De manera general la respuesta de las plantas a los cambios climáticos puede darse por tres diferentes vías; pueden extinguirse, tener radiaciones adaptativas, especiación o bien pueden cambiar su distribución geográfica (Bennet 1997, Kropf et al. 2002; Losos y Glor 2003). Dicha respuesta a los cambios climáticos es un proceso dinámico consistente de repetidos refugios al final de la etapa interglaciar y la expansión fuera del refugio (Hewitt 2000). Se piensa que fue en los refugios donde las especies alcanzaron mayor diversidad genética mientras que en las áreas recolonizadas, poseían escasos genotipos representantes sólo de una parte del total de la diversidad genética presente en los refugios (Hewitt 1996, 2000; Ibrahim 1996).

En la actualidad, existe un gran número de estudios filogeográficos disponibles sobre refugios glaciares para especies de plantas en Europa (e.g. Dumolin-Lapegue et al. 1997; Petit et al. 1997; Cornes y Kadereit 1998; King y Ferris 1998; Taberlet 1998), la parte norte de Norte América (e.g. Sewell et al. 1996; Tremblay y Schoen 1999) y en los trópicos (e.g. Dutech et al. 2000; Caron et al. 2000; Ogden y Torpe 2002; Cavers et al. 2003; Knapp y Mallet 2003). Todos

ellos concentrados en identificar los refugios y detectar los patrones espacio temporales de fragmentación y dispersión como resultado de las variaciones climáticas. Sin embargo, poco se sabe acerca de las tasas de especiación y radiación evolutiva de las plantas en dicho periodo y aún menos acerca de cómo las plantas y sus genomas sobrevivieron y se desplazaron durante las glaciaciones dentro de las selvas secas. La posible razón de lo anterior es la dificultad de entender la historia genética espacial de las especies en esos refugios comparado con las regiones del norte. Pennington et al. (2000) argumentan que la distribución fragmentada de las selvas secas neotropicales (Figura 1.1) debe relacionarse con las fluctuaciones climáticas durante el Cuaternario y que esos fragmentos son vestigios de un periodo en donde las selvas secas se encontraban ampliamente extendidas (Prado y Gibbs 1993).

La selva seca cubre 2% del territorio mexicano (Ramírez 1994) y posee alrededor de 6000 especies de fanerógamas de las cuales 40% son endémicas (Rzedowski 1992). En los bosques secos mexicanos existe una clara representación y dominancia de las subfamilias Burseraceae y Leguminosae, con alternancia en menor importancia de Euphorbiaceae, Bignoniaceae, Moraceae, Boraginaceae, Meliaceae, Anacardiaceae, Rutaceae, Sapindaceae entre otras (Sousa datos no publicados). México es considerado uno de los centros de diversificación de leguminosas. Sólo cinco géneros son considerados como endémicos a nuestro país, de ellos cuatro están confinados a los bosques secos. Los géneros no endémicos poseen más del 75 % de sus especies en México, éstas tienen un papel preponderante en la composición de los bosques secos mexicanos (Sousa y Delgado 1993).

La Depresión del Río Balsas es conocida como una de las zonas con mayor número de taxa endémicos (Sousa y Delgado 1993; Becerra y Venable 1999); algunas de esas especies representan elementos tanto recientes como antiguos en la biota mexicana (Sousa y Soto 1989). Existen 32 especies endémicas de leguminosas reportadas para la región, un foco de evolución

que ha favorecido la variación y la especiación (Sousa datos no publicados). La naturaleza de ese endemismo y el papel de los cambios climáticos en la tasa de evolución y especiación aún no han sido explorados.



Figura 1.1 Distribución geográfica de los bosques secos en América, basado en Pennington et al. 2000.

La complejidad de patrones esperados en las selvas secas mexicanas se debe en parte a que los ciclos de contracción y expansión dentro de estos límites geográficos se vieron reducidos comparados con los grandes desplazamientos geográficos de las especies del Norte. En las selvas secas y zonas templadas los efectos de las glaciaciones fueron limitados por la elevación de las cadenas montañosas, lo que hizo que los desplazamientos se realizaran altitudinal y longitudinalmente. En la planicie morfotectónica del Balsas las contracciones y expansiones probablemente provocaron que las poblaciones ascendieran y descendieran las cadenas montañosas fragmentando las poblaciones ancestrales y originando discontinuidades en la distribución geográfica.

El efecto de los cambios climáticos en las leguminosas.

Los mayores pulsos de temperatura durante el Cenozoico incrementaron la diversidad de Leguminosas y muchas otras familias. Dichos eventos resultaron en la expansión de ensamblajes de plantas a nuevas regiones ambientales durante las fases secas de los cambios climáticos (Dilcher 1995). Es en la mitad del Eoceno cuando las leguminosas adquieren un papel importante en la flora de muchas regiones del sur y la parte central de los Estados Unidos, en donde se da un cambio gradual de clima más templado a uno más seco (49-48 Ma) lo que coincide con la aparición en el registro fósil de *Caesalpinia*, *Mezoneuron* y otras Caesalpininae (Herendeen et al. 1992; Cuadro 1.2). No se conocen fósiles del Terciario para el oeste de México y Centro América, de hecho se desconocen también para el Pacífico. Así mismo, no se tiene evidencia clara de zonas extensivas o bien desarrolladas de selva seca para el oeste de los Estados Unidos o Baja California para el mismo periodo (Dilcher 1995).

Con el clima seco para el Eoceno tardío los taxa de las zonas subhúmedas se expandieron y se distribuyeron ampliamente, (e.g., *Acacia*, *Caesalpinia* y *Cassia*); algunos de esos taxa indican que el ambiente era más árido que un bosque seco (Dilcher 1995). Los taxa de zonas secas sólo pudieron extenderse después de que el clima seco se expandiera durante el Terciario, en este sentido, las especies (y géneros) se adaptaron progresivamente a los periodos más largos de sequía radiando en esas regiones. El registro del Terciario provee evidencia de sitios secos cercanos a los másicos que contenían taxa con requerimientos ecológicos distintos (Dilcher 1995).

Para el Mioceno muchas de las floras de los Estados Unidos se encontraban distribuidas en zonas cada vez más secas. El periodo más seco del Terciario en Estados Unidos coincide con los mayores cambios ambientales en el sur de África en donde ocurre una de las disminuciones más severas de temperatura. Este cambio en el clima resulta en rápida especiación en el sur de

África (incremento en endémicas al 30%), muchas de esas especies se formaron en el intervalo seco (5-7 Ma) y otras más durante los cambios climáticos del Cuaternario (Sanderson y Donoghue 1989).

Muchas de las especies de leguminosas se originaron poco antes del Cuaternario en sitios restringidos que les permitieron mantenerse durante esos periodos. Las fluctuaciones climáticas del Cuaternario llevaron a las leguminosas a diversificarse en todos los ambientes. El modelo general sugiere continua radiación de las tres subfamilias de leguminosas durante los cambios climáticos mayores (cálido y seco, frío y templado) de variada duración (1-4 Ma) en conjunto con un incremento de tierras y diversidad edáfica que continuamente proveía de sitios nuevos para la colonización mientras el Cenozoico avanzaba (Dilcher 1995).

Las fluctuaciones climáticas del Cuaternario han sido asociadas al aumento en ploidía de numerosas plantas anuales y herbáceas perennes de zonas subhúmedas y secas (Stebbins 1952). Presumiblemente el aumento en ploidía de estas especies ocurrió debido a que las fluctuaciones climáticas llevaron a diferentes poblaciones a zonas donde pudieron sobrevivir (refugios). Las fluctuaciones del Cuaternario aumentaron la diversidad de leguminosas en los trópicos, así como en zonas secas y frías de las regiones extratropicales. Las tribus de leguminosas más abundantes en las selvas secas durante el Terciario según el registro fósil fueron *Caesalpininae*, *Mimoseae*, *Swartzieae* y *Sophorae* (Herendeen 1990).

Cuadro 1.2 Principales eventos ocurridos durante la diversificación de Leguminosae desde el Cretácico al Pleistoceno en todos los continentes. Basado en Sanderson y Donoghue 1989, Polhill y Raven 1981, Herendeen et al. 1992. Ejemplos usados *Caesalpinia* y aliados.

Era	Asia	Africa	Europa	América
Cretácico tardío	Nivel del mar + 350 m. Primer registro de Leguminosae (Raven & Polhill 1981) en la India e Indochina.			
Paleoceno (65-54 Ma)	Monson Tropical, episodios con los más bajos niveles del mar. Fósiles de polen, frutos y madera indicando la presencia de Caesalpinoideae y Mimosoideae (Herendeen et al 1992).			Bosque tropical húmedo, bosque húmedo de montaña (Panamá).
Eoceno (53-36 Ma)	Monson Tropical episodios con bajos niveles del mar Las tres subfamilias están representadas en el registro fósil.			Clima méxico templado, flora similar a la del bosque tropical seco del Pacífico (Dilcher 1973) <i>Caesalpinia claibornensis</i> , <i>C. flumen-viridensis</i> (USA). Sin registros de bosque seco bien desarrollado en O de Estados Unidos o Baja California.
Oligoceno (38-26 Ma)	Húmedo, monson tropical o bosques tropicales El nivel del mar cae por debajo de los 250 m. Especies en Yunnan e India.			Clima frío y seco, al parecer más seco que el de los bosques secos actuales (Raven & Axelrod 1978).
Mioceno (23-8 Ma)	El nivel del mar cambia en tres estadios a más de 220 m. Monson Tropical. Fósiles en China e India. Migración de Leguminosas a la India desde Africa y Sureste asiático (Awasthi 1992). <i>Caesalpinioxylon sitholeyi</i> , <i>C. feistmanteli</i> . Leguminosas dominantes en India.		<i>Caesalpinia europaea</i> , <i>Caesalpinites schaporenkoi</i> en el Este de Georgia y Armenia	<i>Caesalpinites</i> , <i>Caesalpinia</i> (Cuba, Berry 1939), periodos más secos similares al bosque seco. <i>Caesalpinia</i> y otras especies de bosque espinoso probablemente presentes en Baja California (Graham & Dilcher 1995).
Plioceno (7-2 Ma)	El nivel del mar se eleva a más de 140 m.	El registro fósil se hace escaso (periodo seco).	<i>Caesalpinia macrophyloides</i> en Abkhazia.	
Pleistoceno	Diversos periodos glaciales.			18-20 periodos glaciales-interglaciales; por lo menos 9 en los últimos 80, 000 años que incrementaron la aridez.

La Planicie morfotectónica de la Sierra Madre del Sur, un experimento de especiación in situ.

La historia biogeográfica de México es una de las más complejas a escala mundial debido a que el territorio del país se conformó por la colisión de distintas placas tectónicas (Ferrusquía-Villafranca 1993) y posee taxa de origen templado y tropical. Existen dos hipótesis para explicar el origen de la biota tropical del país, una aduce el origen en Gondwana occidental, seguida por la dispersión desde Sudamérica hacia Norteamérica. La otra hipótesis es la boreotropical que postula un intercambio biótico entre Norteamérica y Eurasia durante el Terciario temprano (Lavin y Luckow 1993).

La Depresión del Balsas posee un alto porcentaje de taxa endémicos tanto en plantas como en animales. Para el caso de plantas los grupos con mayor número de taxa endémicos son Burseraceae (Toledo 1982; Becerra y Venable 1999; Becerra 2003), Commelinaceae (Hunt 1993) y Leguminosae (Sousa y Soto 1987; Sousa y Delgado 1993; Lewis 1998).

La interrogante de por qué hay tantas especies endémicas y con esas distribuciones no es nueva y Miranda (1947) trata de explicar ese hecho aduciendo que los residuos de selva seca en el interior del Balsas eran evidencia de una época de mayor humedad en el pasado. De acuerdo con el mismo autor, el periodo de mayor humedad debió ocurrir de manera reciente, precediendo a los climas actuales en la Depresión.

Al ser más húmedo el clima, los actuales islotes de selva seca, podrían haber estado conectados entre sí y cabría esperar que las poblaciones que hoy se encuentran aisladas hubieran evolucionado independientemente produciendo variedades y especies diferentes con distribución geográfica restringida.

Toledo (1982) retoma las ideas de Miranda y sugiere la existencia de dos unidades fisiográficas en la Depresión planteando barreras de naturaleza climática, geográfica y litológica dentro de la misma; separando a la Depresión en dos partes.

Toledo (1982) plantea la siguiente hipótesis del proceso de especiación en el Balsas: “*durante los fenómenos de migración latitudinal y altitudinal en el Pleistoceno, las partes más rezagadas de las poblaciones pudieron haberse separado del conjunto de la especie y al ser sometidas a presión de selección más intensa hayan dado origen a especies nuevas que se desarrollaron en las áreas abandonadas por la especie originaria, aprovechando sus nuevos recursos adaptativos*”.

La fragmentación y unión del hábitat del antecesor originó que las poblaciones fragmentadas estuvieran aisladas lo suficiente para diferenciarse morfológica y/o molecularmente y desarrollaran mecanismos de aislamiento. Los fenómenos de fragmentación y aislamiento de las zonas ocupadas por las especies, alternadas con fusión de poblaciones anteriormente separadas debieron tener un importante papel sobre los procesos de especiación de distintos taxa (Toledo 1982), así como en la configuración del actual panorama del complejo *Caesalpinia hintonii* en la Depresión del Balsas.

El complejo *C. hintonii* provee la oportunidad de examinar la importancia de las migraciones poblacionales con respecto al impacto de los ciclos glaciares durante el Cuaternario sobre la evolución de plantas en la Depresión del Río Balsas. Dicho de otra forma, la divergencia molecular y genealógica del complejo *C. hintonii* en la Depresión podría proveernos de información útil para discernir entre antiguos y recientes eventos evolutivos que promovieron la diversificación de especies en la Depresión del Balsas.

Para examinar los procesos de especiación en la Depresión del Balsas podríamos valernos de dos hipótesis: la de vicarianza y la de dispersión. Bajo la hipótesis de

vicarianza, la existencia de distintos linajes alopátricos en la Depresión del Río Balsas podría estar reflejando la desaparición de la barrera que fragmentó la población ancestral pero las “especies” reunidas podrían ser consideradas hermanas y su origen estar históricamente ligado. Es decir, bajo este escenario de especiación alopátrica, los cambios climáticos nos explicarían la disyunción de las áreas de distribución y la subsiguiente evolución en linajes separados. Sin embargo, bajo la hipótesis de dispersión, los taxa alopátricos de la Depresión no necesariamente se encontrarían ligados temporalmente. La dispersión de los linajes durante las glaciaciones del Pleistoceno podrían haber homogeneizado los haplotipos al unirse poblaciones de estos taxa haciendo que en la actualidad muestren baja diversidad genética y divergencia comparado con los taxa que no estuvieron expuestos a los desplazamientos y homogeneizaciones del Pleistoceno.

Relevancia del estudio.

El objetivo principal de este estudio fue examinar los patrones de diversidad genética y diferenciación en las poblaciones de un complejo de especies denominado *Caesalpinia hintonii*, aparentemente afectado por los eventos climáticos del Cuaternario y a partir de los resultados proponer un modelo filogeográfico para la Depresión del Río Balsas. La Depresión del Río Balsas provee una oportunidad única para estudiar el efecto de los eventos del Cuaternario sobre las especies de selva seca. Pues mientras que en las zonas templadas del norte los desplazamientos de las especies las llevaron a agruparse en refugios, en las zonas sureñas debido a la compleja orografía los desplazamientos de las especies fueron limitados por la elevación de las cadenas montañosas ocasionando que éstas se desplazaran en distintos sentidos en la planicie morfotectónica de la Sierra madre del Sur.

La Depresión del Río Balsas ha sido propuesta como uno de los sitios con más alto grado de endemismos en el país desconociéndose las causas y procesos que llevaron a ello. La alta concentración de especies con diferentes niveles de parentesco y variados patrones ecológicos y geográficos al ser correlacionada con factores ambientales, ofrece buenas posibilidades para la búsqueda de explicaciones generales de los fenómenos que dieron origen a la alta concentración de especies en esta unidad fisiográfica, aprovechándose para algunas consideraciones hipotéticas de tipo evolutivo. Estudios filogeográficos que documenten, definan e identifiquen los procesos evolutivos por los que pasaron las especies del Balsas pueden ayudar a identificar los patrones históricos y de especiación generales en la Depresión.

Sistema de estudio.

Caesalpinia L. sensu lato es un género de leguminosas que comprende alrededor de 150 especies distribuidas en los trópicos y subtrópicos del mundo. México posee aproximadamente 45 especies, de las cuales 31 son consideradas como endémicas, siendo uno de los centros más importantes de diversificación del género junto con África y Malasia (Sousa & Delgado 1993).

Las especies del género poseen gran variabilidad morfológica dentro y entre especies, lo que complica la taxonomía. Basándose en morfología, Lewis (1998) propone seis grupos: *Brasilettia* (=Coulteria), *Caesalpinia sensu stricto*, *Libidibia*, *Poincianella*, *Erythrostemon*, *Russellodendron* (=Tara), y dos subgéneros: *Guilandina* y *Mezoneuron*; más tarde Lewis et al (2005) elevan a la categoría de género los seis grupos y los subgéneros. Contreras (1991) considera que los patrones morfológicos de *Caesalpinia* son complejos debido tal vez a los efectos de expansión primaria y a una extinción posterior importante, inferida por la existencia de géneros cercanos a *Caesalpinia* aislados y dispersos en los trópicos de Asia y África, los cuales tienen afinidad morfológica con géneros sudamericanos y del Caribe y con parte de *Poincianella*.

Poincianella, es un grupo restringido al continente americano y las Antillas; consta de 57 especies distribuidas principalmente en zonas semiáridas. Dentro del grupo existen especies o complejos que presentan polimorfismo morfológico intraespecífico, como es el caso de los complejos *Caesalpinia hintonii* y *C. exostemma*. Sousa y Delgado (1993) consideran que ambos complejos, junto con las especies *C. caladenia* y *C. mexicana*, son piezas clave para entender cómo se dio la diversificación de *Poincianella* en México, ya que algunas de estas especies se encuentran en las áreas secas de la vertiente del Pacífico,

importante ruta de migración para leguminosas y además, dichas especies pueden considerarse como las más antiguas de Norteamérica.

Complejo *Caesalpinia hintonii*.

El complejo *Caesalpinia hintonii* está constituido por cinco especies: *Caesalpinia hintonii* Sandwith, *C. epifanioi* J.L. Contreras, *C. laxa* Benth., *C. macvaughii* J.L. Contreras & G.P. Lewis y *C. melanadenia* (Rose) Standley (Figura 1.2), especies endémicas con distribución restringida a la planicie morfotectónica de la Sierra Madre del Sur.

Información genética previa.

Estudios previos de genética de poblaciones en el complejo *Caesalpinia hintonii* sugirieron procesos de especiación reciente, probablemente como producto de innovaciones morfológicas (Sotuyo et al. 2004). El mismo estudio mostró que existe una gran afinidad genética dentro del complejo, encontrándose que el morfo de *C. hintonii* de la región de Infiernillo es más cercano con la población de *C. macvaughii* que con las demás morfos de su misma especie. Las poblaciones de la especie *C. hintonii* están estructuradas genéticamente y se comportan como entidades evolutivas independientes. En ese estudio no se incluyó *C. laxa* por no haber sido encontrada en campo.

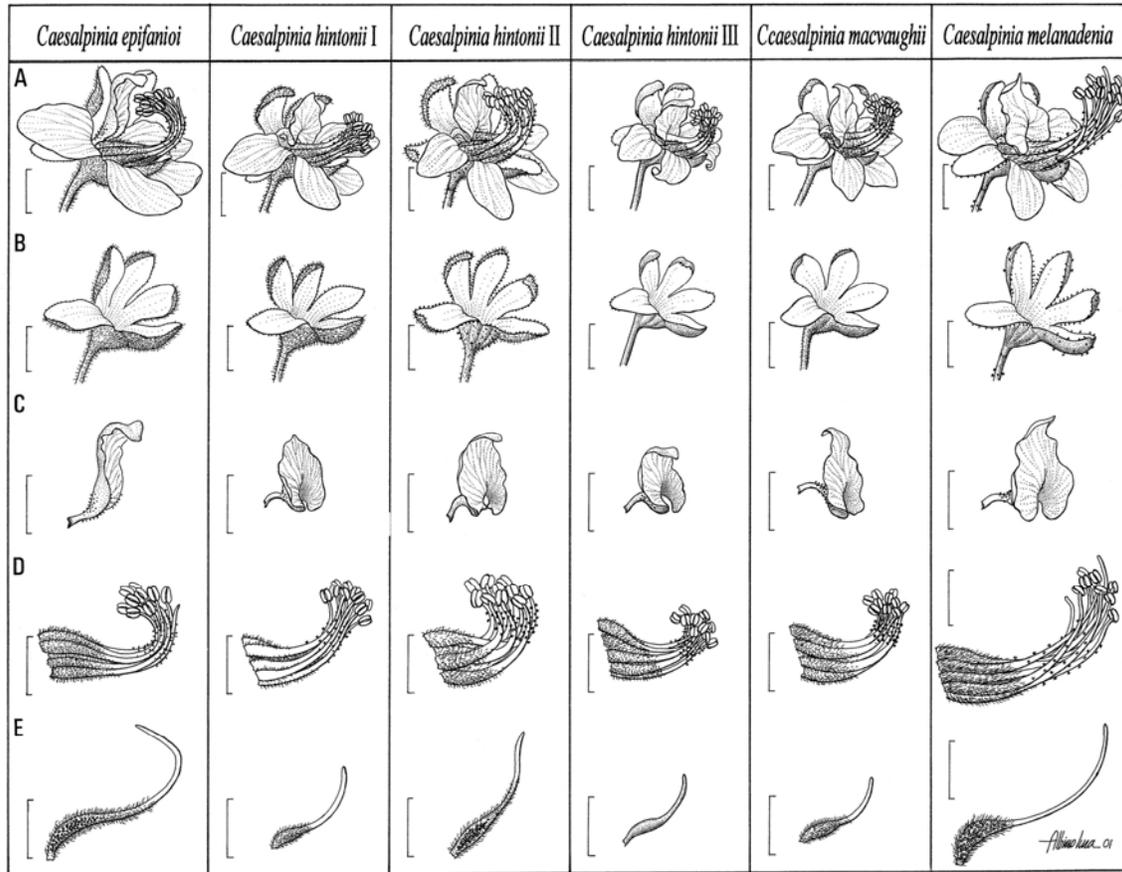


Figura 1.2 Comparaciones florales entre los miembros del complejo *Caesalpinia hintonii* (no se considera a *C. laxa*). Están representados los tres morfos de *C. hintonii* (morfo I= poblaciones de la cuenca alta del Balsas, morfo II= población Zicuítaro, morfo III= Infiernillo). A. flores vista lateral. B. cálices. C pétalo estandarte. D. androceo. E. gineceo. Barra de escala igual a 4 mm.

Área de estudio.

En la planicie morfotectónica de la Sierra Madre del Sur se encuentran la Depresión del Río Balsas y el Valle de Tehuacan-Cuicatlán que incluyen partes de los estados de Michoacán, Guerrero, Morelos, Puebla y Oaxaca (Figura 1.3). La Depresión del Río Balsas se encuentra orientada del este al oeste formando el drenaje del Río Balsas, el cual se encuentra rodeado por sierras, algunas de las cuales exceden los 2000 m, continuándose con el valle de Tehuacan-Cuicatlán en los estados de Puebla y Oaxaca.

Valle de Tehuacan-Cuicatlán.

El valle se localiza entre los estados de Puebla y Oaxaca, entre las latitudes 17°39'-18°53' N y longitudes 96°55'-97°44' O, mide 10, 000 km² y su altitud va de los 600 a 2950 m. La temperatura media anual en el Valle de Tehuacán varía entre los 18°C a 22°C y aumenta en Cuicatlán. El valle de Tehuacán-Cuicatlán pertenece a la provincia fisiográfica de la Fosa de Tehuacán y forma parte de la cuenca alta del Río Papaloapán. La historia geológica comprende cuatro fases: 1) la formación del complejo basal que data del Paleozoico-Mesozoico, 2) una inmersión de la cuenca a principios del Cretácico inferior, la cual formó el portal del Balsas y aisló el valle de Tehuacan respecto del Golfo de México con una depositación de sedimentos marinos ricos en material salino, 3) una serie de movimientos orogénicos aíslan la cuenca del Balsas y por tanto, el valle de Tehuacan-Cuicatlán pierde conexión con la Depresión del Balsas dando origen a un lago endorreico que data del Cretácico inferior a finales del Terciario, 4) la captación del Río Salado y sus tributarios por erosión remontante (Berinstain et al. 1996). Estos procesos formaron cerros de cimas planas con rocas calizas como roca madre, zonas de ladera con lutitas, zonas de depositación

aluvial a lo largo del Río Salado, así como áreas de material ígneo (Toledo 1982; Ferrusquía-Villafranca 1996).

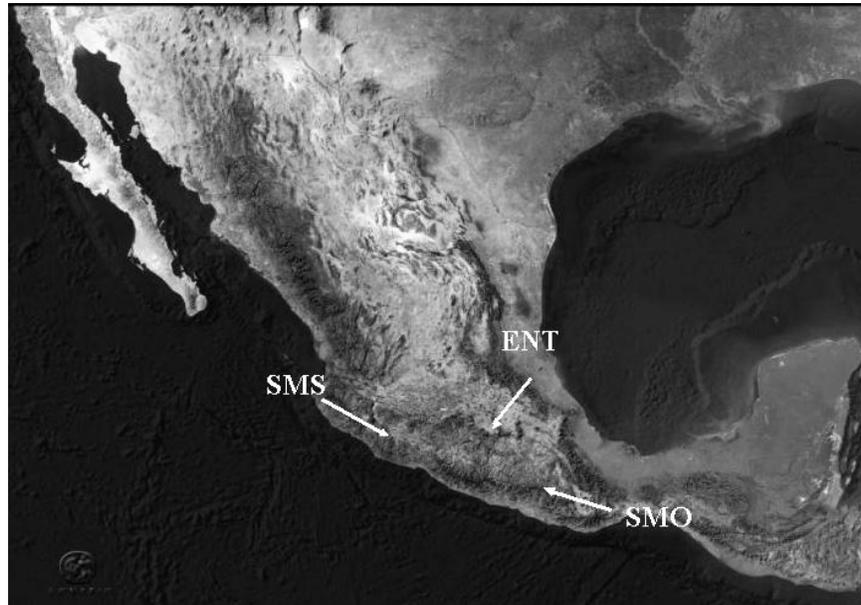


Figura 1.3 Localización de la Planicie morfotectónica de la Sierra Madre del Sur en el centro del país. SMS= Sierra Madre del Sur, ENT= Eje Neovolcánico Transversal, SMO= Sierra Madre de Oaxaca.

Depresión del Río Balsas.

La depresión se encuentra comprendida entre los meridianos $97^{\circ}30'$ y $103^{\circ}15'$ de longitud oeste y los paralelos 17° y 20° latitud norte; en la parte centro occidente del país. Geológica y estructuralmente el Río Balsas se encuentra en una zona de convergencia entre las placas de Cocos y Americana, y corresponde a una Costa de Colisión Continental, de acuerdo con la clasificación de Inman y Nordstrom (1971). Se encuentra enmarcada por dos rasgos estructurales de primer orden: una trinchera oceánica (la Trinchera Mesoamericana) y un sistema de cadenas montañosas continentales (la Sierra Madre del Sur). Ambas, cadena montañosa y trinchera, hacen de esta porción del centro-sur de México un fenómeno tectónicamente activo y altamente dinámico (Lugo 1985 y 1986). La Depresión esta

limitada al norte por el Eje neovolcánico transversal desde los límites de Michoacán y Jalisco hasta el cerro de la Malinche, al este la Sierra Madre de Oaxaca y al oeste se encuentra la Sierra Madre del Sur. La Depresión mide 105 900 km²; el Río Balsas tiene un curso de 840 Km, con un escurrimiento medio anual de 15 mil millones de litros cúbicos. El relieve se caracteriza por un complejo sistema montañoso, con latitudes desde los 900 a los 1800 msnm, de pendientes abruptas (20-40°) y numerosas cañadas (López 1984).

La cuenca del Río Balsas es un gran sinclornio que tiene una historia geológica que distingue varias etapas. En la primera, donde comienza a levantarse, el basamento inicial de rocas metamórficas precámbricas y paleozoicas fue cubierto durante el Mesozoico (Cretácico) por un mar transgresivo que depositó arenas finas y lutitas del Triásico; sedimentos terrígenos y carbonatados del Jurásico y calizas y dolomitas del Cretácico. En una segunda, el efecto de colisión entre las placas de Cocos y Americana originó batolitos (cuerpos intrusivos) en el Mesozoico tardío, dando origen a las cadenas montañosas que bordean la costa del océano Pacífico. Finalmente, durante el Cenozoico (Terciario-Cuaternario) se da un plegamiento que forma la depresión y una gran actividad volcánica, acompañada de levantamientos, dio como resultado sedimentos continentales de gran espesor (CONURBAL 1978).

La Depresión se encuentra dividida en la Depresión Oriental y Occidental por un estrechamiento ocasionado por la Sierra de Taxco-Teloloapan. Las dos cuencas sedimentarias están separadas por una lengüeta de esquistos pertenecientes al complejo basal, que se desprende del macizo de la Sierra Madre del Sur, atravesando la parte oriental del estado de Guerrero extendiéndose hasta el estado de Puebla. Los límites de la porción oriental del Balsas son 98°40'-99°40' oeste y 17°40'-18°40' norte con un límite de altitud de 1500m.

CAPÍTULO II

Análisis filogenético de las especies mexicanas de Poincianella (*Caesalpinia*: Caesalpinioideae) usando morfología y secuencias de cuatro regiones plastidio: provando la monofilia del complejo *C. hintonii*.

Nothing in biology makes sense except in the light of evolution
Nothing in evolution makes sense except in the light of phylogeny
Nothing in phylogeny makes sense except in the light of cladistics
Nothing in cladistics makes sense except in the light of total evidence

Sytsma & Pires 2001, P2 pag. 726
Plant Systematics in the next 50 years-Re-mapping the new frontier.
Taxon 50, 713-732

Resumen

Se conoce poco acerca de las relaciones evolutivas entre las especies del género *Caesalpinia*. El grupo *Poincianella* comprende 47 especies con variada morfología floral a nivel intra e interespecífico. Las relaciones filogenéticas entre 35 accesiones de 31 especies de *Caesalpinia* fueron examinadas utilizando 63 caracteres morfológicos y cuatro marcadores moleculares de plastidio (intron *trnL*, espaciador *trnL-F*, espaciador *psbA-trnH* y espaciador *accD-psaI*). Las filogenias morfológica y con *trnL*, *trnL-F* muestran congruencia con la filogenia propuesta por Lewis y Schrire, sin embargo proponen al grupo *Poincianella* como parafilético. Estos análisis no permiten corroborar la monofilia de los grupos propuestos dentro de *Caesalpinia*. En el caso de los complejos y alianzas propuestos por Lewis para *Poincianella* sólo el complejo *Caesalpinia hintonii* resulta monofilético.

Introducción

De las tres subfamilias reconocidas dentro de la familia Leguminosae, la subfamilia Caesalpinioideae es la que menos se conoce (Bruneau et al. 2001). Esta subfamilia comprende aproximadamente 160 géneros agrupados morfológicamente en cinco tribus morfológicas, Caesalpinieae, Cassieae, Cercidae, Detarideae y Amherstieae. Análisis cladísticos recientes basados en caracteres morfológicos y moleculares (Doyle 1995; Doyle et al. 1997, 2000; Kajita et al. 2001; Bruneau et al. 2001; Simpson et al. 2003) muestran que las relaciones entre estas tribus son problemáticas y controversiales.

La tribu Caesalpininae es considerada como la más tempranamente diversificada dentro de la subfamilia Caesalpinioideae constituida por 47 géneros (Polhill & Vidal 1981). Dentro de Caesalpinieae se encuentra el género *Caesalpinia* L. que como tradicionalmente se circunscribe, es uno de los géneros más grandes de las Caesalpinioideae e incluye alrededor de 150 especies pantropicales (Lewis & Schrire 1995; Lewis 1998). México

posee aproximadamente 45 de esas especies, de las cuales 31 son consideradas como endémicas, siendo junto con África y Malasia uno de los centros más importantes de diversificación del género (Sousa & Delgado 1993). Para el género existen estudios sobre biología reproductiva (Cocucci et al. 1992), morfología (Lewis 1998), cariólogía (Ibarra-Gonzalez 2002) y algunas filogenias incompletas (Simpson & Miao 1997, Bruneau et al. 2001), sin embargo, el origen y diversificación del grupo es aún desconocido. El género comprende 25 nombres genéricos bajo sinonimia (Lewis & Schrire 1995; Lewis 1998) indicando la complejidad de su taxonomía.

Las especies dentro de *Caesalpinia* han sido sujetas a numerosas revisiones y reestructuraciones por diversos taxónomos (De Candolle 1825; Bentham & Hooker 1865; Britton & Rose 1930; Lewis 1998). Durante décadas se ha reconocido que *Caesalpinia* no es monofilético (Lewis & Schrire 1995; Chapill 2000) y en la última década se han hecho intentos para obtener una clasificación satisfactoria y manejable (e.g. Lewis & Schrire 1995; Lewis 1998; Simpson & Miao 1997; Bruneau et al. 2001). Caracteres florales y de frutos indican que podrían existir grupos naturales dentro del género. Lewis (1998) propone seis grupos: [*Brasilettia* (=Coulteria), *Caesalpinia sensu stricto*, *Libidibia*, *Poincianella*, *Erythrostemon*, *Russellodendron* (=Tara)], y dos subgéneros (*Guilandina* y *Mezoneuron*) (Cuadro 2.1), que corresponden, en su mayoría, a los géneros propuestos en el pasado. Recientemente Lewis et al. (2005) validan los grupos como géneros.

Britton y Rose (1930) segregaron a *Poincianella* como género, reconociendo 34 especies; Lewis (1998) acepta sólo 21 de ellas y agrega 26 especies más al género (47 especies en total). Para México, el mismo autor considera únicamente 19 especies. *Poincianella*, es un grupo tropical que sólo se encuentra en América y las Antillas; distribuyéndose principalmente en zonas semiáridas. Las especies se distinguen por poseer

hojas con foliolos opuestos o alternos con cavidades internas que actúan como estructuras secretoras (Lestern & Curtis 1994). Las flores son pediceladas y polinizadas principalmente por abejas; el gineceo es sésil o cortamente estipitado; los frutos son rectos o falcados, elásticamente dehiscentes y las semillas están lateralmente comprimidas (Lewis 1998).

El complejo *Caesalpinia hintonii* esta formado por cinco especies (Lewis, 1998): *C. epifanioi*, *C. hintonii*, *C. laxa*, *C. macvaughii* y *C. melanadenia*. Contreras (1991) no considera a *C. laxa* como parte de esta agrupación. Las especies del complejo son árboles o arbustos con foliolos oblongo-elípticos con glándulas puntuadas negras a lo largo de todo el margen; los filamentos de los estambres son falcados sobresaliendo de los pétalos; poseen flores que van del rosa al rojo excepto en *C. epifanioi* y *C. macvaughii* en donde son amarillas.

En este Capítulo se realizó un análisis para inferir las relaciones filogenéticas entre las especies mexicanas del grupo *Poincianella*, que Lewis y Schrire (1995) consideran monofilético, utilizando caracteres morfológicos y moleculares. Con base en esta hipótesis filogenética, se evalúan cuáles de los complejos de especies reportados por Contreras (1991) y Lewis (1998) son válidos y se pone a prueba la monofilia del complejo *Caesalpinia hintonii* necesaria para los capítulos posteriores. Este estudio forma parte de un proyecto general para conocer las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Caesalpinia* a nivel mundial.

Cuadro 2.1 Las principales clasificaciones de *Caesalpinia* y taxa relacionados (Modificado de Lewis 1998). * Incluye *Caesalpinia* p.p. (excluye *C. pulcherrima*). Géneros en negritas.

Linneo (1735)	De Candolle (1825)	Bentham y Hooker (1865)	Britton y Rose (1930)	Lewis (1998)
CAESALPINIA	CAESALPINIA Sección Nugaria (Ticanto) Sección Sappania (Campecia) Sección Libidibia	CAESALPINIA Sección Nugaria Sección Sappania (Biancea) Sección Libidibia Sección Caesalpinaria Sección Erythrostemon	TICANTO BIANCAEA LIBIDIBIA GUAYMASIA BRASSILETTIA POINCIANELLA SCHRAMMIA ERYTHROSTEMON CAESALPINIA s.s.	CAESALPINIA Grupo LIBIDIBIA Grupo BRASSILETTIA (Guaymasia) Grupo POINCIANELLA* (Schrammia) Grupo ERYTHROSTEMON Grupo CAESALPINIA s.s. (Poinciana p.p.) Grupo RUSSELLODENDRON (Nirago) (Tara) (Coulteria)
	COULTERIA	Sección Cinclidocarpa Sección Coulteria	NICARGO RUSSELLODENDRON TARA	
GUILANDINA	GUILANDINA	Sección Pomaria (Cladotrichium) Sección Guilandina	GUILANDINA	Subgénero GUILANDINA (Bonduc)
POINCIANA	POINCIANA MEZONEURON	POINCIANA= DELONIX MEZONEURON	POINCIANA	Subgénero MEZONEURON
	HOFFMANNSEGGIA MELANOSTICTA REINCHARDIA	HOFFMANNSEGGIA (MELANOSTICTA) PTEROLOBIUM (Reinhardia) PELTOPHORUM (Brassilettia p.p)	LARREA ORTEGA, NON CAV. (HOFFMANSSEGGIA) (POMARIA) MOPARIA	HOFFMANNSEGGIA (Moparia) Grupo Pomaria (Cladotrichium) (Larrea Ortega p.p) (Melanosticta) PTEROLOBIUM (Reinhardia) BALSAMOCARPON MOULLAVA (Wigatea)

Materiales y Métodos

Taxa usados – Un total de 35 accesiones representando 31 especies, fueron incluidos en el análisis cladístico. Todas las especies de Poincianella presentes en México (19) fueron incluidas. Además, se incluyeron representantes de *Caesalpinia sensu stricto*, *Erythrostemon*, *Guilandina*, *Libidibia*, *Poinciana*, *Russellodendron*, *Hoffmannseggia sensu stricto* y *Pomaria*. Todos ellos considerados en el pasado como géneros distintos a *Caesalpinia* (Cuadro 2.2). Las subespecies de *Caesalpinia exostemma* y variedades de *C. hintonii* propuestas por Contreras (1991) y Lewis (1998) también se incluyeron. Así mismo, se incluyeron géneros cercanamente relacionados a *Caesalpinia* (*Parkinsonia-Cercidium*) (Lewis y Schrire 1995; Bruneau et al. 2001; Simpson et al. 2003); en particular, a las especies *Cercidium floridum*, *C. praecox* y *Parkinsonia aculeata* (*Parkinsonia-Cercidium sensu* J. Hawkins no publicado).

Estudio morfológico– Se realizó un análisis de la morfología externa basada en ejemplares de herbario (FCME, FHO, HBUAP, IEB, K, MEXU, XAL, INIREB Bajío; ver Apéndice D), en campo e invernadero. Los caracteres analizados comprendieron estructuras foliares, frutos y semillas vegetativas. Parte de la diversidad floral, del fruto y de las semillas se muestra en la Figura 2.1. Ejemplares de todas las muestras colectadas fueron depositados en los herbarios MEXU, K y/o BUAP. Así mismo, individuos vivos (a partir de semillas) fueron depositados en el Invernadero del Jodrell-Kew. Se revisaron caracteres descritos con anterioridad por diversos autores como Contreras (1990), Lewis (1994, 1998), Hawkins (1996), Simpson & Miao (1997) y Simpson (1998, 1999).

Estudio molecular– Se extrajo el ADN mediante minipreps utilizando una modificación del método de Doyle y Doyle (1987). Se amplificaron cuatro regiones de plastidio; el intron

trnL y los espaciadores *trnL-F* (Taberlet et al. 1991), *psbA-trnH* (Hamilton 1999) y *accD-psaI* (Mendenhall 1994) Los programas de amplificación pueden verse en el Apéndice II. Los productos de PCR fueron purificados utilizando columnas de sílica QIAquick. Los productos limpios fueron secuenciados en un secuenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems). Las secuencias individuales se editaron y empalmaron utilizando el programa Sequencher 4.1 (Gene Codes, Corp.). Una vez empalmadas se alinearon a ojo directamente en PAUP (Swofford 2001) siguiendo el método de Kelchner (2000).

Análisis filogenético. Los análisis se realizaron con el programa PAUP 4.0b8 (Swofford 2001) bajo el criterio de parsimonia. Empleamos búsquedas heurísticas con 3000 adiciones al azar y la opción TBR branch-swapping (*Tree bisection reconnection*).

odos los análisis filogenéticos se hicieron con PAUP. Todos los caracteres y caracteres de estado tenían el mismo peso fueron tratados como no ordenados. Se empleó un análisis bootstrap con 1000 réplicas para evaluar el soporte por rama. Los análisis se realizaron para cada región y con la combinación de ellas. Todos los caracteres tuvieron el mismo peso y se dejaron sin ordenar y se corrieron no-aditivamente.

Dado que las extracciones de ADN se realizaron de ejemplares de herbario, las amplificaciones y secuencias de las siguientes muestras no fueron posibles: para *trnL* y *trnL-F*; *Caesalpinia exostemma* subsp. *tampicoana*, *C. laxa*, *C. standleyi*, *Cercidium floridum* y *Poincianella robinsoniana*. En el caso de *accD-psaI*; *C. bonduc*, *C. exostemma* subsp. *tampicoana*, *C. gaumeri*, *C. laxa*, *C. sclerocarpa*, *C. standleyi*, *C. yucatanensis*, *Cercidium floridum*, *C. praecox*, *Hoffmannseggia glauca*, *Parkinsonia aculeata*, y *Poincianella robinsoniana*. Para la región *psbA-trnH*; *C. exostemma* subsp. *tampicoana*, *C. gaumeri*, *C. laxa*, *C. standleyi*, *Cercidium floridum*, *C. praecox* y *Poincianella robinsoniana*.

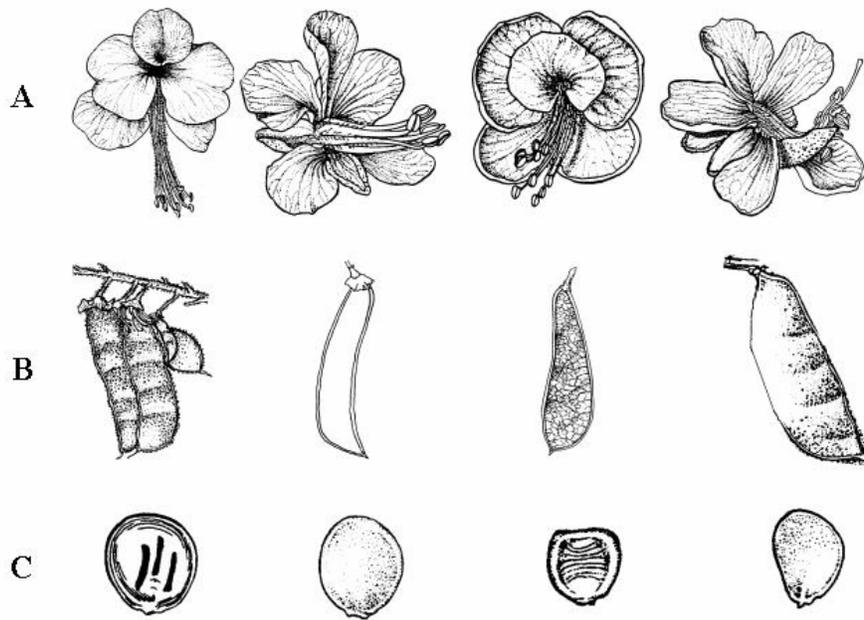


Figura 2.1 Diversidad floral, de frutos y semillas en el grupo *Poincianella* (modificado de Lewis 1998). De izquierda a derecha: A: *Caesalpinia coccinea*, *C. pannosa*, *C. acapulcensis*, *C. phyllanthoides*; B: *C. acapulcensis*, *C. coccinea*, *C. gaumeri*, *C. mexicana*; y C: *C. hughesii*, *C. melanadenia*, *C. nelsonii*, *C. pannosa*.

Cuadro 2.2 Especies incluidas en los análisis.

Especies, subespecies o variedades
Poincianella
<i>Caesalpinia acapulcensis</i> Standley
<i>C. caladenia</i> Standley
<i>C. coccinea</i> Lewis & Contreras
<i>C. epifanioi</i> Contreras
<i>C. eriostachys</i> Benth
<i>C. exostemma</i> Puebla sensu Contreras & Sotuyo
<i>C. exostemma</i> subsp. <i>exostemma</i> Lewis
<i>C. exostemma</i> subsp. <i>tampicoana</i> (Britton & Rose) Lewis
<i>C. gaumeri</i> Greenman
<i>C. hintonii</i> (Cuenca alta) sensu Contreras
<i>C. hintonii</i> (Tipo) Sandwith
<i>C. hintonii</i> (Infiernillo) sensu Contreras
<i>C. hughesii</i> Lewis
<i>C. laxa</i> Benth
<i>C. macvaughii</i> Contreras & Lewis
<i>C. melanadenia</i> (Rose) Standley
<i>C. mexicana</i> Gray
<i>C. nelsonii</i> (Britton & Rose) Contreras
<i>C. pannosa</i> Brandegee
<i>C. palmeri</i> Wats
<i>C. placida</i> Brandegee
<i>C. phyllanthoides</i> Standley
<i>C. standleyi</i> (britton & Rose) Standley
<i>C. yucatanensis</i> Greenman
<i>Poincianella robinsoniana</i> (Britton & Rose) Lewis
Guilandina
<i>C. bonduc</i> (Linné) Roxburgh
Libidibia
<i>C. sclerocarpa</i> Standley
Russellodendron
<i>C. cacalaco</i> Humboldt & Bondplant
Caesalpinia sensu stricto
<i>C. pulcherrima</i> (Linné) Swartz
Erythrostemon
<i>C. gilliesii</i> (Hook.) Dietr.
Hoffmannseggia sensu stricto
<i>Hoffmannseggia glauca</i> (Ortega) Eifert
<i>Hoffmannseggia humilis</i> (M. Martens & Galeotti) Hemsl
Pomaria sensu stricto
<i>Pomaria glandulosa</i> Cav.
Grupo externo
<i>Cercidium floridum</i> Benth. ex Gray
<i>Cercidium praecox</i> (Ruiz & Pavón) Harms
<i>Parkinsonia aculeata</i> L.

Cuadro 2.3 Matriz de datos morfológica para *Caesalpinia*, *Pomaria*, *Hoffmannseggia* y *Parkinsonia*.

<i>Taxon</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
<i>Caesalpinia acapulcensis</i>	2	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>C. bonduc</i>	3	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0,3	0
<i>C. cacalaco</i>	2	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1
<i>C. caladenia</i>	2	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	2	1	1	0	0	0	1	0	0	0,1	3	0
<i>C. coccinea</i>	2	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	2	1	0	0	0	0	0
<i>C. epifanioi</i>	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0,3	0
<i>C. eriostachys</i>	2	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1,2	0
<i>C. exostemma exostemma</i>	2	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	3	0
<i>C. exostemma Puebla</i>	2	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>C. exostemma tampicoana</i>	2	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>C. gaumeri</i>	2	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	2	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>C. gilliesii</i>	2	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	2	1	0	0	0	0	1
<i>C. hintonii Cuenca alta</i>	2	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	2	1	0	0	0	3	0
<i>C. hintonii Infiernillo</i>	2	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	3	1	1	0	0	3	1	0	0	0	3	0
<i>C. hintonii tipo</i>	2	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	3	0
<i>C. hughesii</i>	2	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>C. laxa</i>	2	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>C. macvaughii</i>	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>C. melanadenia</i>	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	2	1	0	0	1	1	0
<i>C. mexicana</i>	2	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	2	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>C. nelsonii</i>	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	3	0
<i>C. palmeri</i>	2	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>C. pannosa</i>	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1,3	1
<i>C. phyllanthoides</i>	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	3	0
<i>C. pucherrima</i>	2	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>C. sclerocarpa</i>	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>C. standleyii</i>	2	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<i>C. yucatanensis</i>	2	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0
<i>Cercidium floridum</i>	2	0	1	0	1	0	1	0	?	?	1	0	?	1	0	0	0	1	0	0	?	1	0	0	0	1	0	2	1	0	1
<i>C. praecox</i>	2	0	1	0	1	0	1	0	?	?	1	0	?	1	0	1	0	1	0	0	?	1	0	1	0	1	0	2	1	0	1
<i>Hoffmannseggia glauca</i>	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	2	0	2	0	1	0	0	1	1	1	2	0
<i>H. humilis</i>	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	2	0	1	0	0	1	1	?	2	1
<i>Parkinsonia aculeata</i>	2	0	0	0	1	0	1	1	?	?	1	0	?	1	0	0	0	1	0	0	?	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0
<i>Poincianella robinsoniana</i>	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	?	1	2	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	?	0	0	0
<i>Pomaria glandulosa</i>	1	1	1	1	0	0	1	?	1	0	1	2	1	1	0	0	2	1	1	0	0	2	0	0	0	1	0	?	1	0	?

Continuación Cuadro 2.3

Taxon	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	
<i>Caesalpinia acapulcensis</i>	0	0	1	2	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	?	0	1	2	?	0	0	?	1	0	0	
<i>C. bonduc</i>	1	0	1	1	?	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0	3	0	3	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	
<i>C. cacalaco</i>	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	0	0	0	1	0	0	0	2	1	1	0	
<i>C. caladenia</i>	1	0	1	2	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	3	2
<i>C. coccinea</i>	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	2	1	1	0	0	1	3	0	
<i>C. epifanioi</i>	3	1	1	2	?	3	2	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	2	0	1	1	0	1	2	1	0	0	0	1	0	0	
<i>C. eriostachys</i>	1	0	0	3	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	3	1	0	1	2	1	0	0	1	1	3	2	
<i>C. exostemma exostemma</i>	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	2	1	1	1	0	1	1	0	
<i>C. exostemma Puebla</i>	1	1	0	2	1	1	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	2	1	0	0	1	0	1	0	
<i>C. exostemma tampicoana</i>	1	1	0	?	?	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	2	1	0	0	0	1	1	0	
<i>C. gaumeri</i>	2	1	0	0	0	0	?	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	?	0	1	2	1	0	0	0	1	0	0	
<i>C. gilliesii</i>	1	0	2	?	?	0	?	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	?	1	1	2	1	0	0	0	1	0	0	
<i>C. hintonii Cuenca alta</i>	1	0	1	2	1	3	2	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	2	1	0	0	0	1	0	2	
<i>C. hintonii Infiernillo</i>	1	0	1	2	1	3	2	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0,1	1	0	1	1	0	1	2	1	0	0	0	1	0	2	
<i>C. hintonii tipo</i>	1	0	1	2	1	3	2	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0,1	0	0	1	1	0	1	2	1	0	0	0	1	0	2	
<i>C. hughesii</i>	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0,1	0	0	1	1	0	1	2	0	0	0	1	1	1	0	
<i>C. laxa</i>	2	0	0	0	2	3	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	2	1	0	0	0	1	0	0	
<i>C. macvaughii</i>	3	1	1	0	0	3	2	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	2	1	0	0	0	1	0	0	
<i>C. melanadenia</i>	3	0	1	3	1	0	2	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	2	0	1	1	0	1	2	1	0	0	0	1	0	0	
<i>C. mexicana</i>	1	1	1	3	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	2	1	0	1	1	1	1	2	0	1	0	0	1	0	2	
<i>C. nelsonii</i>	1	1	1	2	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	2	0	0	1	0	1	3	0	
<i>C. palmeri</i>	1	1	0	3	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	?	0	1	2	0	0	0	0	1	0	0	
<i>C. pannosa</i>	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	2	0	0	0	0	1	1	0	
<i>C. phyllanthoides</i>	1	0	2	3	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	?	?	0	1	2	0	0	0	0	1	0	0	
<i>C. pucherrima</i>	1	0	1	?	?	0	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	2	0	0	0	0	1	1	0	
<i>C. sclerocarpa</i>	1	0	1	?	?	0	2	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	1	1	?	1	
<i>C. standleyii</i>	1	0	1	?	?	0	?	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	2	1	0	0	0	1	?	0	
<i>C. yucatanensis</i>	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	?	0	0	1	0	0	1	0	2	0	1	1	0	1	2	1	0	0	0	0	1	0	
<i>Cercidium floridum</i>	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	3	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>C. praecox</i>	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	3	0	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Hoffmannseggia glauca</i>	1	1	1	0	0	2	0	1	1	?	?	0	0	0	1	0	0	2	3	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	
<i>H. humilis</i>	1	0	1	0	0	?	0	1	1	?	?	?	0	0	1	0	0	2	3	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	
<i>Parkinsonia aculeata</i>	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	?	0	0	3	2	1	1	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
<i>Poincianella robinsoniana</i>	1	0	0	1	1	?	0	1	?	?	?	0	?	?	?	?	?	1	?	?	0	?	?	?	?	?	?	?	0	0	0	1	0	0
<i>Pomaria glandulosa</i>	1	1	1	0	0	0	0	1	?	?	?	0	0	0	0	2	?	1	0	?	0	0	0	0	?	?	?	0	0	0	1	0	0	

Resultados

Datos morfológicos- De los ejemplares herborizados, recolectados en campo e invernadero así como de la bibliografía se obtuvo una matriz preliminar de 80 caracteres, de los cuales sólo 63 fueron variables y por lo tanto analizados (Cuadro 2.3). De ellos, 16 caracteres comprendían corteza, tallos, hojas etcétera; 29 correspondientes a partes florales, 9 de frutos, 1 de raíz y 12 de semillas. Cabe destacar que estos últimos no habían sido utilizados con anterioridad y que el carácter 59 (hombro en la semilla) había sido mencionado por Simpson (1999) como sinapomorfia para el género *Hoffmannseggia*, pero fue detectado por el análisis morfológico como plesiomórfico. La matriz generada con estos datos se muestra en el Cuadro 2.3.

Argumentación de caracteres. Los caracteres morfológicos del género *Caesalpinia* son sumamente variables y no se han estudiado todas las estructuras de manera completa. Los trabajos que han estudiado caracteres morfológicos para este grupo han sido los de Contreras (1990), Lewis (1994, 1998), Simpson (1999) y Chapill (2000). Las observaciones que se hacen a continuación resumen de manera general la morfología del género.

Hábito- La mayoría de las especies del grupo son árboles o arbustos caducifolios que se desarrollan generalmente en etapas sucesionales tempranas de selvas bajas caducifolias, excepto para *C. laxa* y *C. nelsonii* que generalmente son arbustos pequeños. Las especies de *Hoffmannseggia* son hierbas y *C. bonduc* tiende a ser trepadora.

Corteza- En su mayoría, las especies presentan cortezas que van del gris-pruinoso hasta el café o castaño oscuro, pueden ser exfoliantes o fisuradas. En *C. sclerocarpa* la corteza es verde con manchas grises, que le da un aspecto particular, diferenciándola de las demás especies. En *Cercidium-Parkinsonia* el tronco y ramas son verdes fotosintéticas. Por otro lado se puede observar que la corteza de algunas de las especies como *C. hintonii* presentan

suber en la superficie. Las especies *C. bonduc*, *C. pulcherrima* y *C. cacalaco*, poseen aguijones en el tronco y ramas, el resto de las especies son inermes.

Hojas- Son bipinnadas, terminando en una pinna o en dos pinnas. En ocasiones una pina del par no se desarrolla dando la apariencia de terminar en una pinna. Las estípulas son pequeñas e inconspicuas, desprendiéndose en cuanto se inicia el desarrollo de la hoja; únicamente en *C. bonduc* las estípulas son persistentes. Los foliolos son variables y de acuerdo a la edad varían en cuanto a la forma, textura e indumento. Las texturas van de membranosas, subcartáceas a cartáceas y coriáceas (*C. cacalaco*). En el grupo Poincianella y en algunas especies de otros grupos es común la presencia de puntos glandulares negros en la superficie abaxial de la lámina o en el margen de los foliolos. Las pinnas son opuestas y presentan algunos tricomas glandulares sobre el raquis de la hoja a la altura de su inserción. Con excepción de *C. pulcherrima*, las pinnas carecen de estipelas; los foliolos son peciolulados, generalmente opuestos, o algunos alternos sobre las pinnas, o la mayoría alternos como en *C. eriostachys*; generalmente poseen tricomas glandulares a la altura de su inserción, muy desarrollados y setosos en *C. pulcherrima*. La venación secundaria puede ser o no visible a simple vista, cuando lo es, siempre es de tipo braquidodromo.

Flores- Las flores se agregan en racimos axilares o terminales, en ocasiones en panículas; poseen brácteas con frecuencia de tipo escarioso, tempranamente deciduas, pedicelos articulados (ejes de 2° y 3° orden) con la porción estrecha del hipantio que simula una prolongación del pedicelo; las flores por lo común son grandes y vistosas con corolas amarillas (*C. pannosa*) a rojas (*C. coccinea*), de cinco pétalos de prefloración imbricada, unguiculados, subiguales o desiguales; un par de abaxiales obovados, un par de laterales más amplios y usualmente más o menos conduplicados; la uña, la lámina y el dorso de los pétalos generalmente poseen tricomas glandulares que varían en cuanto a forma y

disposición; existen, además, tricomas no glandulares que se distribuyen en el margen, dorso o en la unión de la uña con la lámina del pétalo.

Las flores pueden disponerse en posición ascendente, adpreso-descendente (*C. exostemma*, Puebla) observándose claramente como se dobla el pedicelo a partir del eje de tercer orden, o bien disponerse perpendicularmente al eje principal. Existen especies como *C. hintonii* cuyas flores se resupinan por torsión del pedicelo cuando la inflorescencia pende por ser muy grande.

Las brácteas son variables en la forma, textura e indumento, se desprenden antes de que el botón madure; en *C. bonduc* las brácteas persisten hasta la antesis; normalmente son erectas o con los ápices inflexos, o notablemente ecurrosas en *C. macvaughii*.

Fruto- Es una de las estructuras más variables no sólo dentro del género sino dentro de la familia y tradicionalmente se ha usado para separar secciones o géneros. Se debe valorar correctamente dicha estructura pues puede reflejar convergencia en los mecanismos de dispersión más que relaciones de parentesco. En la mayoría de las especies el fruto es elásticamente dehiscente, las valvas se tuercen en espiral después de haber arrojado las semillas. En *C. bonduc* el fruto es dehiscente a lo largo de la sutura opuesta al hilo o bien indehiscente. En el grupo *Libidibia* es indehiscente. Las valvas de los frutos en los diferentes grupos son planas o algo turgentes, rectas, curvadas o falcadas (grupos *Poinciana* y *Poincianella*) de textura coriácea, cartácea o subleñosa. El indumento es variable, presentándose tricomas simples, glandulares o ambos, también hay especies que no presentan tricomas. Otro carácter que puede observarse fácilmente es la presencia de septos en el fruto; *C. cacalaco* presenta septos entre las semillas a manera de cuentas mientras que en *C. hintonii* y *C. hughesii* no se observan septos entre las semillas.

Cuadro 2.3 Caracteres con sus caracteres de estado usados en el estudio morfológico de *Poincianella* y alianzas.

- 1) Hábito: (0) = hierba (1) = arbusto (2) = árbol (3) = trepadora
- 2) Coloración de la corteza: (0) = verde (1) = negra, café o gris
- 3) Apariencia de la corteza: (0)=suberosa (1)= no suberosa
- 4) Armadura del tallo: (0) = con espinas (1) = sin espinas
- 5) Glándulas en las ramas: (0) = presentes (1) = ausentes
- 6) Indumento del tallo: (0) = glabro (1) = pubescente
- 7) Braquiblastos: (0)= presentes (1)= ausentes
- 8) Persistencia de estípulas: (0)= caducas, dejando cicatriz (1)= persistentes (2)= caducas tempranamente no dejando cicatriz
- 9) Pinnación de las hojas: (0)= una vez pinnadas (1)= bipinnadas
- 10) Posición de los folíolos: (0)= opuestos (1)= alternos
- 11) Peciolulo en los folíolos: (0)= ausente (sésiles) (1)= presente
- 12) Folíolo en la pinna terminal: (0)= presente (imparipinnada) (1)= ausente (paripinnada)
- 13) Coloración de los folíolos: (0) = fuertemente descolorados con la superficie adaxial lustrosa (1) = débilmente descolorados o no descolorados, superficie adaxial o abaxial opaca
- 14) Visibilidad de la venación secundaria: (0) = no conspicua (1) = conspicua
- 15) Idioblastos subepidérmicos: (0) = presentes (1) = ausentes
- 16) Idioblastos traqueoidales: (0)= presentes (1) = ausentes
- 17) Posición de la inflorescencia: (0) = terminal erecta (1) = terminal péndula (2) = lateral
- 18) Tipo de inflorescencia: (0)= racimos (1)= panículos
- 19) Segmentación del pedicelo floral: (0) = eje de 1°, 2° y 3° orden conspicuos (aparición de segmentación) (1) = ejes de 1°, 2° y 3° orden no conspicuos (aparición de falta de segmentación)
- 20) Posición de las flores con respecto al raquis: (0) = adpreso-ascendentes (1)= adpreso-descendentes (2)= perpendiculares (3)= resupinadas por torción del pedicelo al pender
- 21) Persistencia de brácteas post-antesis: (0)= persistentes (1)= no persistentes
- 22) Aestivación de los sépalos: (0) = cuculados (1) = con imbricación simple (2)= valvados
- 23) Longitud relativa de los sépalos: (0) = desigual (1) = igual
- 24) Margen del sépalo abaxial: (0) = ribeteado (1) = no ribeteado
- 25) Tricomas en los sépalos: (0) = ausentes (1) = presentes
- 26) Tricomas glandulares en el dorso de los sépalos: (0) = ausentes (1) = negras planas, cónicas, rojas no pediceladas (2) = dendrocíticos (3)= pedicelados rojos
- 27) Color de los sépalos: (0)= amarillo (1)= anaranjado (2)= rojo
- 28) Sépalos en botón floral: (0) = fuertemente imbricados (1) = débilmente imbricados o valvados
- 29) Persistencia de los sépalos post-antesis: (0) = dehiscente formando un aro alrededor de la base del fruto (1) = persistente (2) = dehiscente formando un doble aro
- 30) Tipo de pétalos: (0) = heteromórficos (1) = homomórficos
- 31) Forma del pétalo estandarte: (0)= obovado (1)= elíptico (2)= ovado (3)= triangular
- 32) Mácula en el pétalo estandarte (espectro visible): (0)= ausente (1)= presente
- 33) Uña del pétalo estandarte: (0) = con una uña larga y estrecha (1) = con uña corta y ancha (2) = sin uña o no notoria dadas sus dimensiones
- 34) Margen de la uña del pétalo estandarte: (0)= glabro (1)= con tricomas glandulares
- 35) Base de la lámina del pétalo estandarte (hasta la unión con la uña): (0) glabro (1)= pubescente (2)= con glándulas
- 36) Presentación del pétalo estandarte en antesis: (0)= con el borde apical doblado hacia atrás (1)= con el borde apical doblado hacia delante (2)= rodeando a los estambres (3)= recto
- 37) Color de la corola: (0) = amarilla (1) = amarillo anaranjado (2) = roja escarlata (3) = rosa salmón

- 38) Tamaño del estambre: (0) = más largo que los pétalos (1) = igual o más corto que los pétalos
- 39) Posición de los estambres: (0) = incluidas en el sépalo abaxial (1) = no incluidas en el sépalo abaxial
- 40) Forma de los estambres: (0) = arqueado (1) = recto
- 41) Color de los tricomas en el filamento: (0) = blanco (1) = pigmentado (2) = ausente
- 42) Tricomas glandulares a lo largo del estilo: (0)= presentes (1)=ausentes
- 43) Tricomas glandulares a lo largo del estilo: (0)= presentes (1)= ausentes
- 44) Estigma: (0)= terminal (1)= subterminal
- 45) Margen de la cámara estigmática: (0)= con flecos (1)= con flecos formando un túnel (2)= crateriforme (3)= tubular, sin flecos (4)= bulbosa con flecos
- 46) Forma del fruto: (0) = mayoritariamente rectangular (1) = falcado (2) = orbicular
- 47) Ancho del fruto en su parte media: (0) = estrecho (1) = amplio
- 48) Apariencia del fruto: (0) = sin marcas entre las semillas (1) = con indentaciones entre las semillas (2) = lomento
- 49) Indumento del margen del fruto: (0) = simple (1) = contrasta con la pubescencia (2) = contrastante pero glabro (3) = todo con glándulas pediceladas
- 50) Margen del fruto: (0) = con borde conspicuo (1) = con borde no conspicuo
- 51) Posición del fruto con respecto al raquis: (0)= adpreso-ascendentes (1)= adpreso-descendentes
- 52) Dehiscencia del fruto: (0) = elásticamente dehiscentes (1)= elásticamente no dehiscentes (2)= explosivo (3)= indehiscente
- 53) Tricomas glandulares en las valvas del fruto: (0) = ausentes (1) = no pediceladas (2)= pediceladas (3) = grandes multicelulares
- 54) Indumento de las valvas: (0) = con tricomas simples (1) = tricomas estrellados (2) = pubescente (3) = glabro
- 55) Estructuras radicemíferas-tuberíferas: (0)= ausentes (1)= presentes
- 56) Forma de la semilla: (0)=lentibular (1)= obovada (2)= orbicular (3)= ovada
- 57) Testa de la semilla: (0)= opaca (1)= brillante
- 58) Coloración de la testa: (0)= monocromática (1)= di-policromática, con estrías o motas en otro color
- 59) Hombro en la semilla: (0)= ausente (1)= presente
- 60) Líneas de fractura en la testa: (0)= concéntricas (1)= reticuladas
- 61) Posición del hilo: (0)= apical (1)= subapical
- 62) Plano de posición del hilum: (0)= perpendicular al margen de la semilla (1)= oblicuo
- 63) Espacio hilo micrópilo: (0)= en una misma área (1)= en áreas claramente diferentes
- 64) Forma del micrópilo: (0)= circular (puntual) (1)= triangular (2)= triangular truncada (paralelepípedo)
- 65) Elevación del micrópilo: (0)= plano (1)= protuberante, a manera de montículo
- 66) Mácula alrededor del hilum: (0)= ausente (1)=todo alrededor, formando un círculo (2)= lateral (3)= superior
- 67) Rafe: (0)= ausente (1)=sólo en la base (2)= en la base, prolongándose hacia un costado de la semilla a manera de cauda.

Semillas- Las semillas poseen testa dura opaca o brillante con líneas de fractura concéntricas, reticuladas o bien no presentarse. Carecen de pleurograma, su coloración normalmente es monocromática, aunque existen especies con estrías o motas en color diferente a la testa (*C. coccinea*). En las especies del grupo Guilandina las semillas son esferoidales, en el resto son planas y de forma variable. Las semillas poseen una protuberancia en donde se encuentra el hilo y el micropilo a lo que Simpson (1999) denomina "shoulder" u hombro. En todas las semillas el funículo es delgado, el hilo es puntiforme, el embrión recto y los cotiledones bien desarrollados. El hilo puede ser apical o subapical, encontrándose con el micropilo en una sola cavidad o en dos diferentes; la forma del micropilo puede variar de circular a triangular truncada, puede ser protuberante o no; éste, además, varía en el plano de disposición pudiendo encontrarse paralelo al margen de la semilla o bien oblicuo. En algunas especies se presenta una mácula de color rojizo alrededor del hilo, a los costados del mismo o sólo en su parte superior. El rafe puede observarse en algunas especies ya sea sólo en la base o bien en la base, prolongándose por el margen de la semilla a manera de cauda.

Raíz- En el caso de *Hoffmannseggia*, en las raíces se forman una especie de pequeñas protuberancias a las que Ulibarri (1979) denomina rizomas (estructuras radicigérmicas tuberíferas).

Filogenia morfológica. El análisis dio como resultado árboles de 231 pasos de longitud, con los siguientes valores de CI=0.46 y RI=0.58. Este árbol resuelve cinco clados (Fig. 2.2), el clado A forma una politomía no resuelta (70% bootstrap) entre *C. acapulcensis*, *C. standelyii* (Poincianella), *C. gilliesii* (Erythrostemon), *C. coccinea*, *C. eriostachys*, *C. gaumeri* y *C. laxa* (Poincianella). El clado B está formado por el complejo *C. hintonii* (100%). El clado C contiene cuatro taxa: *C. bonduc* (Guilandina), *C. cacalaco*

(Russellodendron), *C. sclerocarpa* (Libidibia) y *C. hughesii* (Poincianella). Ambos clados forman una politomía con *C. caladenia*, *C. mexicana*, *C. nelsonii* y *C. phyllanthoides* (Poincianella). El clado D está formado por las subespecies de *C. exostemma* y *C. palmeri* (Poincianella). El análisis muestra que *Pomaria* y *Hoffmannseggia* son grupos hermanos de *Caesalpinia* (clado E).

Análisis con ADN de plastidio

trnL, *trnL-F*- el intron *trnL* y su espaciador flanqueante *trnL-F* tuvieron un tamaño final al alinearse de 1195 pb, de los cuales 75 fueron potencialmente informativos. El análisis de parsimonia resultó en 513 árboles igualmente parsimoniosos de 446 pasos (CI=0.7646, RI=0.734). El árbol de consenso estricto se muestra en la Figura 2.3. Existe un 98% de apoyo bootstrap para la monofilia de *Caesalpinia*. Se pueden apreciar cuatro clados, clado A formado por tres subclados, el primero con una politomía no resuelta de *C. acapulcensis*, *C. caladenia*, *C. exostemma* Puebla, *C. nelsonii*, *C. palmeri* y *C. coccinea* (Poincianella); el segundo formado por *C. exostemma* subsp. *exostemma* y *C. hughesii*, la rama subsiguiente forma el subclado formado por *C. mexicana*, *C. phyllanthoides* y *C. yucatanensis*. Todos ellos con un 76% de apoyo bootstrap. El clado B contiene al complejo *C. hintonii* (97% bootstrap), *C. pannosa* (65% bootstrap) y *C. placida*. Los clados son apoyados por un 99% de bootstrap. El clado C reúne a *C. bonduc* (Guilandina) y *C. pulcherrima* (*Caesalpinia sensu stricto*). Así mismo se encontró que *C. eriostachys* y *C. gaumeri* son especies hermanas (clado D, 96% bootstrap).

psbA-trnH- El alineamiento dio como resultado 607 sitios, 40 fueron informativos y el análisis de consenso estricto (Fig. 2.4) resultó en 299 árboles igualmente parsimoniosos (L=368, CI=0.750; RI=0.6984), en los cuales podemos distinguir al menos cinco clados.

Clado A incluye *C. exostemma* Puebla, *C. nelsonii*, *C. mexicana*, *C. phyllanthoides*, *C. yucatanensis*, *C. gilliesii* (Erythrostemon), *C. macvaughii*, *C. placida* y *C. pannosa*. El clado B comprende *C. acapulcensis*, *C. caladenia*, *C. palmeri*, *C. coccinea*, *C. exostemma* subsp. *exostemma* y *C. hughesii*. En el siguiente clado, C, con bajo apoyo bootstrap (52%) se encuentran dos de los morfos de *C. hintonii*. El clado D tiene un apoyo del 65% y esta formado por *C. epifanioi*, *C. hintonii* Cuenca alta y *C. melanadenia*. Finalmente, *C. bonduc* (Guilandina), *C. cacalaco* (Russellodendron) y *C. pulcherrima* (*Caesalpinia sensu stricto*) son grupos hermanos.

Matriz *AccD-psaI*- Para este grupo de datos solo se contó con 24 taxa, el alineamiento dio una longitud final de 873 pb, 52 fueron informativos; el análisis dio como resultado 800 árboles igualmente parsimoniosos con un largo de 277, CI= 0.844 y RI= 0.744. El árbol de consenso estricto (Fig. 2.5) muestra tres clados; el clado A incluye *C. cacalaco*, *C. eriostachys*, *C. pulcherrima* (*Caesalpinia sensu stricto*), *Hoffmannseggia humilis*, *Pomaria glandulosa*, *C. gilliesii* (Erythrostemon) y *C. placida*. El clado B contiene al complejo *C. hintonii* y a *C. pannosa*. El clado C cuenta con *C. mexicana* y *C. phyllanthoides* y tiene un apoyo bootstrap del 90%.

Análisis combinado caracteres moleculares- Dio como resultado 2679 árboles igualmente parsimoniosos (L=1241; CI= 0.672; RI= 0.572). El consenso muestra (Fig. 2.6) cuatro clados. El clado A formado por *Hoffmannseggia humilis*, *Pomaria glandulosa*, *C. cacalaco* (Russellodendron), *C. eriostachys*, *C. pulcherrima*, *C. exostemma* subsp. *exostemma* y *C. gilliesii*. El clado B comprende el complejo *C. hintonii* (76% bootstrap) y *C. pannosa*. El clado C incluye *C. mexicana* y *C. phyllanthoides* (80% bootstrap).

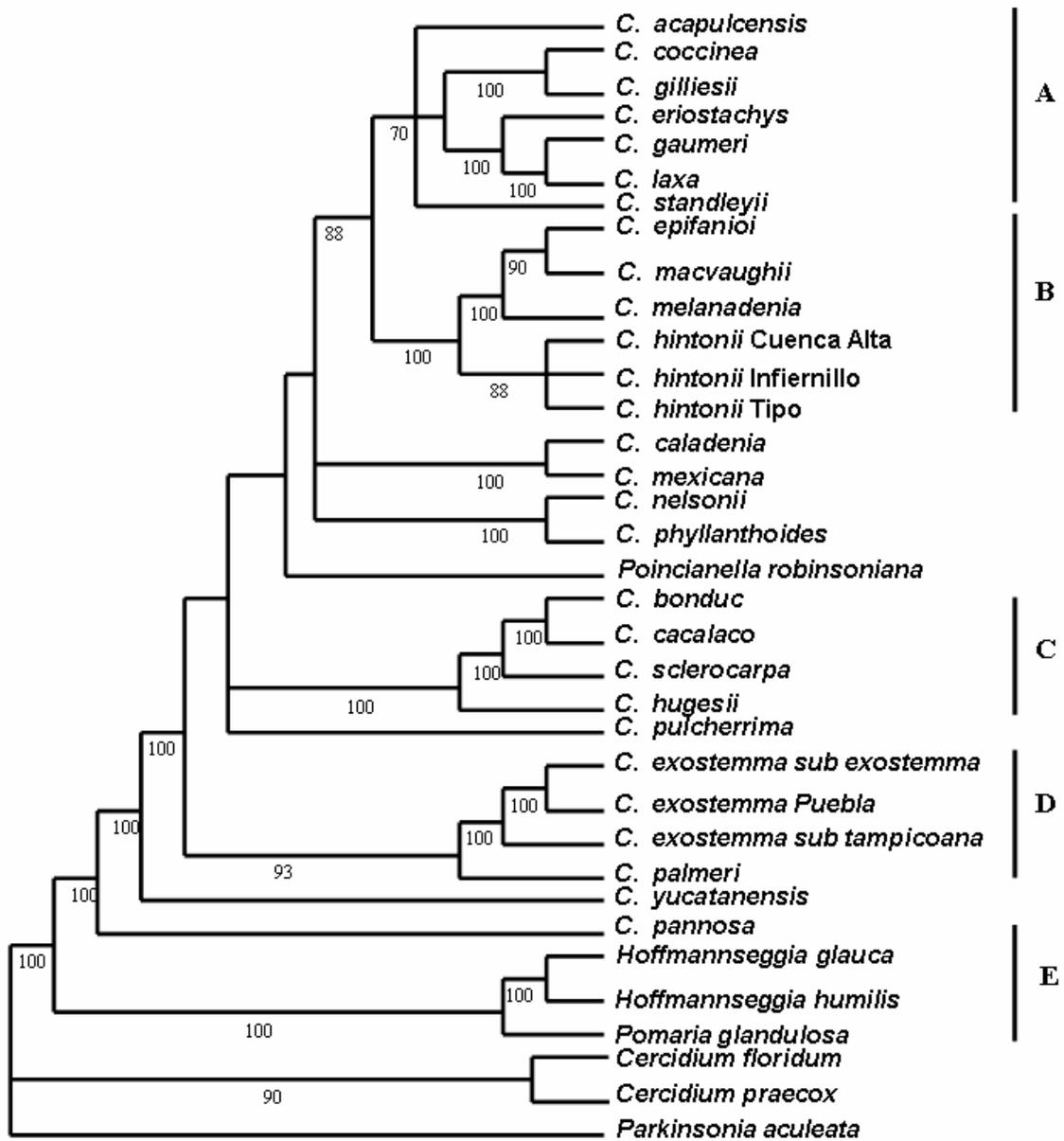


Figura 2.2 Árbol de consenso estricto con caracteres morfológicos para el grupo *Poincianella* de México.

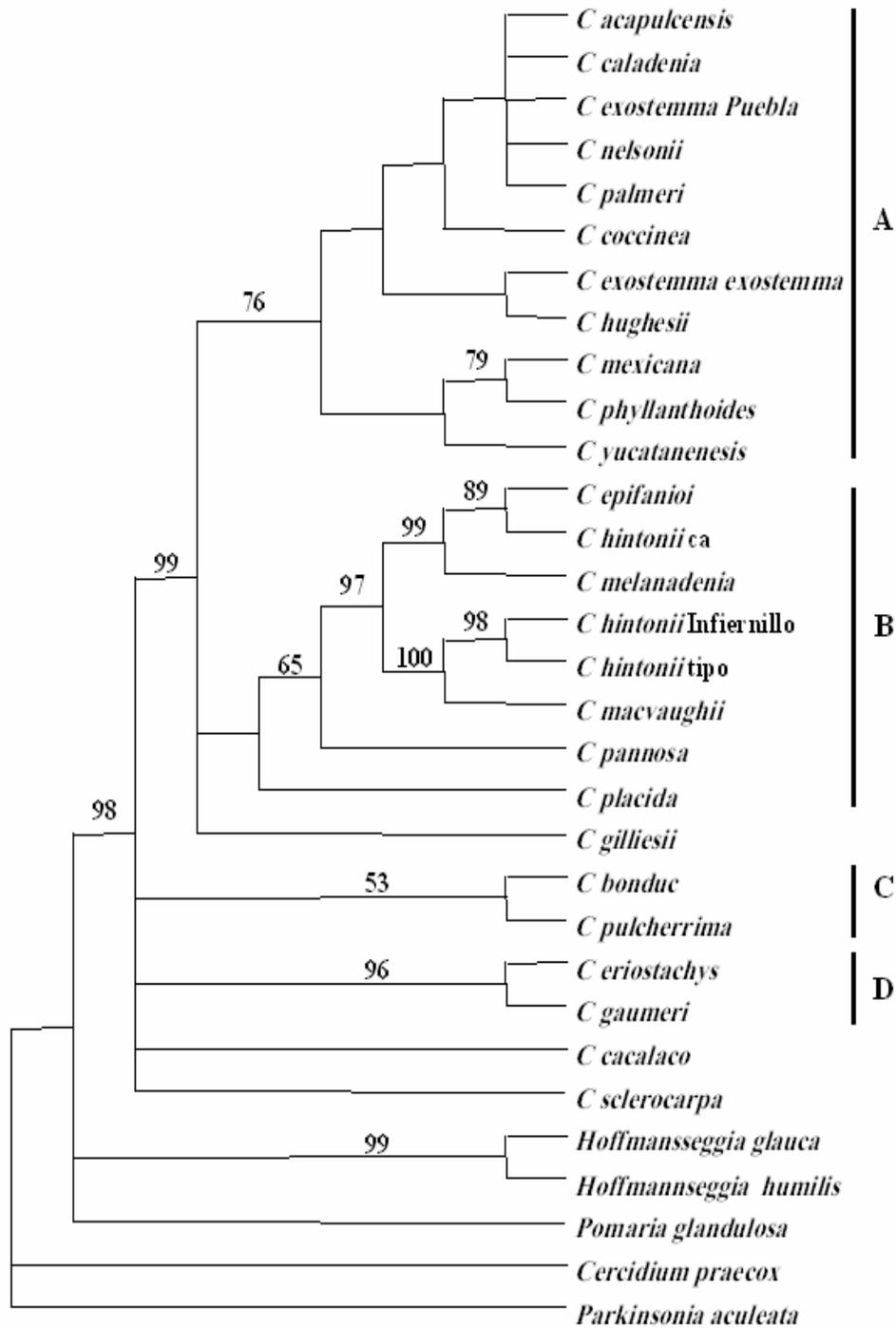


Figura 2.3 Árbol de consenso estricto con *trnL*, *trnL-F* para *Poincianella* de México.

Discusión

Morfología y caracteres moleculares- La naturaleza homoplásica de algunos caracteres morfológicos en *Caesalpinia* queda manifiesta nuevamente (Polhill & Vidal 1981; Lewis & Schrire 1994; Simpson 1999). En el presente trabajo se emplearon caracteres no considerados previamente (e.g., posición de flores y frutos, caracteres en semillas) y algunos otros como "arbustos pequeños" en hábito y "plantas con tricomas glandulares" se recodificaron en caractere y estados de caracter aparentemente homólogos a los usados en trabajos previos. Con este cambio en caracteres y más los que se adicionaron, algunos de los problemas de homoplasias pudieron desaparecer, pero aún el número de caracteres y caracteres de estado no son suficientes e indican que se requiere de un mayor conocimiento de diversas estructuras antes de poder afirmar que los los grupos fenéticos dentro de *Caesalpinia* son monofiléticos.

El análisis bootstrap para morfología indica buen apoyo sólo para algunos clados (100-88%). Lo anterior indica que muchas de las ramas del árbol filogenético no se apoyan en los datos existentes y que no son sólo el resultado de la combinación aleatoria de los 63 caracteres. El mismo análisis indica que al eliminar o agregar más caracteres (o especies) cambiarían nuestras conclusiones acerca de las relaciones filogenéticas.

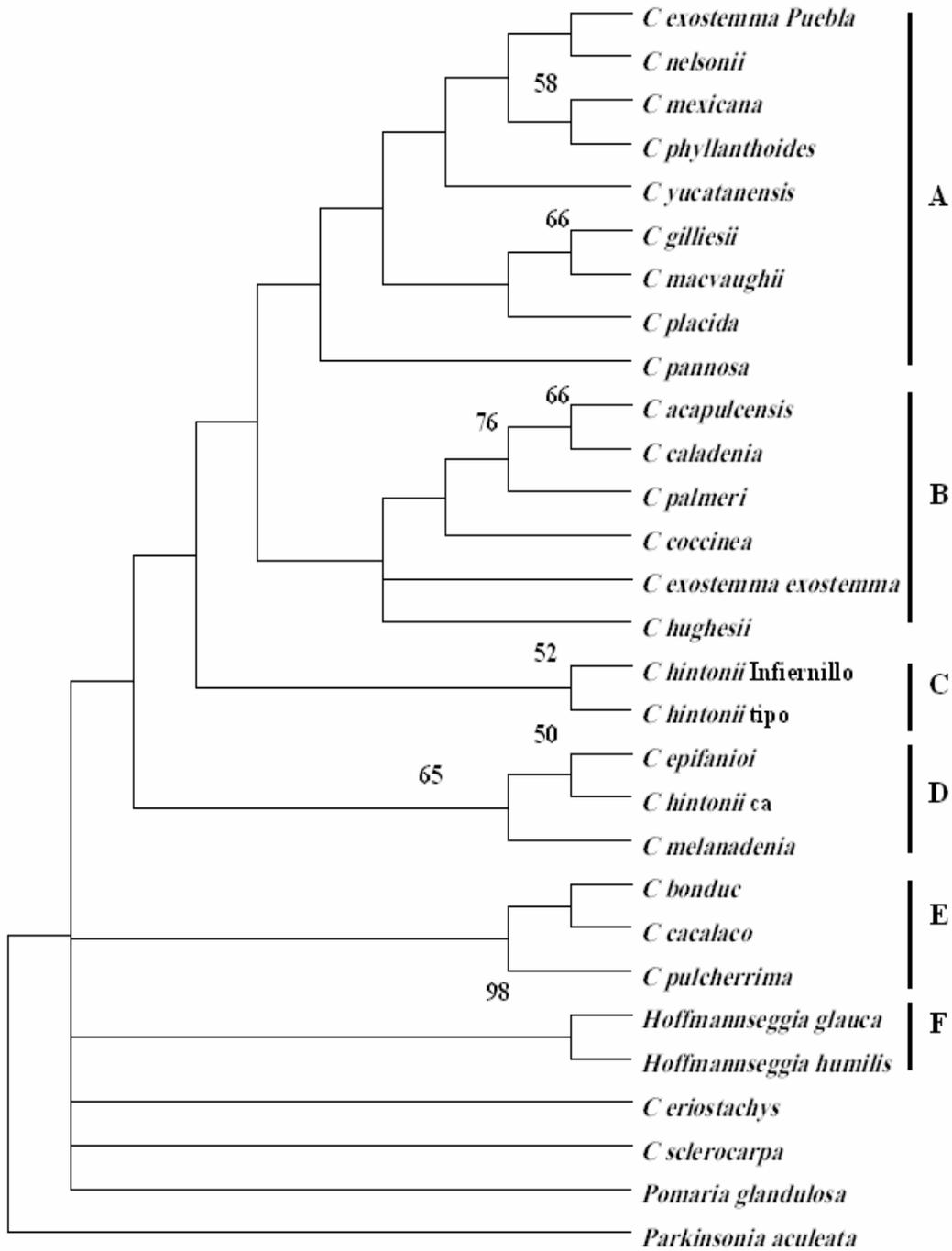


Figura 2.5 Árbol de consenso estricto con *psbA-trnH* para el grupo *Poincianella* de México. L=367, CI=0.752, RI=0.701, RC=0.527.

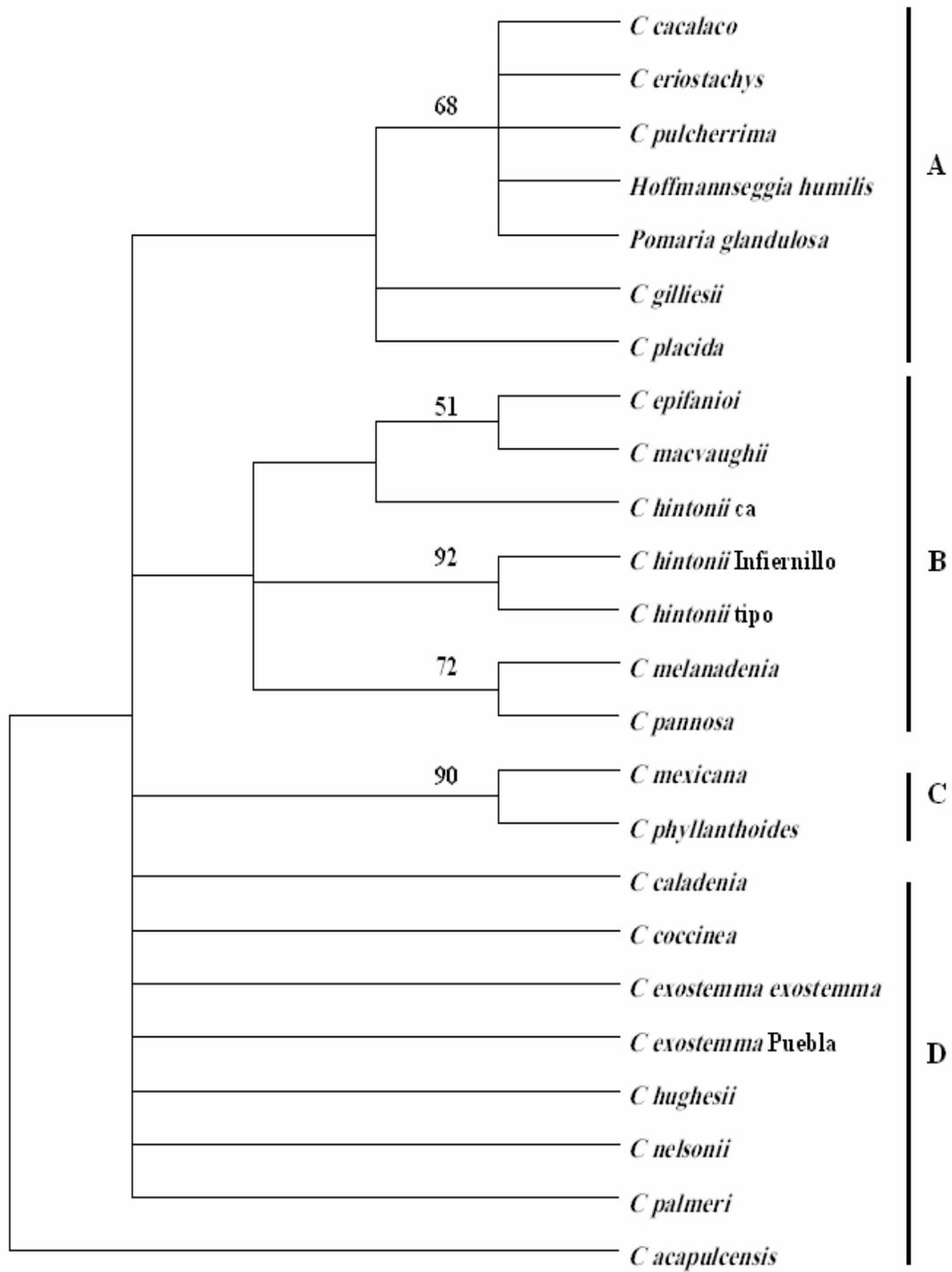


Figura 2.5 Árbol de consenso estricto con *accD-psaI* para el grupo *Poincianella* de México. L=263, CI=0.849, RI=0.712, RC=0.603.

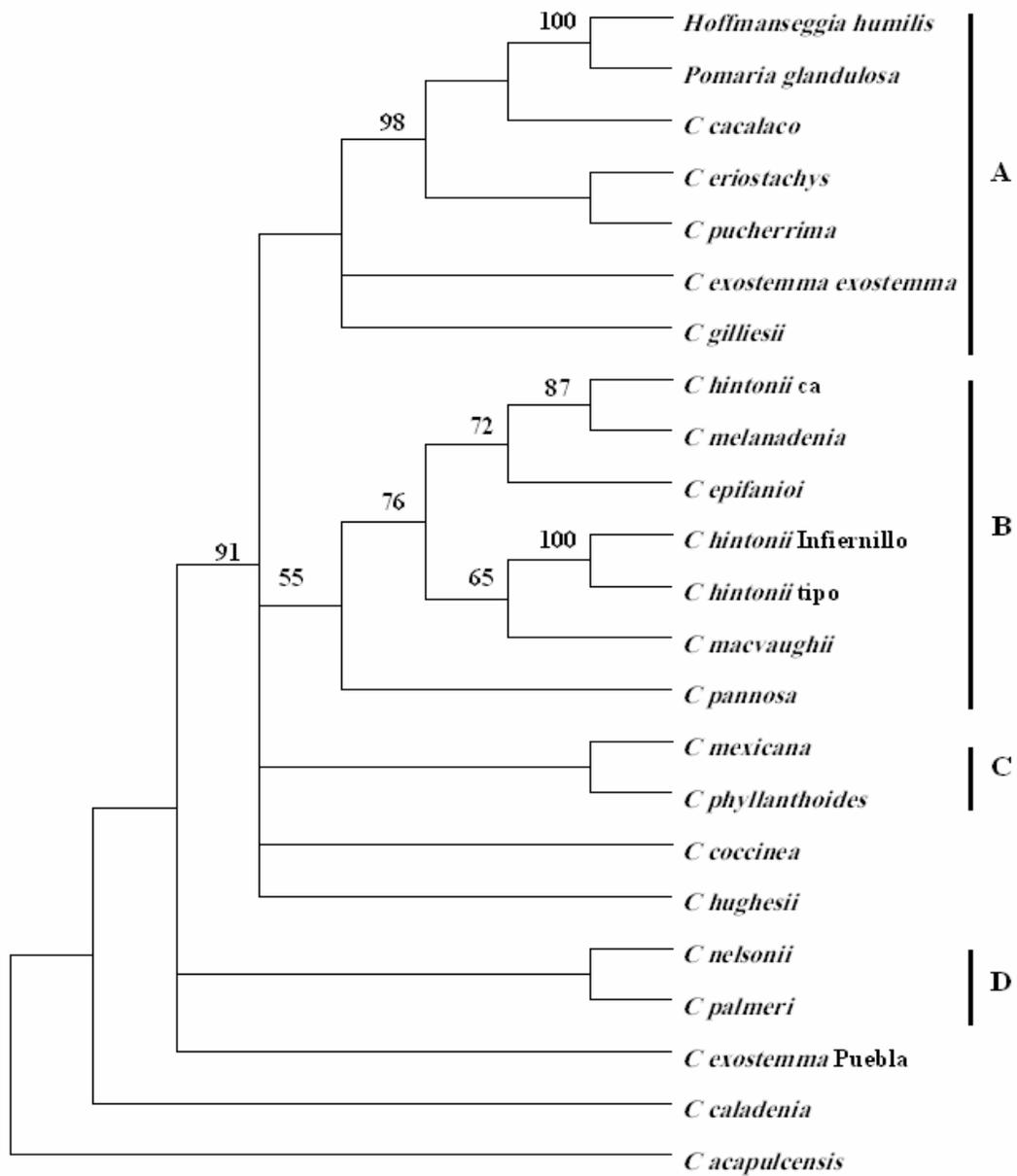


Figura 2.6 Árbol de consenso estricto del grupo *Poincianella* de México con cuatro regiones de plastidio L=1000, CI=0.701, RI=0.530, RC=0.372.

Complejos de especies y alianzas. Lewis (1998) estableció seis agrupaciones morfológicas en el grupo *Poincianella* de México; el primero conformado por *Caesalpinia nelsonii*, *C. mexicana*, *C. phyllanthoides*, *C. pannosa* y *Poincianella robinsoniana*. Estrechamente relacionado con el grupo formado por el complejo *C. standleyi*: *C. acapulcensis*, *C. caladenia*, *C. palmeri* y *C. standleyi*. El tercero de los complejos es el de *C. hintonii* constituido por *C. epifanioi*, *C. hintonii* (tres morfos sensu Contreras 1991), *C. laxa*, *C. macvaughii* y *C. melanadenia*. La cuarta alianza la forman *C. yucatanensis* y *C. nicaraguensis* de Centroamérica. La quinta alianza está representada por el complejo *C. exostemma* formado por *C. coccinea*, *C. hughesii* y *C. exostemma* con dos subespecies *C. exostemma* subsp. *exostemma* (costa del Pacífico) y *C. exostemma* subsp. *tampicoana* (Golfo de México). Recientemente Sotuyo y Contreras encontraron una población en el estado de Puebla, cuyas características morfológicas se ajustan a la descripción original de *C. exostemma*. Finalmente la sexta alianza está constituida por *C. eriostachys* y *C. pluviosa* var. *peltophoroides* de Brasil.

Considerando únicamente la morfología (Fig. 2.2), *C. exostemma* y sus subespecies forman un grupo monofilético, pero no encontramos que formaran la alianza propuesta por Lewis (1994, 1998). Si sólo consideramos los caracteres moleculares, de la alianza únicamente *C. exostemma* subsp. *exostemma* y *C. hughesii* son especies hermanas tal y como lo sugiere el trabajo de Simpson et al. (2003), aunque ellos no incluyeron a *C. exostemma* de Puebla dentro de su muestreo. Los datos moleculares sugieren contundentemente que *C. exostemma* de Puebla puede ser considerada como una especie diferente con morfología convergente y que deberán hacerse cambios taxonómicos a esas especies. La alianza tal como la propone Lewis (1998) es parafilética.

Las evidencias morfológica y molecular (Figs. 2.2 y 2.6) confirman que el complejo *C. hintonii* es un grupo monofilético (exceptuando *C. laxa*) como lo propusieron Contreras (1991), Lewis (1998) y Sotuyo et al. (2004) y que su grupo hermano es *C. pannosa*. La afinidad filogenética del complejo *C. hintonii* no es sorprendente dada la proximidad geográfica y su distribución en la misma provincia morfotectónica. Las relaciones entre los morfos de *C. hintonii* revelan que existe una nueva especie, las diferencias morfológicas (caracteres florales y de plántulas) son suficientes para circunscribir al menos una nueva especie (Sotuyo et al. 2001, Sotuyo et al. 2004, Sotuyo y Lewis 2007). Se incluye en el Apéndice II una clave taxonómica sencilla para reconocer a las especies del complejo. Las relaciones entre las otras especies de *Poincianella* y la validez de las alianzas propuestas por Lewis (1998) con los datos encontrados aún no están resueltas.

Conclusiones taxonómicas. Los árboles de genes muestran que el grupo *Poincianella*, como tradicionalmente lo circunscriben Polhill y Vidal (1981), es un grupo parafilético. Si todas las especies actualmente reconocidas dentro del grupo *Poincianella* se mantienen, se debe de reconocer un nuevo subgénero, aunque no podría apoyarse con el tamaño de muestra con el que actualmente se cuenta, es necesario incluir un mayor número de especies.

Russellodendron, *Libidibia*, *Poinciana* y *Guilandina* si son elementos de *Caesalpinia*. Los resultados anteriores son consistentes con las relaciones encontradas por Lewis (1994, 1998), Simpson y Miao (1999) y Simpson et al. (2003) entre subgéneros de *Caesalpinia*. Nuestros análisis no proveen una base firme para decidir si *Caesalpinia* comprende uno, dos o más géneros. Se necesita un mayor muestreo inter e intraespecífico para aclarar las relaciones filogenéticas dentro del género *Caesalpinia sensu lato* antes de que cualquier conclusión acerca del grupo sea formalizada. Es claro que todas las hipótesis filogenéticas obtenidas en el grupo son insuficientes para obtener una imagen global acerca

de las relaciones filogenéticas y que las relaciones entre las especies no serán esclarecidas hasta que un número mayor de especies sea incluido y analizado. Con lo anterior se delimitarían y describirían un alto número de especies que de alguna forma pueden ayudar a entender de manera más clara los procesos evolutivos que han actuado sobre las especies del género.

Literatura citada.

- Bentham G. 1865 Leguminosae; Swartzieae. En G. Bentham and J. D. Hooker. Eds. *Genera plantarum*. Reeve, London, UK. vol. 1, 434–600.
- Britton N., Rose, J. 1930: Caesapinoaceae.- *North American Flora* 23 (4): 318-341.
- Bruneau A, Forest F, Herendeen PS, Klitgaard BB, Lewis GP. 2001. Phylogenetic relationships in the Caesalpinioideae (Leguminosae) as inferred from chloroplast *trnL* intron sequences. *Systematic Botany* 26: 487-514.
- Cocucci AA., L. Galetto y A. Sérsic. 1992. El síndrome floral de *Caesalpinia gilliesii* (Fabaceae - Caesalpinioideae). *Darwiniana* (Argentina) 31 (1-4): 111-135.
- Contreras JL. 1991. *Contribución al conocimiento del género Caesalpinia (Leguminosae: Caesalpinioideae)* en el estado de Guerrero. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- De Candolle A. P. 1825 Leguminosae. En *Prodromus*, vol. 2, 93–524. Treutiel and Wurtz, Paris, France.
- Doyle J. J. 1995 DNA data and legume phylogeny: a progress report. In M. Crisp and J. J. Doyle [eds.], *Advances in legume systematics, part 7, Phylogeny*, 11–30. Royal Botanic Gardens, Kew, UK.
- Doyle J. J. J. A. Chappill C. D. Bailey T. Kajita 2000 Towards a comprehensive phylogeny of legumes: evidence from *rbcL* sequences and non-molecular data. In P. S. Herendeen and A. Bruneau [eds.], *Advances in legume systematics, vol. 9*, 151–163. Royal Botanic Gardens, Kew, UK

- Doyle J. J. J. L. Doyle J. A. Ballenger E. E. Dickson T. Kajita H. Ohashi 1997 A phylogeny of the chloroplast gene *rbcL* in the Leguminosae: taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation. *American Journal of Botany* 84: 541-554
- Doyle JJ, JL. Doyle. 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytology Bulletin* 19: 11-15.
- Hamilton MB. 1999. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology* 8: 521-523.
- Ibarra-González Monserrat. 2002. Analisis cariologico de varias especies de *Caesalpinia* (Leguminosae: Caesalpinioideae) endemicas de la depresion del Rio Balsas y Valle de Tehuacan-Cuicatlan, Mexico. Tesis (Licenciatura), Facultad de Ciencias, UNAM. 94 pp.
- Kajita, T., H. Ohashi, Y. Tateishi, C. D. Bailey and J. J Doyle. 2001. *rbcL* and legume phylogeny, with particular reference to Phaseoleae, Millettieae, and allies. *Systematic Botany* 26: 515-536.
- Kelchner SA. 2000. The evolution of noncoding chloroplast DNA and its application in plant systematics. *Annals of Missouri Botanical Garden*. 87: 482-498.
- Lestern, N.R., Curtis J.D. 1994. Subepidermal idioblasts in leaflets of *Caesalpinia pulcherrima* and *Parkinsonia aculeata* (Leguminosae: Caesalpinioideae). *Bull. Torrey Bot. Club*. 120 (3): 319-326.
- Lewis G.P. 1998. *Caesalpinia: A revision of the Poincianella-Erythrostemon group*. Royal Botanic Gardens, Kew, England, UK.
- Lewis, G.P. y Schrire, B. D., 1995. A reappraisal of the *Caesalpinia* group (Caesalpinioideae: Caesalpinieae) using phylogenetic analysis.- En Crisp, M., &

- Doyle, J. J. (Eds): Advances in legume systematics 7: Phylogeny, pp. 41-52.- UK: Royal Botanic Gardens, Kew.
- Lewis, G.P., B. Schrire, B. Mackinder & M. Lock. 2005. Legumes of the world. Royal Botanic Gardens, Kew, England, UK.
- Linneo, C. 1735. Systema naturae, sive regna tria naturae systematica proposita per classes, ordines, genera et species. Primera edición.
- Mendenhall M. 1994. Phylogeny of *Baptisia* and *Thermopsis* (Leguminosae) as inferred from chloroplast DNA and nuclear ribosomal DNA sequences, secondary chemistry, and morphology. PhD Thesis, University of Texas, Austin, TX.
- Polhill, R. M. y J. E. Vidal. 1981. Caesalpinieae. Pp. 81–95 en: R. M. Polhill y P. H. Raven (eds.), Advances in Legume Systematics I. Royal Botanic Gardens, Kew, Londres.
- Sandwith, N.Y. 1937. Contributions to the Flora of Tropical America. XXXI. Kew Bulletin of Miscellaneous Information 5: 303-304.
- Simpson B. Latkin L., Weeks A. 2003. Progress towards resolving the relationships of the Caesalpinia group (Caesalpinieae: Caesalpinioideae: Leguminosae). En B. Klitgaard, Bruneau, A. (Eds): Advances in legume systematics 10: Higher level systematics. UK: Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 123-148.
- Simpson B. Miao, B-M., 1997. The circumscription of *Hoffmannseggia* (Fabaceae, Caesalpinioideae, Caesalpinieae) and allies using morphological and cpDNA restriction site data. Plant Systematics and Evolution. 205: 157-178.
- Simpson, B., 1999: A revision of *Hoffmannseggia* (Fabaceae) in North America. Lundelia 2: 14-54.

- Sotuyo S, Contreras JL, Delgado-Salinas A, Oyama K. 2004. Genetic structure of the endemic *Caesalpinia hintonii* complex (Leguminosae: Caesalpinioideae). *Plant Systematics and Evolution* 247: 131-143.
- Sousa MS, Delgado-Salinas A. 1993. Mexican Leguminosae: Phytogeography, endemism, and origins. In Ramamoorthy AP, Bye R, Lot A, Fa J, eds. *Biological Diversity in Mexico, Origins and Distribution*. Oxford University Press, New York, NY, 459-511.
- Swofford DL. 2001. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Ver. 4.0b8. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of the chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
- Ulibarri, EA. 1979. Especies argentinas de *Hoffmannseggia* (Leguminosae). *Darwiniana* 22:135-158.

CAPÍTULO IV

**Cryptic speciation in the *Caesalpinia hintonii* complex
(Leguminosae: Caesalpinioideae) in a seasonally dry
Mexican forest**

Fecha: Fri, 20 Jul 2007 11:00:59 UT
Remitente: annals-botany@bristol.ac.uk
Destinatario: jsotuyo@oikos.unam.mx
Asunto: 06925 Annals of Botany - decision on this paper
July 20, 2007

Annals of Botany - International Journal serving the Plant Sciences - ISI Impact factor 2.448
System login page: <http://aob.msubmit.net/cgi-bin/main.plex>

Please take time to read this letter through carefully

Dear Dr Sotuyo,

I am very pleased to say that your paper "Cryptic speciation in the *Caesalpinia hintonii* complex (Leguminosae: Caesalpinioideae) in a seasonally dry Mexican forest" is accepted for publication in the Annals of Botany and you may cite the paper as in press. Within a few days it will appear in the AoBFirstAlert listing of forthcoming papers on our web site (www.aob.oxfordjournals.org).

Your paper will also be posted as a full-format PDF in our AoBPreview feature approximately 6 weeks before final publication.

You should receive page proofs by e-mail in 4-6 weeks time. When these arrive, please do all you can to check and return them as quickly as possible. Because all line diagrams, graphs and complex equations are re-drawn or re-keyed by the publisher it is important that you check these in addition to the text. Please also complete and return the attached Licence to Publish Form to the Oxford University Press Production Office at once (fax: +44 (0)1865 353773).

Finally, thank you again for sending this manuscript to the Journal. We accept about 25 % of those we receive, allowing us to publish only papers of notable originality and wide potential interest. The Handling Editor Warren Hauk and referees clearly feel that your manuscript falls into this select category. Thus, our readers are likely to find much to interest them in your paper and I look forward to seeing it published in the very near future.

If you have any questions or wish to comment on our procedures, please contact our Editorial Office by e-mail (annals-botany@bristol.ac.uk) or by telephone (44 (0)117 331 6770).

Yours sincerely,

Michael Jackson
Chief Editor
Annals of Botany

The Annals of Botany Company is a Limited Company registered in England No. 78001 at University of Exeter, Innovation Centre, Rennes Drive, Exeter, EX4 4RN UK, and is also a Registered Charity, No. 237771.

Cryptic speciation in the *Caesalpinia hintonii* complex (Leguminosae: Caesalpinioideae) in a seasonally dry Mexican forest

Solange Sotuyo^{1*}, Alfonso Delgado-Salinas², Mark W. Chase³, Gwilym P. Lewis⁴, and Ken Oyama¹

¹Centro de Investigaciones en Ecosistemas, Universidad nacional Autónoma de México, México

²Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad nacional Autónoma de México, México 04510, México, D. F.

³Jodrell Laboratory, Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey, TW9, 3SD, UK

⁴The Herbarium, Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, Surrey TW9, 3AB, UK

Running heading: Cryptic speciation in the *Caesalpinia hintonii* complex.

jsotuyo@oikos.unam.mx

1 ABSTRACT

2 Background and Aims: The *Caesalpinia hintonii* group comprises six species of endemic
3 shrubs or trees, *C. epifanioi*, *C. hintonii*, *C. laxa*, *C. macvaughii*, *C. melanadenia* and *C.*
4 *oyamae*, found in scattered patches of seasonally dry forest in the Río Balsas depression
5 and the neighboring Tehuacán-Cuicatlán valley, which are part of the Mexican
6 morphotectonic province of Sierra Madre del Sur. We evaluate phylogeographic patterns
7 and genetic diversity with a phylogenetic analysis of the *C. hintonii* complex to study the
8 dynamics of speciation in this endemic group of legumes.

9 Methods: A phylogeographic study based on four highly variable non-coding plastid
10 regions (*trnL* intron, *trnL-F* intergenic spacer, *trnH-psbA* intergenic spacer, and *accD-psaI*
11 intergenic spacer) was carried out for the *Caesalpinia hintonii* complex. Five of the six
12 taxa of the *C. hintonii* complex were included.

13 Key Results and Conclusions: The plastid analyses involving multiple accessions of each
14 taxon from throughout their ranges resolved *C. epifanioi* and *C. hintonii* as well-supported
15 clusters, but *C. oyamae* has two unexpectedly divergent lineages. Two well supported
16 geographic clades: eastern (*C. epifanioi*, *C. melanadenia* and *C. oyamae*) and western (*C.*
17 *hintonii* and *C. macvaughii*) were established. The analyses performed provide evidence of
18 recent morphostatic radiation in *C. oyamae* resulting from isolation and local adaptation.
19 This pattern of genetic differentiation without morphological divergence may be a model
20 that fits many groups of tropical woody taxa inhabiting similarly dry forests subjected to
21 shifting selection.

22 Keywords: the *Caesalpinia hintonii* complex, legumes, Mesoamerica, Mexico, plant
23 phylogeography, population differentiation, seasonally dry forest.

1 INTRODUCTION

2 All currently observed distribution patterns and evolutionary processes are the product
3 of the interplay of historical and ecological factors. A substantial body of evidence
4 indicates that climatic changes have led to major reshuffling of species ranges,
5 dispersal, and colonization (Hewitt, 1996, 2001; Dynesius and Jansson, 2000). These
6 have left a distinct imprint on the genetic structure and variation of many species (e.g.
7 Taberlet *et al.*, 1998; Austin *et al.*, 2002). For many taxa, climatic changes during
8 glacial periods have caused range adjustments and extinctions (Hewitt, 2000; Kropf *et*
9 *al.*, 2002), population subdivision and divergence (Wakeley, 2000), and in some cases
10 radiation (Sáez *et al.*, 2003).

11 Phylogeographic studies for plant species in Europe (e.g., Dumolin-Lapègue *et*
12 *al.*, 1997; Petit *et al.*, 1997; Comes and Kadereit, 1998; King and Ferris, 1998; Taberlet
13 *et al.*, 1998; Abbott *et al.*, 2000; Kropf *et al.*, 2002), North America (e.g., Sewell *et al.*,
14 1996; Tremblay and Schoen, 1999), and the tropics (e.g., Dutech *et al.*, 2000; Caron *et*
15 *al.*, 2000; Ogden and Thorpe, 2002; Knapp and Mallet, 2003), have mainly focused on
16 identifying refugia and tracing routes by which glaciated territories were recolonized.
17 However, much less is known about deserts (Riddle *et al.*, 2002) and even less about
18 rates of plant speciation and radiation in seasonally dry forests during these periods.
19 The main reason for this is probably the difficulty of unravelling the spatial genetic
20 history of species in these refuges as compared to northern regions where climatic
21 changes have been better characterized.

22 Within areas of seasonally dry forest, a complex of vegetation types occurs,
23 depending on local climate, soil, and topography (Pennington *et al.*, 2000). Thus, the
24 complexity of patterns expected in seasonally dry forest is due to contraction-expansion
25 cycles that took place with limited geographical displacement as compared to northern

1 areas. Distributions of taxa in the same place should be historically related and display
2 common patterns resulting from orogenic and widespread ecological events. Therefore,
3 because seasonally dry forest species have similar ecological requirements, major
4 geographical barriers may have led to similarities in their refuge areas and migration
5 routes, even if their migration was asynchronous.

6 There is evidence from the distribution of species that disjunct areas of
7 seasonally dry forests have an historical link. Pennington et al. (2000, 2004) suggested
8 that the contemporary, fragmented distribution of seasonally dry forests in the
9 Neotropics must be considered in relation to the climatic fluctuations of the Quaternary.
10 However, for South American seasonally dry forests, population migration and long-
11 distance dispersal are other explanations for their current biogeographic pattern (Mayle,
12 2004). In Mexico, it is well known that a wide area of disjunct seasonally dry forest
13 occupying the Río Balsas Depression (RBD) contains a diverse endemic biota (Sousa
14 and Delgado, 1993; Becerra and Venable, 1999) in which some of these species
15 represent old and others recent elements of the Mexican flora (Sousa and Soto, 1987).
16 The nature of this endemism and role of climatic changes in evolution and speciation
17 rates of this diverse biota have thus far not been explored.

18 The *Caesalpinia hintonii* complex (Contreras, 1991; Lewis, 1998) comprises six
19 allopatric taxa, *C. epifanioi*, *C. hintonii*, *C. laxa*, *C. macvaughii*, *C. melanadenia*, and
20 the recently described *C. oyamae* (Sotuyo and Lewis, 2007), distributed in patches
21 along the RBD and TCV (Fig. 1). Previous genetic analyses of this group of taxa have
22 shown a clear population structure and apparently recent speciation (Sotuyo *et al.*,
23 2004) based on morphological similarity among species of the complex. However,
24 given that the taxa of the *C. hintonii* complex are restricted to dry areas, that their
25 flowers are bee- (*Centris* and *Xylocopa*) or hummingbird-pollinated, and that they

1 appear to be dispersal limited (with dehiscent seed pods), their observed local
2 endemicity suggests ancient fragmentation of a previously more-widespread ancestor.
3 Moreover, morphological and genetic differences among species in the *C. hintonii*
4 complex may provide evidence of timing and patterns of distribution of several other
5 groups of taxa in the RBD and Tehuacán Cuicatlán Valley (TCV).

6 Our earlier results based on isozyme data (Sotuyo *et al.*, 2004) demonstrated that
7 *Caesalpinia hintonii* diverged genetically as a by-product of local adaptations to
8 different habitats and that the genetic structure of these populations was in close
9 accordance with their spatial distribution. Nevertheless, no conclusive explanation of
10 the observed genetic structure of the six species currently recognized in the complex in
11 the RBD and TCV exists due to the lack of a temporal framework in which to interpret
12 results.

13 The *Caesalpinia hintonii* complex does not have a fossil record (Ramírez and
14 Cevallos-Ferriz, 2000), and dispersal time and distance rates are unknown. If
15 populations expanded and experienced an increase in inter-population gene flow during
16 glaciations, as predicted by refugial theory (Haffer, 1969), we should expect: no
17 significant genetic structure among populations; no isolation by distance effect; and no
18 clear phylogenetic structure among populations. In contrast, if populations remained
19 fragmented throughout these periods, we would expect clear genetic structure and
20 isolation by distance, as well as a highly structured phylogenetic tree reflecting long-
21 standing genetic divergence among populations.

22 Under the latter scenario, we should consider two hypotheses, vicariance versus
23 dispersal. Under the vicariance approach, existence of several allopatric lineages in the
24 RBD and TCV might reflect fragmentation of the ancestral population, and, thus,
25 species distributed in the two regions would be sister taxa. On the other hand, under the

1 dispersal hypothesis allopatric taxa should not necessarily be linked temporally.
2 Dispersal and mixing of lineages during glaciations should have homogenised their
3 haplotypes, and these taxa should exhibit lower genetic diversity and divergence than
4 those taxa not exposed to climatic displacements and homogenization. Support for
5 either of the two scenarios is evaluated in this study by molecular phylogenetic
6 reconstruction, inferring the phylogeographic patterns and genetic diversity of the
7 *Caesalpinia hintonii* complex. To achieve this, we examined plastid DNA sequence
8 variation in one intron and three intergenic spacers, all of which are known to be
9 variable at the species level in several legume genera (e.g., Bruneau *et al.*, 2001), and
10 microstructural changes, primarily those involving insertion/deletion events, *indels*, that
11 have been reported as especially frequent in these regions. Plastids are generally
12 maternally inherited in angiosperms and, therefore, dispersed by seeds only. Because
13 colonisation of new habitats occurs through seeds, plastid DNA markers provide
14 information on past changes in species distribution that is unaffected by subsequent
15 pollen movement.

1 MATERIALS AND METHODS

2 ***Study sites and species sampling***-The Río Balsas Depression (RBD) and Tehuacán-
3 Cuicatlán Valley (TCV) subprovinces are located in the Mexican morphotectonic
4 province of Sierra Madre del Sur and include parts of the following states: Michoacán,
5 Guerrero, Morelos, Puebla and adjacent Oaxaca (Fig. 1). The RBD is an east-west
6 oriented basin that forms the lowlands of the Balsas River drainage basin surrounded by
7 mountains, some of which exceed 2000 m and have an horizon that extends towards the
8 east of the Tehuacán-Cuicatlán Valley in Puebla and Oaxaca states. These subprovinces
9 together form one of the most geologically complicated regions of Mexico (Ferrusquía-
10 Villafranca, 1993). The isolated TCV is located on the east side of the RBD and is
11 considered an ecological island containing assemblages of endemic species.

12 A total of 60 individuals from 13 populations from the *C. hintonii* complex were
13 analysed (Table 1). *Caesalpinia laxa* was not included in the study because it was not
14 available for sampling. Eight species (19 individuals) were specified as outgroups: *C.*
15 *caladenia*, *C. coccinea*, *C. eriostachys*, *C. exostemma* subsp. *exostemma*, *C. hughesii*,
16 *C. nelsonii*, *C. mexicana*, and their sister taxon *C. pannosa*. These taxa were selected
17 because a previous phylogenetic analysis resolved the latter and *C. exostemma* as sister
18 to *C. hintonii* (Simpson *et al.*, 2003). All taxa were sequenced for four plastid regions.
19 Voucher specimens were deposited at either MEXU or K (Table 1).

20 ***Molecular methods***-Total DNA was isolated from frozen or silica gel-dried leaf tissue
21 (Chase and Hills, 1991) or herbarium samples using a modified 2× CTAB miniprep
22 protocol (Doyle and Doyle, 1987). Polymerase chain reaction (PCR) was used to
23 amplify the *trnL* intron, *trnL-F* spacer (primer information for both regions in Taberlet
24 *et al.*, 1991), the *trnH-psbA* intergenic spacer (Hamilton, 1999), and the *accD-psaI*
25 spacer (Mendenhall, 1994). For *trnL* and *trnL-F*, we used the following program: initial

1 denaturing at 94°C for 2 min, 30 cycles of denaturing at 94°C for 20 sec, annealing at
2 58°C for 20 sec, extension at 72°C for 20 sec, and a final extension at 72°C for 5 min.
3 For *trnH-psbA* and *accD-psaI* we used an initial denaturing at 94°C for 2 min, 30 cycles
4 of denaturing at 94°C for 45 sec, annealing at 49°C for 1 min, extension at 72°C for 1.15
5 min, and a final extension at 72°C for 7 min. PCR amplifications were purified with
6 QIAquick silica columns following the manufacturer's protocol (Qiagen, Inc.). Purified
7 PCR products were sequenced on an Applied Biosystems, Inc. (ABI), 3100 automated
8 sequencer using the ABI 3.0 cycle-sequencing protocol. Individual sequences were
9 edited and assembled using Sequencher 4.1 (Gene Codes, Corp.). Complete sequences
10 were aligned by eye following the guidelines of Kelchner (2000). Sequences reported
11 here have been deposited in the NCBI GenBank database.

12 ***Phylogenetic analyses***-All phylogenetic studies were conducted using PAUP version
13 4.0b8 (Swofford, 2001). We established phylogenetic relationships using the maximum
14 parsimony criterion (MP). Because the plastid regions used are inherited without
15 recombination and share a single history, data from all four regions were not analysed
16 separately and were directly combined. The heuristic search employed 100 random
17 additions of sequences with tree bisection reconnection (TBR) branch-swapping, which
18 was restricted to 1000 retained trees. Bootstrap resampling (Felsenstein, 1985) was
19 applied to assess support for individual nodes using TBR swapping and 1000 bootstrap
20 replications. DELTRAN character optimization was used to illustrate branch lengths
21 throughout, due to reported errors with ACCTRAN optimization in PAUP version 4.0b.
22 In some individuals we find two different inverted repeats in the *trnH-psbA* spacer, these
23 were eliminated for the analyses. Indels were coded separately as binary characters
24 using the simple coding of Simmons and Ochoterena (2000).

1 RESULTS

2 The lengths of the aligned sequence matrices were the following: *trnL*, 612 bp; *trnL-F*,
3 518 bp; *trnH-psbA*, 654 bp; and *accD-psaI* 803 bp. The base frequencies were: *AccD-*
4 *psaI* A=0.310, C=0.163, G=0.153, T=0.372; *trnH-psbA* A=0.330, C=0.135, G=0.137,
5 T=0.395; *trnL*, *trnLF* A=0.340, C=0.169, G=0.172, T=0.317. Levels of sequence
6 divergence for the *accD-psaI* showed values that ranged from 0.003-0.021 in the *C.*
7 *hintonii* complex and from 0.004-0.019 between the other *Caesalpinia* species. The
8 *trnH-psbA* region ranged from 0.005-0.033 among the *C. hintonii* complex species and
9 from 0.019-0.065 in the other species. The *trnL*, *trnL-F* regions showed less divergence
10 with a range from 0.002-0.019 in the *C. hintonii* complex and 0.016-0.33 in the rest of
11 the species. *C. caladenia* was the least divergent (*accD-psaI* 0.005-0.017; *trnL*, *trnL-F*
12 0.016-0.021; *trnH-psbA* 0.009-0.033), while *C. nelsonii* was the most divergent (*accD-*
13 *psaI* 0.009-0.022; *trnL*, *trnL-F* 0.016-0.035; *trnH-psbA* 0.036-0.047). *Caesalpinia*
14 *oyamae* showed similar values (*accD-psaI* 0.009-0.021; *trnL*, *trnL-F* 0.010-0.035; *trnH-*
15 *psbA* 0.008-0.047).

16 Diversity in the *Caesalpinia hintonii* complex was high, and numerous indels
17 (109) were present throughout the four plastid regions. Ninety-four of these indels
18 (86%) are phylogenetically informative. Four indels were identified for the *C. hintonii*
19 complex relative to *C. pannosa*, three in *trnH-psbA* (3, 25 and 28 bp) and one in *trnL* (6
20 bp). One synapomorphic indel region was found in *C. hintonii* and *C. macvaughii* (73
21 bp). Seven were shared by *C. oyamae*, *C. melanadenia*, *C. epifanioi*, and *C. pannosa*,
22 these are synapomorphic for *C. hintonii* and *C. macvaughii*, which is why that branch is
23 so long (Fig 2A). Six were identified in *trnH-psbA* (4, 39, 34, 4, 6 and 6 bp), and one in
24 *trnL-F* (23 bp). *Caesalpinia hintonii* shared one *accD-psaI* indel (8 bp) with *C.*
25 *pannosa*. One shared *trnL-F* indel was found in *C. hintonii*, *C. macvaughii*, and *C.*

1 *pannosa* (23 bp), whereas one *accD-psaI* indel was synapomorphic in all *C. hintonii*
2 populations (12 bp).

3 **Phylogenetic analyses-** The strict consensus trees for each region analysed showed the
4 same topology and were combined. The combined plastid matrix (2602 bp) yielded
5 trees of 575 steps long, with consistency index (CI) of 0.68 and retention index (RI) of
6 0.86. The indels matrix yielded trees of 1535 steps long, CI=0.53 and RI=0.91. Of the
7 828 sites examined 61 were parsimony informative. Indels were less homoplasious than
8 non-indel characters (HI=0.0328 vs HI=0.44 respectively). The combined plastid
9 matrix including gaps has 766 potentially parsimony informative sites and produced
10 trees of 2141 steps long, with CI=0.56 and RI=0.91. The tree shows that the *C. hintonii*
11 complex contains two geographically matching lineages, one eastern (84% bootstrap
12 support) and the other western (92% bootstrap support) parts of the Río Balsas
13 Depression (Fig. 2B).

14 The eastern Río Balsas Depression region cluster includes *C. oyamae*, *C.*
15 *epifanioi*, and *C. melanadenia*. Included in this eastern cluster, the Valerio Trujano
16 population of *C. oyamae* is isolated from the other three eastern populations (91%, 99%
17 bootstrap support). Within the eastern lineage, *C. melanadenia*, restricted to TCV, was
18 poorly supported, although in all shortest trees the four accessions clustered together.
19 The western region cluster containing *Caesalpinia hintonii* and *C. macvaughii*
20 populations is well supported (bootstrap 92%). The western lineage also contains a
21 diversified and weakly supported *C. macvaughii*.

1 DISCUSSION

2 **Phylogenetic analyses-** At the molecular level, the most striking difference between species
3 of *Caesalpinia* in the RBD-TCV was the clear evidence of isolation between most
4 populations. This study shows that the *Caesalpinia hintonii* complex possesses high levels of
5 genetic divergence over its entire range, which could indicate that the places where the
6 constituent populations currently exist could be refugia isolated by changes in climate.
7 Previous studies of other plant species have implicated vicariance with climate change in the
8 speciation process (Riddle *et al.*, 2002) and, thus, the origin of genetic structure among
9 populations (Vijverberg *et al.*, 2000). When vicariance has occurred, more distant haplotype
10 relationships are expected. Conversely recent immigrants, under a secondary contact
11 scenario, would present haplotypes identical to the donor population(s). Therefore, the
12 population structure shown by the *C. hintonii* complex could be the result of populations
13 having been isolated in two or more glacial refugia, followed by population expansion and a
14 subsequent long period without secondary contact as the Neotropics became wetter and cooler
15 (Pennington *et al.*, 2000).

16 Two major lineages were found in the RBD and TCV (Fig. 2) that fit the two
17 physiographic units proposed by Miranda (1947). The separation of the eastern and western
18 lineages of the *Caesalpinia hintonii* complex may well correspond to fragmentation that was
19 triggered by the development of the Sierra of Taxco-Teloloapan, which divided the RBD
20 (Cabral-Cano *et al.*, 2000). This most prominent physical barrier appears to be a clear
21 obstacle to the movement of some *Caesalpinia* taxa; populations of *C. hintonii* and *C.*
22 *macvaughii* apparently have not exchanged plastids (Tsitrone *et al.*, 2003) since their
23 establishment on the western side of the RBD. Likewise *C. oyamae*, *C. epifanioi* and *C.*
24 *melanadenia* are restricted to the eastern flank of the Depression. Furthermore, volcanism

1 and geological perturbations in the Trans-Mexican Volcanic Belt (Ferrari *et al.*, 1999) must
2 have had a considerable influence on population divergence within *C. oyamae* in the RBD.

3 Within the western lineage, the molecular markers used in this study indicate that both
4 populations (Infiernillo and Zicuítaro) of *Caesalpinia hintonii* are genetically a close-knit
5 homogeneous group, even though they are morphologically distinct (Contreras, 1991; Lewis,
6 1998). The genetic similarity of these populations, also supported by allozyme analysis
7 (Sotuyo *et al.*, 2004), indicates that their morphological differences are the result of changes
8 in only few genes or phenotypic plasticity.

9 In contrast, populations of the eastern lineage species proved to be morphologically
10 homogeneous (Sotuyo & Lewis, 2007) but genetically distinct. *Caesalpinia epifanioi* and *C.*
11 *melanadenia*, the first restricted to eastern Río Balsas Depression, the latter endemic to the
12 Tehuacán-Cuicatlán valley, proved to be both morphologically and genetically different. In
13 contrast, results of this study indicate that there are two distinct population assemblages in
14 *Caesalpinia oyamae* (Fig. 2), which could each be considered cryptic species following the
15 model of recent and rapid speciation demonstrated by Weinberg and collaborators (1992).
16 Evidence for speciation in *C. oyamae* populations was revealed by the high level of well-
17 supported phylogenetic structure. However, allozyme analysis indicated the same degree of
18 genetic isolation as the plastid DNA analyses (Sotuyo *et al.*, 2004) except in the Huajuapan
19 population (*C. oyamae*) which was not sampled for that study. Studies on a diverse range of
20 taxa suggest that selection due to shifts in ecology or invasion of new habitats can cause
21 extremely rapid divergence and might play a prominent role in speciation (Orr and Smith,
22 1998). Proposed cryptic species in this eastern lineage may indicate the presence of optimal
23 phenotypes that are subject to strong stabilizing selection and thus remain morphologically
24 similar (e.g. Shaw, 2001; McDaniel and Shaw, 2003).

1 However, relationships of the eastern populations are suggestive of a recent origin of
2 *Caesalpinia oyamae*, as would be expected for genotypes at the limits of a recently expanded
3 range (Posada and Crandall, 2001). Plastid DNA variation also corresponds closely to
4 geographical distribution, which is likely to reflect dispersals that involve interruption of gene
5 flow among populations. Dispersals, together with genetic drift in the early stages of local
6 establishment, may result in decreases in genetic variation within populations and in increases
7 between populations (Okada *et al.*, 1997).

8 The results presented in this study provide evidence of reproductive isolation of
9 lineages in allopatry. Explanations for cryptic radiation have ranged from high mutation rate
10 to developmental constraints and long-term environmental stability. It has been further
11 suggested that stabilizing selection (Hansen, 1997) and lack of additive genetic variance for
12 morphological traits (McDaniel and Shaw, 2003) may play an important role in maintaining
13 morphological stasis if the environment has been stable over long periods of time. In
14 contrast, Sheldon (1996) has argued that morphological stasis should occur in unstable,
15 changing environments (e.g., changes in climate), whereas long stable habitats should
16 promote gradual morphological evolution. His model predicts that initial major
17 environmental perturbations select for generalist phenotypes that are well adapted to
18 subsequent environmental fluctuations. If Sheldon's assumption is correct, this process might
19 help to explain why morphostasis has occurred in taxa such as *C. oyamae*.

20 The phylogeographic complexity of the eastern clade suggests that species expansion
21 of the *Caesalpinia hintonii* complex in the region considerably predated the contemporary
22 expansion of the species across the RBD and/or that greater geological heterogeneity of the
23 Trans-Mexican Volcanic Belt (TMVB) has caused a reduction in gene flow leading to
24 increased population subdivision. There are no previous phylogeographic studies in plants
25 within the RBD region. However, a phylogeographic study of pocket gophers demonstrated a

1 clear phylogeographic structure in the TMVB and Mesa del Norte of the Mexican Plateau that
2 was associated with a recent expansion and displacement of existing populations by volcanic
3 activity (Desmastes *et al.*, 2002).

4 Divergence into two geographically distinct clades remains evident in the *C. hintonii*
5 complex. Taken together, our analysis supports the hypothesis that isolated populations of *C.*
6 *oyamae* in the RBD diverged in refugia during times of climatic change and that the
7 geographical variation reflects patterns of recolonization. The *C. hintonii* complex fits better
8 the Pennington *et al.* (2004) model because all the species are dispersal limited.

9 ***Taxonomic implications and concluding remarks***-The *Caesalpinia hintonii* complex
10 currently comprises six essentially allopatric taxa: *C. epifanioi*, *C. hintonii*, *C. laxa*, *C.*
11 *macvaughii*, *C. melanadenia*, and *C. oyamae*. *Caesalpinia oyamae* is the most
12 morphologically similar species to *C. hintonii*, in the past they were considered the same
13 species. Our results support the hypothesis that both species are genetically distinct lineages
14 in which gene flow between the two species by seeds likely ceased long ago. In contrast, the
15 two species are morphologically separable by differences in flower size and colour, hardly
16 significant diagnostic characters (Sotuyo *et al.*, 2004).

17 Furthermore plastid DNA analysis established two lineages within *Caesalpinia*
18 *oyamae* that are morphologically identical but genetically divergent. Should these two
19 geographically distinct lineages within *C. oyamae* also be formally recognized as species
20 despite their morphological similarity? We consider it unwise to take this course, unless
21 some morphological evidence can be found that facilitates recognition of taxonomic
22 distinctiveness.

23 Diversification in the *Caesalpinia hintonii* complex is clearly linked to environmental
24 conditions, orogeny, volcanism and glaciations, suggesting that a more detailed analysis will
25 reveal more data that facilitates taxonomic decisions. The apparent transformation of a single,

1 regionally endemic, molecularly variable ancestor into a complex of at least eight species is
2 noteworthy. Each species now occupies different ecological environments in the Mexican
3 morphotectonic province of Sierra Madre del Sur. It appears likely that other endemic species
4 complexes such as the *C. hintonii* complex will be shown to be an amalgam of isolated
5 lineages. Therefore, genetic differentiation without morphological differentiation may prove
6 wider in plants than previously acknowledged, and with more studies like the present one may
7 establish as another differentiation pattern that have led to species diversification in the Río
8 Balsas Depression. In addition, studies like this one offer an exciting way of analyzing
9 intricate taxonomic group complexes.

1 ACKNOWLEDGEMENTS

2 We thank the Molecular Systematics staff at the Jodrell Laboratory, Royal Botanic Gardens,
3 Kew, and Laura Márquez (IBUNAM) for their technical assistance and Victor Steinmann
4 (INECOL) for his help collecting *C. macvaughii*. The research was supported by CONACYT
5 doctoral scholarship number 15291811144 to Solange Sotuyo, DGEP-UNAM and the Royal
6 Botanic Gardens, Kew. We are grateful to the editor Professor Warren Hauk and two
7 anonymous reviewers for their comments.

LITERATURE CITED

- Abbott RJ, Smith LC, Milne RI, et al., 2000.** Molecular analysis of plant migration and refugia in the Arctic. *Science* **289**: 1343-1346.
- Austin JD, Loughheed SC, Neidrauer L, Chek AA, Boag PT. 2002.** Cryptic lineages in a small frog: the post-glacial history of the spring peeper, *Pseudacris crucifer* (Anura: Hylidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **25**: 316-329.
- Becerra J, Venable L. 1999.** Nuclear ribosomal DNA and its implications for evolutionary trends in Mexican *Bursera* (Burseraceae). *American Journal of Botany* **86**: 1047-1057.
- Bruneau A, Forest F, Herendeen PS, Klitgaard BB, Lewis GP. 2001.** Phylogenetic relationships in the Caesalpinioideae (Leguminosae) as inferred from chloroplast *trnL* intron sequences. *Systematic Botany* **26**: 487-514.
- Cabral-Cano E, Lang HR, Harrison CGA. 2000.** Stratigraphic assessment of the Arcelia-Teloloapan area, southern Mexico: implications for southern Mexico's post-Neocomian tectonic evolution. *American Earth Science* **13**: 443-457.
- Caron H, Dumas S, Marque G, Messier C, Bandou E, Petit RJ, Kremer A. 2000.** Spatial and temporal distribution of chloroplast DNA polymorphism in a tropical tree species. *Molecular Ecology* **9**: 1089-1098.
- Chase MW, Hills HG. 1991.** Silica gel: an ideal desiccant for preserving field-collected leaves for use in molecular studies. *Taxon* **40**: 215-220.
- Comes HP, Kadereit JW. 1998.** The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in Plant Sciences* **3**: 432-438.
- Contreras JL. 1991.** *Contribución al conocimiento del género Caesalpinia (Leguminosae: Caesalpinioideae) en el estado de Guerrero*. B Sc. Thesis, Facultad de Ciencias, UNAM, México.

- Desmastes JW, Spradling TA, Hafner DJ, Reed DL. 2002.** Systematics and phylogeography of pocket gophers in the genera *Crarogeomys* and *Pappogeomys*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **22**: 144-154.
- Doyle JJ, JL. Doyle. 1987.** A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**: 11-15.
- Dumolin-Lapègue S, Demesure B, Le Corre V, Petit RJ. 1997.** Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics* **146**: 1475-1487.
- Dutech C, Maggia L, Joly HI. 2000.** Chloroplast diversity in *Vouacapoua americana* (Caesalpiniaceae), a Neotropical forest tree. *Molecular Ecology* **9**: 1427-1432.
- Dynesius M, Jansson R. 2000.** Evolutionary consequences of changes in species' geographical distribution driven by Milankovitch climate oscillations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**: 9115-9120.
- Felsenstein J. 1985.** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783-791.
- Ferrari L, López-Martínez M, Aguirre-Díaz G, Carrasco-Núñez G. 1999.** Space-time patterns of Cenozoic arc volcanism in central Mexico: From the Sierra Madre Occidental to the Mexican Volcanic Belt. *Geology* **27**: 303-306.
- Ferrusquía-Villafranca I. 1993.** Geology of Mexico: a synopsis. In: Ramamoorthy AP, Bye R, Lot A, Fa J, eds. *Biological Diversity in Mexico. Origins and Distribution*. Oxford University Press, New York, NY, 3-108.
- Haffer J. 1969.** Speciation in Amazonian birds. *Science* **165**: 131-137.
- Hamilton MB. 1999.** Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology* **8**: 521-523.
- Hansen TF. 1997.** Stabilizing selection and the comparative analysis of adaptation. *Evolution* **51**: 1341-1351.

- Hewitt GM. 1996.** Some genetic consequences of ice ages and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* **58**: 247-276.
- Hewitt GM. 2000.** The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**: 907-913.
- Hewitt GM. 2001.** Speciation, hybrid zones and phylogeography or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* **10**: 537-549.
- Kelchner SA. 2000.** The evolution of noncoding chloroplast DNA and its application in plant systematics. *Annals of Missouri Botanical Garden* **87**: 482-498.
- King RA, Ferris C. 1998.** Chloroplast DNA phylogeography of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Molecular Ecology* **7**: 1151-1161.
- Knapp S, Mallet J. 2003.** Refuting refugia? *Science* **300**: 71-72.
- Kropf M, Kadereit JW, Comes HP. 2002.** Late Quaternary distributional stasis in the submediterranean mountain plant *Anthyllis montana* L. (Fabaceae) inferred from ITS sequences and amplified fragment length polymorphism markers. *Molecular Ecology* **11**: 447-463.
- Lewis GP. 1998.** *Caesalpinia: A Revision of the Poincianella-Erythrostemon Group*. Royal Botanic Gardens, Kew, England, UK.
- Mayle FE. 2004.** Assessment of the Neotropical dry forest refugia hypothesis in the light of paleoecological data and vegetation model simulations. *Journal of Quaternary Science* **19**: 713-720.
- Mendenhall M. 1994.** *Phylogeny of Baptisia and Thermopsis (Leguminosae) as Inferred from Chloroplast DNA and Nuclear Ribosomal DNA sequences, Secondary Chemistry, and Morphology*. PhD Thesis, University of Texas, Austin, TX.
- McDaniel SF, Shaw JA. 2003.** Phylogeographic structure and cryptic speciation in the trans-Antarctic moss *Pyrrhobryum minioides*. *Evolution* **57**: 205-215.

- Miranda F. 1947.** Estudios sobre la vegetación de México - rasgos de la vegetación en la Cuenca del Río Balsas. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, Tomo VIII, 1-4.
- Ogden R, Thorpe RS. 2002.** Molecular evidence for ecological speciation in tropical habitats. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **99**: 13612-13615.
- Okada M, Whitkins R, Lowrey TK. 1997** Genetics of adaptative radiation in Hawaiian and Cook Islands species of *Tetramolopium* (Asteraceae: Astereae). I. Nuclear RFLP marker diversity. *American Journal of Botany* **84**: 1236-1246.
- Orr M, Smith TB. 1998.** Ecology and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* **13**: 502-506.
- Pennington T, Prado DE, Pendry CA. 2000.** Neotropical seasonally dry forests and the Quaternary vegetation changes. *Journal of Biogeography* **27**: 261-273.
- Pennington T, Lavin M, Prado DE, Pendry CA, Pell SK, Butterworth CA. 2004.** Historical climate change and speciation: Neotropical seasonally dry forest plants show patterns of both Tertiary and Quaternary diversification. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* **359**:515-537.
- Petit RJ, Pineau ED, Demesure B, Bacilieri R, Ducouso A, Kremer A. 1997.** Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **94**: 9996-10001.
- Posada D, Crandall KA. 2001.** Intraspecific phylogenetics: Trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution* **16**: 37-45.
- Ramírez JL, Cevallos-Ferriz SR. 2000.** Consideraciones sobre las angiospermas (plantas con flor) fósiles de México. *GEOS Diciembre* 433-444.

- Riddle BR, Hafner DJ, Alexander LF, Jaeger JR. 2002.** Cryptic vicariance in the historical assembly of Baja California Peninsular desert biota. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **97**: 14438-14443.
- Sáez A, Probert I, Geisen M, Quinn P, Young J, Medlin L. 2003.** Pseudo-cryptic speciation in coccolithophores. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **12**: 7163-7168.
- Sewell MM, Parks CR, Chase MW. 1996.** Intraspecific chloroplast DNA variation and biogeography of North American *Liriodendron* L. (Magnoliaceae). *Evolution* **50**: 1147-1154.
- Shaw AJ. 2001.** Molecular phylogeography and cryptic speciation in bryophytes. *Journal of Biogeography* **28**: 253-261.
- Sheldon P. 1996.** Plus ça change - a model for stasis and evolution in different environments. *Palaeogeography, Palaeoclimatology and Palaeoecology* **127**: 209-227.
- Simmons MP, Ochoterena H. 2000.** Gaps as characters in sequence-based phylogenetic analyses. *Systematic Biology* **49**:369-381.
- Simpson B, Latkin L, Weeks A. 2003.** Progress towards resolving the relationships of the *Caesalpinia* group (Caesalpinieae: Caesalpinioideae: Leguminosae). In: Klitgaard B, Bruneau A, eds. *Advances in Legume Systematics 10: Higher Level Systematics*. Royal Botanic Gardens, Kew, UK, 123-148.
- Sotuyo S, Contreras JL, Delgado-Salinas A, Oyama K. 2004.** Genetic structure of the endemic *Caesalpinia hintonii* complex (Leguminosae: Caesalpinioideae). *Plant Systematics and Evolution* **247**: 131-143.
- Sotuyo S, Lewis GP. 2007.** A new species of *Caesalpinia* from the Rio Balsas Depression, Mexico and an updated taxonomic circumscription of the *Caesalpinia hintonii* complex

(Leguminosae: Caesalpinioideae: Caesalpinieae: *Poincianella* Group). *Brittonia* **59**: 33-36.

Sousa MS, Soto JC. 1987. Nuevos taxa de *Lonchocarpus* (Leguminosae) de las cuencas baja y media del Río Balsas, México. *Anales del Instituto de Biología, UNAM, serie Botánica* **58**: 69-86.

Sousa MS, Delgado-Salinas A. 1993. Mexican Leguminosae: Phytogeography, endemism, and origins. In Ramamoorthy AP, Bye R, Lot A, Fa J, eds. *Biological Diversity in Mexico, Origins and Distribution*. Oxford University Press, New York, NY, 459-511.

Swofford DL. 2001. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Ver. 4.0b8. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

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

Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, JF. Cosson. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* **7**: 453-464.

Tremblay NO, Schoen DJ. 1999. Molecular phylogeography of *Dryas integrifolia*: glacial refugia and postglacial recolonization. *Molecular Ecology* **8**: 1187-1198.

Tsitrone A, Kirkpatrick M, Levin DA. 2003. A model for chloroplast capture. *Evolution* **57**: 1776-1782.

Vijverberg K, Kuperus P, Breeuwer JA, Bachmann K. 2000. Incipient radiation of New Zealand and Australian *Microseris* (Asteraceae): an amplified fragment length polymorphism (AFLP) study. *Journal of Evolutionary Biology* **13**: 997-1007.

Wakeley J. 2000. The effects of subdivision on the genetic divergence of populations and species. *Evolution* **54**: 1092-1101.

Weinberg JR, Starczak VR, Jora P. 1992. Evidence for rapid speciation following a founder event in the laboratory. *Evolution* **46**: 1214-1220.

Figure Legends

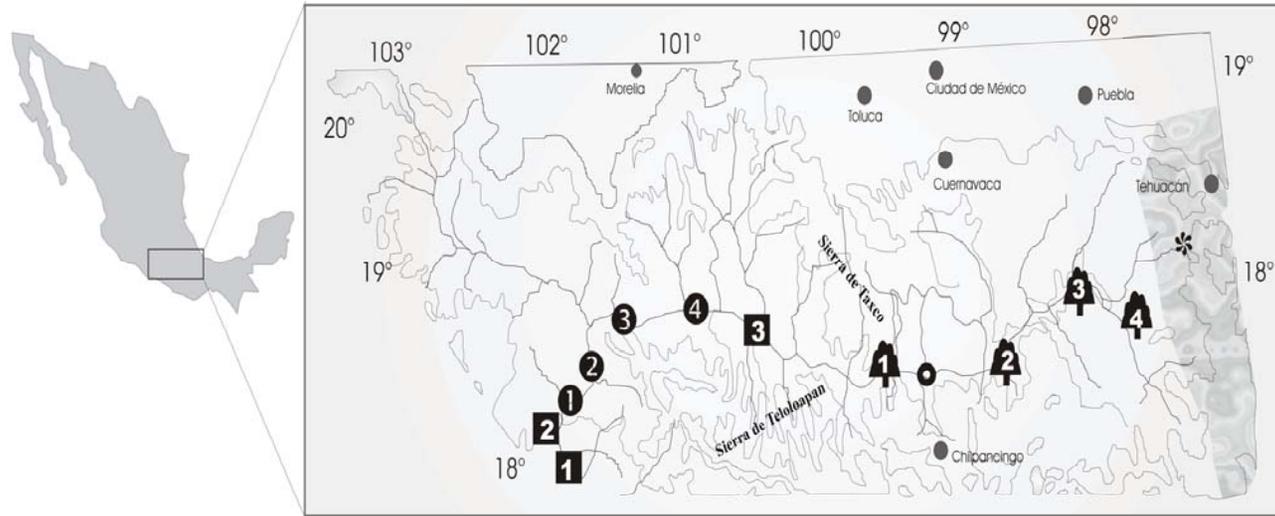
Fig. 1 Geographical distribution of the *Caesalpinia hintonii* complex. The map includes part of the Tehuacán-Cuicatlán valley in a grey pattern.

Fig. 2 Trees produced by simultaneous analysis of sequences from all four plastid DNA regions. A. One of the most parsimonious trees showing the number of changes for the *Caesalpinia hintonii* complex based on *accD-psaI*, *trnL*, *trnL-F* and, *trnH-psaI* plastid regions including indels (DELTRAN optimization). B. Strict consensus tree of all equally most parsimonious trees found in the 1000 replicates of random taxon-addition; numbers above branches are bootstrap percentages greater than 50. In a grey square the *C. hintonii* complex. Abbreviations in Table 1.

Table 1 Localities of the *Caesalpinia hintonii* complex and outgroup specimens included in this study. N= sampled number.

Species/Population/ Abbreviation	State	N	Coordinates (N, W)	Elevation (m)	Voucher specimens	Genbank number
<i>C. oyamae</i> (Coya)		25				
Huajuapán (HU)	Oaxaca	4	17°52'56, 98°05'	1325	<i>Sotuyo & González</i> 17; <i>Sotuyo et al.</i> 72, 74, 75	DQ208808-DQ208806, DQ208736-DQ298733, DQ208880-DQ208877
Tehuiztzingo (TE)	Puebla	5	18°20', 98°117'	1100	<i>Sotuyo et al.</i> 65, 66, 67, 68	DQ208805-DQ208801, DQ208732-DQ208728, DQ208876-DQ208772
Tlahuahuilco (TL)	Guerrero	9	17°50', 99°06'	660	<i>Sotuyo et al.</i> 55, 57	DQ208800-DQ208792, DQ208727-DQ208719, DQ208870-DQ208863
Valerio Trujano (VT)	Guerrero	7	17°50', 99°36'	500	<i>Sotuyo & Sotuyo</i> 18; <i>Sotuyo et al.</i> 58, 59, 60	DQ208790-DQ208785, DQ208717-DQ208712, DQ208862-DQ208856
<i>C. hintonii</i> (Chin)		15				
Zicuítaro (ZIC)	Guerrero	8	18°26', 100°51'	300	<i>Sotuyo et al.</i> 50, 52	DQ208757-DQ208751, DQ208897-DQ208890, DQ208824-DQ208817
Infiernillo (IN)	Michoacán	6	18°24', 101°55'	240	<i>Sotuyo et al.</i> 41, 46, 47, 48	DQ208749-DQ208743, DQ208815-DQ208809, DQ208887-DQ208881
Playa azul (PA)	Michoacán	1	18°24', 101°55'	200	<i>Sotuyo et al. s.n.</i>	DQ208816, DQ208750, DQ208889
<i>C. macvaughii</i> (Cmac)		9				
Descansadero (DE)	Michoacán	3	18°38', 101°57'	450	<i>Contreras et al. s.n.</i>	DQ208840-DQ208836, DQ208762-DQ208760, DQ208912-DQ208910
Nueva Italia (NIT)	Michoacán	1	19°00', 102°04'	400	<i>Steinmann</i> 3175	DQ208843, DQ208916,
San Francisco (SFC)	Michoacán	1	18°38', 101°59'	330	<i>Steinmann</i> 3176	DQ208766, DQ208917

Zirándaro (ZIR)	Guerrero	4	18°32', 101°13'	270	<i>Sotuyo et al.</i> 8, 8bis	DQ208842-DQ208840, DQ208767, DQ208765- DQ208763, DQ208909, DQ208765-DQ2088913
<i>C. epifanioi</i> (Cepi)		6				
Mezcala	Guerrero	6	18°17', 98°05'	500	<i>Sotuyo & Sotuyo</i> 20, <i>Sotuyo et al.</i> 63	DQ208830-DQ208825, DQ208742-DQ208737, DQ208903-DQ208898
<i>C. melanadenia</i> (Cmel)		5				
Zapotitlán (ZAP)	Puebla	5	18°19': 97°27'	1500	<i>Sotuyo & González s.n.</i>	DQ208835-DQ208831, DQ208772-DQ208768, DQ208908-DQ208904
<i>C. pannosa</i>	Baja California Sur	12	24°09': 110°56'	10-700	<i>Contreras</i> 2050, 2696, 2703, 2715, 2721, 2726, 2727; <i>Hawkins</i> 87, <i>Lewis et al.</i> 2047, 2051; <i>Carter</i> 2124; <i>Gentry</i> 4365; <i>Wiggins</i> 15688	DQ208855-DQ208844, DQ208784-DQ208773, DQ208930-DQ208919
<i>C. caladenia</i>	Michoacan	1	Not available	220-410	<i>Contreras</i> 2818	EF177383, EF177390, EF177397
<i>C. coccinea</i>	Oaxaca	1	15°55': 95°48'	100	<i>Lewis</i> 1803	EF177386, EF177393, EF177400
<i>C. eriostachys</i>	Guerrero	1	18°13': 101°47'	450	<i>MacQueen</i> 449	EF177389, EF177396, EF177403
<i>C. exostemma</i> subsp. <i>exostemma</i>	Guatemala	1	14°59', 89°40'	180-190	<i>Lewis et al.</i> 1712 (<i>Chase</i> 15196)	EF177388, EF177395, EF177402
<i>C. hughesii</i>	Oaxaca	1	Not available	15-130	<i>Lewis</i> 1795	EF177384, EF177391, EF177398
<i>C. mexicana</i>	Nuevo León	1	24°51': 99°24'	350	<i>Delgado</i> 01-2114	EF177387, EF177394, EF177401
<i>C. nelsonii</i>	Oaxaca	1	18°45', 098°10'	100-500	<i>Sotuyo s.n.</i> (<i>Chase</i> 18851)	EF177385, EF177392, EF177399



Caesalpinia hintonii

- 1** Infiernillo
- 2** Playa Azul
- 3** Zicuítaro

Caesalpinia macvaughii

- 1** Nueva Italia
- 2** Descansadero
- 3** San Francisco
- 4** Zirándaro
- * *Caesalpinia melanadenia*
- *Caesalpinia epifanioi*

Caesalpinia oyamae

- 1** Valerio Trujano
- 2** Tlayahualco
- 3** Tehuitzingo
- 4** Huajuapán

Figure 1

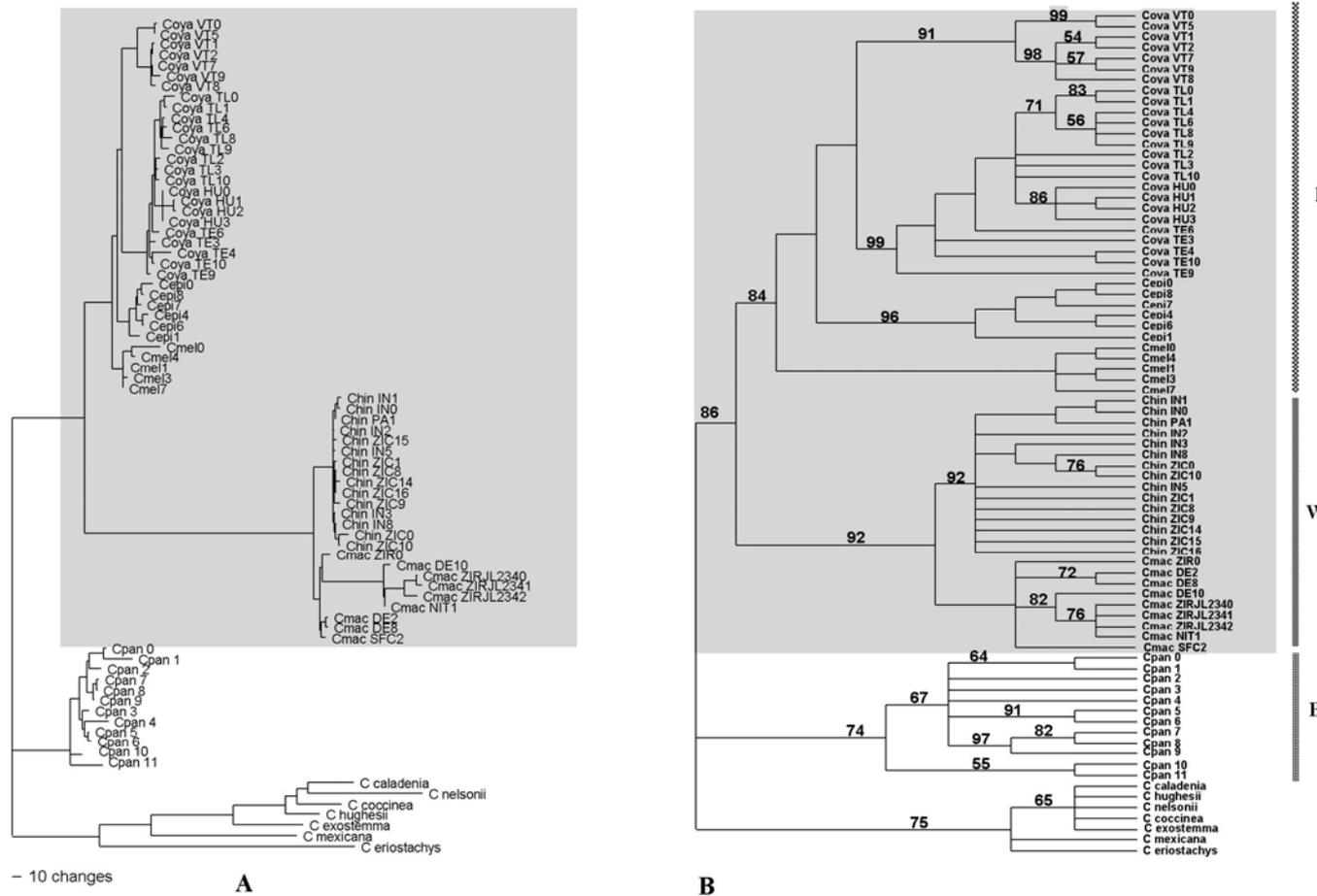


Figure 2

CAPÍTULO V

**Análisis filogeográfico y fechamiento del complejo
Caesalpinia hintonii (Leguminosae: Caesalpinioideae:
Poincianella) en México.**

Resumen

Se realizó un estudio filogeográfico en las especies del complejo *Caesalpinia hintonii* (Leguminosae: Caesalpinioideae: Poincianella) formada por cinco especies (*C. epifanioi* J.L. Contreras, *C. hintonii* Sandwith, *C. macvaughii* J.L. Contreras & G.P. Lewis, *C. melanadenia* (Rose) Standley y *C. oyamae* (Sotuyo & Lewis) en la Depresión del Balsas y el valle de Tehuacan-Cuicatlán, en los estados de Guerrero, Michoacán, Puebla y Oaxaca. Se emplearon secuencias de cuatro regiones de plastidio (intron *trnL*, espaciador *trnL-F*, espaciador *psbA-trnH* y espaciador *accD-psaI*) para analizar 12 poblaciones del complejo determinando la estructura genética de las poblaciones y fechando el origen mediante el método NPRS. Las diversidades haplotídicas en todas las especies fueron altas (0.643-1) así como las diferencias nucleotídicas (3.8- 11.52). Las poblaciones de *C. oyamae* están genéticamente estructuradas y se encontraron tres haplogrupos donde el flujo génico entre ellos es bajo. La estructura genética no revela un patrón geográfico perceptible y la divergencia poblacional podría deberse a selección local, aislamiento geográfico y a la deriva génica en cada uno de los haplogrupos. La edad del complejo *C. hintonii* fue mayor a la hipotetizada originalmente, los eventos de divergencia en dos grandes linajes al Este y Oeste del Balsas pueden explicarse por eventos geológicos pero no así los eventos de divergencia puntuales para *C. hintonii* y *C. macvaughii* en donde condiciones ecológicas locales podrían estar involucradas.

Introducción

Actualmente se reconocen cinco especies dentro del complejo *Caesalpinia hintonii*: *C. epifanioi* J.L. Contreras, *C. hintonii* Sandwith, *C. macvaughii* J.L. Contreras & G.P. Lewis, *C. melanadenia* (Rose) Standley y *C. oyamae* Sotuyo & Lewis, distribuidas disyuntamente en la Depresión del Balsas y el valle de Tehuacan-Cuicatlán, en los estados de Guerrero, Michoacán, Puebla y Oaxaca. Contreras (1991) basándose en un estudio morfológico incluye a *C. laxa* Benth. como parte del complejo, pero después de un análisis filogenético se descartó la relación con este (Sotuyo et al., en prep.). El complejo *C. hintonii*, tal y como se circunscribió recientemente se considera un grupo monofilético (Sotuyo y Lewis, 2007), cuya especie hermana es *C. pannosa*, especie que se distribuye en Baja California Sur.

La circunscripción original del complejo (Contreras, 1991) proponía una amplia distribución para la especie *C. hintonii* en toda la Depresión del Río Balsas. Sin embargo, el estudio morfológico de Lewis y Sotuyo (2007) y datos moleculares (Sotuyo et al., en prensa) hicieron que se reconociera a las poblaciones de *C. hintonii* ubicadas en la porción oriental de esta Depresión como *C. oyamae*. Dentro de *C. oyamae*, dada su divergencia genética, se percibió la posible existencia de otras especies crípticas por su nula divergencia morfológica. Por tanto, *C. oyamae* junto con *C. melanadenia* y *C. epifanioi* sólo se encuentran distribuidas en la porción oriental de la planicie morfotectónica de la Sierra Madre del Sur, porción oriental de la Depresión del Balsas y en el valle de Tehuacán-Cuicatlán (Fig 5.1). Los estudios anteriores muestran que *C. macvaughii* y *C. hintonii* están estrechamente relacionadas y que existe morfoestasis en el complejo como producto del

aislamiento de las poblaciones y posibles adaptaciones a las condiciones ambientales particulares (Sotuyo et al. en prensa).

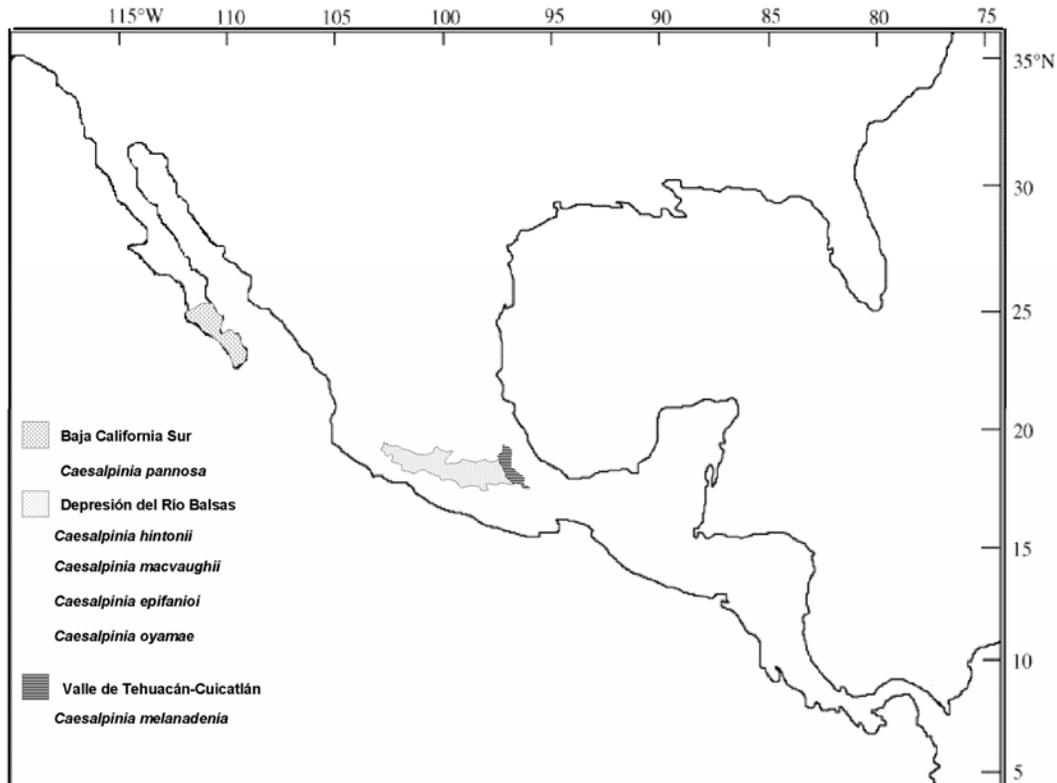


Figura 5.1 Distribución general de las especies del complejo *Caesalpinia hintonii* y la especie hermana *C. pannosa*.

En la actualidad, un creciente número de estudios filogeográficos se han desarrollado en México (e.g., Parkinson et al., 2000; Harris et al., 2000; Hafner y Riddle, 2005, Takagawa et al., 2006), pero no existen estudios filogeográficos con especies ubicadas dentro de la Depresión del Balsas y el valle de Tehuacán-Cuicatlán. De hecho, para plantas mexicanas el número de estudios filogeográficos publicados es escaso (e.g., Takagawa et al., 2006; Takayama et al., 2006). Los estudios publicados han encontrado patrones generales de donde se pueden identificar refugios o localizar zonas de contacto de especies que forman híbridos (González-Rodríguez et al 2004).

La incongruencia entre las diferentes historias filogeográficas presentadas en estos estudios puede deberse a la topografía tan particular que presenta México (Riddle et al., 2000). De hecho, las Sierras Madre Oriental y Madre Occidental así como el Eje Neovolcánico Transversal son fuertes barreras biogeográficas las cuales debieron limitar los movimientos de norte a sur durante los periodos interglaciares de múltiples especies.

Fechamiento del complejo *Caesalpinia hintonii*

Entender los procesos evolutivos a través de la escala geológica es uno de los aspectos más deseados cuando se estudian las disyunciones geográficas ligadas con la divergencia de linajes. El punto de inicio es averiguar las causas y los mecanismos por los cuáles taxa estrechamente relacionados han divergido. El segundo es conocer el momento en el cual esos taxa descendientes divergieron del grupo ancestral. Debido a lo incompleto que es el registro fósil y los datos palinológicos, es necesario abordar el problema utilizando la perspectiva filogenética. Los árboles filogenéticos generados a partir de secuencias de ADN pueden ser utilizados para estimar los tiempos de divergencia de los linajes si éstos poseen tasas de evolución homogéneas (tasas de sustitución) y se comportan bajo la hipótesis del reloj molecular. La hipótesis del reloj molecular asume que los cambios en el ADN se acumulan a una tasa constante a través del tiempo (Zuckerkandl y Pauling, 1965). A pesar del creciente empleo de los relojes moleculares en la biología evolutiva, existen controversias en torno a su uso (Swofford et al., 1996). Uno de los debates reside en el grado de heterogeneidad de las tasas evolutivas entre linajes, genes y regiones genómicas (Vawter y Brown, 1986; Arbogast et al. 2002). En consecuencia, la idea de reloj universal ha sido remplazada por la de “relojes locales” aplicable a ciertos genes de taxa cercanamente relacionados (Swofford et al. 1996; Yoder y Yang 2000). La

idea de utilizar este tipo de relojes parte de la premisa de que las diferencias en el tamaño poblacional, la tasa metabólica, el tiempo de generación y la eficiencia en la reparación del ADN deben ser similares en especies estrechamente relacionadas, por lo cual las tasas de evolución molecular también deben ser similares (Martín y Palumbi 1993; Rand 1994). De hecho, se ha propuesto que las diferencias en esos factores podrían ser responsables de la divergencia en las tasas evolutivas entre linajes (Thorne et al. 1998).

Este capítulo tiene como objetivo determinar los patrones filogeográficos del complejo *Caesalpinia hintonii* formado por especies estrechamente relacionadas, pero con diferencias en sus hábitos ecológicos. Las especies que conforman dicho complejo son un modelo interesante pues se encuentran filogenéticamente relacionadas. La densidad de las poblaciones de las especies del complejo es baja, se distribuyen de manera aislada a lo largo de la Depresión del Balsas y el valle de Tehuacán-Cuicatlán. *Caesalpinia hintonii* y *C. macvaughii* crecen en superficies rocosas mientras que *C. epifanioi* crece en laderas de suelos calcáreos y conglomerados en selvas bajas caducifolias cercanas al Río Balsas. *Caesalpinia oyamae* habita en selvas bajas caducifolias en superficies rocosas sobre suelos calcáreos o de conglomerados y *C. melanadenia* se desarrolla en zonas secas y bosques espinosos en arroyos de arena o zonas calcáreas (Contreras, 1991; Lewis, 1998; Sotuyo y Lewis, 2007). La morfología floral de todas ellas es similar lo que ha originado problemas para circunscribirlas (Sotuyo et al., 2004) y las abejas que visitan sus flores pertenecen a las mismas especies *Centris (Xerocentris) nitida*, *Xylocopa mexicanorum* y un taxón no identificado (R. Ayala com pers.). Lo anterior podría suponer la probabilidad de flujo génico entre ellas.

En el presente estudio se determinó la estructura genética poblacional de todas las especies del complejo *C. hintonii* localizadas en la Depresión del Balsas y el valle de Tehuacán-Cuicatlán. Se incluyó *C. pannosa*, especie hermana del complejo distribuida en la Península de Baja California. Así mismo, se estimó el tiempo de divergencia de *C. pannosa* la especie hermana del complejo *C. hintonii*, y se estimó la edad del complejo como un indicador temporal e hipotetizar qué tan reciente fue la diversificación de este grupo. De la misma manera calculamos la edad de los linajes encontrados por Sotuyo et al. (en prensa) en las porciones oriental y occidental de la Depresión del Balsas. Todas las edades obtenidas trataron de asociarse con algún evento geológico ocurrido dentro de la Planicie Morfotectónica de la Sierra Madre del Sur.

Materiales y Métodos

El ADN total se aisló de material vegetal congelado, hojas preservadas en silica gel o ejemplares de herbario empleando el protocolo 2×CTAB miniprep (Doyle y Doyle, 1987). La PCR fue empleada para amplificar el intrón *trnL* y los espaciadores *trnL-F* (Taberlet et al., 1991), *psbA-trnH* (Hamilton, 1999) y *accD-psaI* (Mendenhall, 1994). Los programas de amplificación se muestran en el Apéndice II. Todas las secuencias fueron depositadas en el **GeneBank**® bajo los números **DQ208712-DQ208930**.

Estructura genética y estimaciones de flujo génico

El programa DnaSP (DNA Sequence Polymorphism, versión 3.99; Rozas y Rozas, 2003) se utilizó para la mayoría de los análisis. El polimorfismo nucleotídico fue estimado como: S (sitios variables únicos), K (número promedio de diferencias nucleotídicas apareadas), π (diversidad nucleotídica, Nei, 1987). La diversidad nucleotídica es la probabilidad de que dos nucleótidos con homología de posición tomados al azar sean diferentes; es equivalente a la diversidad genética a nivel nucleótido [Tajima (1983) ecuación A3 y Nei 1987 ecuación 10.5].

$$\pi_n = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j<i} P_i P_j d_{ij}}{L} \quad \text{y la varianza} \quad V(\pi_n) = \frac{n+1}{3(n-1)L} \pi_n + \frac{2(n^2+n+3)}{9n(n-1)} \pi_n^2$$

donde: L es el número de loci (nucleótidos) en los haplotipos analizados.

También fueron calculados h (número de haplotipos) y H_d (diversidad haplotídica). La diversidad haplotídica es equivalente a la heterocigosis esperada obtenida con marcadores de diploides, se define como la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar de una población sean diferentes [(Nei 1987) ecuación 8.4].

$$H = \frac{n}{n-1} \left(\sum_{i=1}^k 1 - pi^2 \right)$$

y la varianza se calcula como:

$$V(H) = \frac{2}{n(n-1)} \left\{ 2(n-2) \left[\sum_{i=j}^k Pi^3 - \left(\sum_{i=1}^k Pi^2 \right)^2 \right] + \sum_{i=1}^k Pi^2 - \left(\sum_{i=1}^k Pi^2 \right)^2 \right\}$$

donde H es la diversidad genética, $V(H)$ la varianza de la diversidad genética, n el número de copias de genes en la muestra, k el número de haplotipos y Pi la frecuencia del i ésimo haplotipo en la muestra.

La diferenciación genética entre poblaciones fue estimada mediante el número promedio de diferencias nucleotídicas por sitios entre las poblaciones (D_{xy} , Nei, 1987). Los estadísticos haplotípicos H_s y K_s de acuerdo con Hudson et al. (1992), K_{xy} y el número neto de sustituciones nucleotídicas por sitio entre poblaciones (D_a), también se calcularon (Nei, 1987). Se realizó un análisis de permutación (Hudson et al., 1992) para determinar cuando las poblaciones se encontraban significativamente diferenciadas.

Las estimaciones de flujo génico se realizaron mediante el F_{ST} (Hudson et al., 1992) para evaluar el número de migrantes entre poblaciones (N_m). Empleamos una aproximación jerárquica (AMOVA; Excoffier et al., 1992) para calcular la varianza molecular en el complejo *C. hintonii* utilizando el programa ARLEQUIN versión 2000 (Schneider et al., 2000). Este análisis emplea además de las frecuencias génicas el número de mutaciones que ocurren entre haplotipos empleando un análisis jerárquico evaluando las diferencias dentro y entre individuos de una subpoblación y entre subpoblaciones, definiendo los índices de fijación (Wright, 1965) en función de los coeficientes de endogamia, y tiempos de coalescencia (Slatkin, 1991).

$$F_{st} = \frac{f_0 - f_1}{1 - f_1} = \frac{\bar{t}_1 - \bar{t}_0}{\bar{t}_1}$$

Donde f_0 es la probabilidad de que dos genes tomados de la misma población sean idénticos por descendencia; f_1 es la probabilidad de que dos genes tomados de diferentes poblaciones sean idénticos por descendencia; \bar{t}_1 es el tiempo promedio a la coalescencia de dos genes tomados de diferentes poblaciones y \bar{t}_0 el tiempo promedio a la coalescencia de dos genes tomados al azar en una misma población.

Para el análisis se obtuvieron los valores de F_{st} (Φ_{st}) a partir de distintas agrupaciones de los datos poblacionales y entre especies, para evaluar si hay diferencias significativas entre ellas: a) poblaciones de *Caesalpinia oyamae* vs *C. hintonii* de la Depresión del Balsas; b) todas las poblaciones de *C. hintonii* vs *C. macvaughii*; c) *C. oyamae* vs *C. epifanioi* y *C. melanadenia*; d) *C. hintonii* vs *C. macvaughii*, e) *C. macvaughii* vs *C. epifanioi* y *C. melanadenia* respectivamente. Por limitaciones del programa no se pudieron obtener valores globales de AMOVA y fueron calculados para cada una de las regiones de plastidio por separado.

Redes de haplotipos

Utilizamos el programa NETWORK versión 4.2.0.0 (Polzin y Daneschmand, 2003, <http://www.fluxus-engineering.com>) asignando pesos iguales a todos los sitios variables y con los valores predeterminados para el parámetro Epsilon ($\epsilon=0$) para estimar el número máximo de diferencias entre haplotipos. Para cada uno de esos grupos identificados, la diferencia inter-haplotípica se representa por redes, *median networks* (Bandelt et al., 1999). La matriz de haplotipos se generó utilizando el programa DnaSP (Rozas y Rozas, 2003). Las inserciones/delecciones o *indels* no fueron considerados para el análisis, aunque se

entiende que después de efectuado el análisis de secuencias cierto polimorfismo en los indels provee apoyo adicional a los grupos, es decir las redes construidas son congruentes con los grupos de indels.

Calibración molecular

Para este análisis se empleo la matriz y árboles generados para 175 taxa del género *Caesalpinia sensu lato* con secuencias del intrón *trnL* y el espaciador *trnL-F* (S. Sotuyo et al. datos no publicados). Hicimos la estimación del tiempo de divergencia del complejo *C. hintonii* empleando el método *nonparametric rate smoothing* (NPRS) de Sanderson (1997). El método NPRS produce árboles ultramétricos, asumiendo que las tasas evolutivas están correlacionadas en el tiempo (Sanderson, 1997). Esto significa que las tasas de sustitución son heredadas y que los límites de la tasa de cambios son dictados por los ancestros (Sanderson, 1997). Para cada rama en un árbol determinado, se estima la tasa local de evolución molecular y subsecuentemente la suma de las diferencias entre las tasas de estimación locales son minimizadas para las ramas ancestrales y descendientes a lo largo de todo el árbol.

El modelo de evolución que mejor se ajustaba a las diferentes particiones se determinó con el criterio de información de Akaike (Akaike, 1973) con ayuda del programa MODELTEST versión 3.06 (Posada y Crandall, 1998) en conjunción con PAUP (Swofford, 1998). Para estimar las topologías y largo óptimo de ramas se utilizó el criterio de máxima verosimilitud (ML), se calculó el *likelihood ratio test statistic* ($\delta = -2 \log \Lambda$) y el valor de P asociado haciendo la estimación de a cuál modelo de sustitución se ajusta mejor a cada grupo de datos probando 56 modelos de evolución de manera jerárquica. Una vez elegido el modelo de ML, se evaluó empleando el *LR test* ($\Lambda = |2 \times LR|$; Felsenstein 1981). El

estadístico es dos veces la diferencia de el log del likelihood del largo de las ramas entre la tasa del árbol forzando al reloj molecular y el árbol que no ha sido forzado. Los grados de libertad se calculan como la diferencia entre el número de ramas en el árbol no enraizado sin forzar el reloj molecular ($2n-3$) y el número de nodos en el árbol donde se forzó el reloj molecular ($n-1$). Si el log del likelihood es más grande que el 95% de la distribución de X^2 la hipótesis del reloj molecular debe desecharse. Posteriormente los árboles de ML se utilizaron en el programa TreeEdit versión 1.0 alfa 4-61 (Rambaut y Charleston, 2000) para generar los árboles ultramétricos. Finalmente para calcular el error estándar en el tiempo de divergencia (causado por el muestreo de un número finito de caracteres), 100 matrices bootstrap fueron generadas utilizando PAUP. La distribución de las tasas de divergencia se obtuvieron a partir de 100 árboles ultramétricos generados con dichas matrices.

Caesalpinia no posee un rico registro fósil debido a su escasa preservación y la carencia de estructuras morfológicas diagnósticas para el grupo (Herendeen y Crane 1992). Dado que con fósiles recientes (e. g. *C. spokaneensis* \approx 16.5-17 Ma) no existe certeza de la posición del árbol donde deben establecerse los puntos de calibración internos, las calibraciones se hicieron con puntos externos de calibración al grupo Poincianella, a donde pertenece el complejo *C. hintonii* utilizando dos fósiles: *C. claibornensis* (Eoceno, \approx 45 Ma) y *C. flumen-viridensis* (Eoceno, \approx 45 Ma) pertenecientes al subgénero *Mezoneuron* (Herendeen 1992, Herendeen & Crane 1992).

Resultados

Diversidad nucleotídica

La diversidad haplotídica (H_d) dentro del complejo *C. hintonii* (Cuadro 5.1) oscila entre 0.643 en la población Zicuítaro de *C. hintonii* a 1 en las poblaciones de Valerio Trujano, Tehuizingo (*C. oyamae*) y Playa Azul (*C. hintonii*); así como en *C. melanadenia*, *C. epifanioi* y *C. pannosa*. La diversidad nucleotídica (π) dentro de las poblaciones varió de 0.010 en Playa Azul (*C. hintonii*) y Zirándaro (*C. macvaughii*), a 0.006 en Huajuapán (*C. oyamae*). Por tanto, *Caesalpinia oyamae* posee mayor diversidad haplotídica y nucleotídica ($H_d=0.980$, $\pi=0.006$) que *C. hintonii* ($H_d=0.787$, $\pi=0.002$).

El número promedio de diferencias nucleotídicas (K) en *C. oyamae* varió entre 2.667 en Tlayahualco y 7.524 en Valerio Trujano, y en *C. hintonii* variaron de 3.750 en Zicuítaro y 9 en Playa Azul. Entre las especies, *C. macvaughii* tiene el valor más alto de diferencias nucleotídicas ($K=11.524$) y *C. melanadenia*, el más bajo ($K=3.8$).

Estructura genética y flujo génico

El flujo génico entre *C. hintonii* y *C. oyamae* es bajo ($N_m=0.26$), las poblaciones de ambas especies están genéticamente diferenciadas ($F_{ST}=0.661$) y el intercambio de migrantes es menor a un individuo por generación ($N_m=0.26$). Aproximadamente el 72% de la variación molecular en *C. oyamae* puede atribuirse a las diferencias entre poblaciones (valores de F_{ST}) y el flujo génico bajo (0.19). Los valores F_{ST} para todas las comparaciones entre poblaciones de *C. oyamae* fueron altos excepto para el par Tlayahualco-Tehuizingo ($F_{ST}=0.340$). El flujo génico estimado entre las poblaciones de *C. oyamae* excluyendo Valerio Trujano mostraron diferenciación ($F_{ST}=0.709$) y bajos valores de flujo génico

($N_m = 0.10$), excepto para el par Tlayahualco-Tehuizingo ($N_m = 1.35$). Zicuítaro e Infiernillo (*C. hintonii*) poseen un valor alto de flujo génico entre ellas ($N_m = 2.51$) y no presentan diferenciación a nivel molecular ($F_{ST} = 0.021$) (Cuadro 5.2).

Cuadro 5.1- Análisis de la diversidad genética para el complejo *Caesalpinia hintonii*. N- número de individuos usados, P- sitios variables (polimórficos), S- sitios variables únicos, h- número de haplotipos, Hd- diversidad haplotípica, π - diversidad nucleotídica y K- promedio de diferencias nucleotídicas

Especies/Población	N	P	S	h	Hd	π	K
<i>C. oyamae</i>	25	58	25	20	0.980	0.006	10.520
Valerio Trujano	7	19	8	7	1.0	0.003	7.524
Tehuizingo	5	10	8	5	1.0	0.002	4.400
Tlayahualco	9	10	8	7	0.917	0.001	2.667
Huajuapán	4	19	12	3	0.833	0.006	10.667
<i>C. hintonii</i>	17	17	15	9	0.787	0.002	2.206
Infiernillo	7	24	23	6	0.952	0.004	7.048
Zicuítaro	8	15	15	4	0.643	0.002	3.750
Playa Azul	2	9	9	2	1.0	0.010	9.0
<i>C. macvaughii</i>	10	0	0	1	0.905	0.006	11.524
Descansadero	3	25	25	2	0.667	0.009	16.667
La Huacana/San Francisco	3	0	0	1	-	-	-
Zirándaro	4	37	36	3	0.833	0.010	18.667
<i>C. melanadenia</i>	5	9	8	5	1.0	0.001	3.8
<i>C. epifanioi</i>	6	12	7	6	1.0	0.002	5.067
<i>C. pannosa</i>	12	32	11	12	1.0	0.004	9.591

Las comparaciones pareadas de AMOVA (Cuadro 5.3) entre *C. hintonii* y *C. oyamae* indican una estructura genética significativa entre ellas para todos los marcadores de plastidio ($\Phi_{ST} = 0.314$ *trnL*, $\Phi_{ST} = 0.363$ *trnL-F*, $\Phi_{ST} = 0.982$ *psbA-trnH*). Se estimó el Φ_{ST} entre Valerio Trujano y las otras poblaciones de *C. oyamae* debido a la separación filogenética que mostraron entre ellas. Todos los valores revelaron un patrón significativo de estructura genética ($\Phi_{ST} = 0.577$ *accD-psaI*- $\Phi_{ST} = 0.936$ *psbA-trnH*).

Todas las especies son genéticamente distintas una de la otra. Los AMOVA para todo el complejo *C. hintonii* indican que la especie *C. hintonii* es diferente de *C.*

macvaughii ($\Phi_{ST}=0.631$ *accD-psaI*- $\Phi_{ST}=0.731$ *trnL*). Las poblaciones de *C. oyamae* son diferentes de *C. melanadenia* ($\Phi_{ST}=0.432$ *accD-psaI* a $\Phi_{ST}=0.928$ *psbA-trnH*), así como de *C. epifanioi* ($\Phi_{ST}=0.428$ *trnL* a $\Phi_{ST}=0.912$ *psbA-trnH*).

Cuadro 5.2- Diferenciación genética y estimaciones de flujo génico entre pares de poblaciones de *Caesalpinia*. Hs estadístico basado en los haplotipos; Ks estadístico basado en nucleótidos (Hudson et al., 1992) ; Kxy, Dxy- numero promedio de sustituciones nucleotídicas por sitio entre poblaciones; Da- número neto de sustituciones nucleotídicas por sitio entre poblaciones. Medidas de flujo génico (F_{ST} , Nm).

Poblacion 1	Poblacion 2	Hs	Ks	Kxy	Dxy	Da	F_{ST}	Nm
<i>C. oyamae</i>		0.948	1.547*				0.638	0.28
Valerio Trujano	Tlayahualco	0.931	4.375	18.571	0.010	0.007	0.729	0.19
Valerio Trujano	Tehuiztingo	0.970	5.666	19.514	0.010	0.007	0.691	0.22
Valerio Trujano	Huajuapán	0.960	8.4	39.523	0.022	0.016	0.726	0.16
Tlayahualco	Tehuiztingo	0.941	3.285	5.355	0.002	0.001	0.27	1.35
Tlayahualco	Huajuapán	0.927	5.166	30.666	0.017	0.012	0.531	0.17
Tehuiztingo	Huajuapán	1	7.5	31.8	0.017	0.012	0.477	0.18
<i>C. hintonii</i>		0.803	3.178				0.021	22.25
Infiernillo	Zicuítaro	0.958	5.873	6.089	0.003	0.000	0.021	2.51
<i>C. macvaughii</i>		0.777	2.406*				0.261	1.41
Descansadero	Zirándaro	0.777	17.809	23.916	0.013	0.003	0.261	1.41
<i>C. hintonii</i>	<i>C. oyamae</i>	0.976*	12.088*	34.107	0.019	0.012	0.661	0.26
<i>C. macvaughii</i>	<i>C. hintonii</i>	0.798	1.661*				0.466	0.57
Descansadero	Infiernillo	0.921	11.558	24.166	0.013	0.006	0.455	0.48
Descansadero	Zicuítaro	0.646	7.272	21.291	0.012	0.006	0.520	0.42
Zirándaro	Infiernillo	0.931	12.650	29.437	0.016	0.008	0.519	0.46
Zirándaro	Zicuítaro	0.690	8.722	30.875	0.017	0.011	0.636	0.28

Chi-cuadrada y probabilidad obtenida por permutación con 1000 replicas; * 0.01<P<0.05; ** 0.001<P<0.01; *** P<0.001

El análisis de distribución “mismatch” por pares es multimodal sugiriendo que hubo al menos dos crecimientos poblacionales y que las poblaciones estuvieron sujetas a expansiones posteriores. La distribución bimodal probablemente representa subdivisión poblacional. El mismo análisis sugiere que las poblaciones de la porción oeste estuvieron sujetas a condiciones más estables que las de la porción este de la Depresión. Para el caso de *C. pannosa* obtuvimos una distribución “mismatch” en forma de campana (Fig 5.2).

Cuadro 5.3 Análisis de varianza molecular (estadísticos Φ) en el complejo *C. hintonii*. Las distancias genéticas entre los haplotipos se calcularon de acuerdo a los estadísticos F a partir de las frecuencias haplotípicas. Para evaluar si los índices de fijación eran significativos se realizaron 10,000 permutaciones no paramétricas en los grupos, poblaciones y haplotipos. *P<0.0001. Todos los valores fueron calculados en Arlequín (Schneider et al. 2000). CEP= *C. epifanioi*, CH= *C. hintonii*, CMC= *C. macvaughii*, CME=C. *melanadenia* y CO= *C. oyamae*.**

Región	CH vs CO	CH vs CMC	CH vs CE	CH vs CME	CH vs CMC	CO vs CME	CO vs CEP	CMC vs CME	CMC vs CE
<i>trnL</i>									
Φ_{CT}	0.150	0.077	-0.196	-0.026	0.498	0.030	-0.181***	0.600	0.509
Φ_{SC}	0.193	0.718*	0.725***	0.747***	0.464***	0.550***	0.516***	0.697	0.495
Φ_{ST}	0.314***	0.740***	0.671***	0.741***	0.731***	0.564***	0.428***	0.879***	0.752***
<i>trnL-F</i>									
Φ_{CT}	0.027	0.298	-0.158	-0.300	0.233	0.169	0.370	0.934	0.940
Φ_{SC}	0.345***	0.908***	0.919***	0.917***	0.366	0.796***	0.805***	0.136	0.173
Φ_{ST}	0.363***	0.935***	0.907***	0.892***	0.514	0.831***	0.877***	0.943***	0.950***
<i>accD-psaI</i>									
Φ_{CT}	0***	0.655	0.036	-0.264	0.490	-0.193	0.223	0.034	0.169
Φ_{SC}	0***	0.655***	0.712***	0.687***	0.277	0.524***	0.565	0.326	0.443
Φ_{ST}	0***	0.656***	0.723***	0.605***	0.631***	0.432***	0.662	0.349	0.537***
<i>psbA-trnH</i>									
Φ_{CT}	0.720	0.188	-0.240	-0.260	0.279	-0.820	-0.861	-0.240	0.949
Φ_{SC}	0.935***	0.958***	0.972***	0.975***	0.329	0.960***	0.953***	0.972***	0.095
Φ_{ST}	0.982***	0.966***	0.966***	0.969***	0.516	0.928***	0.912***	0.966***	0.954***

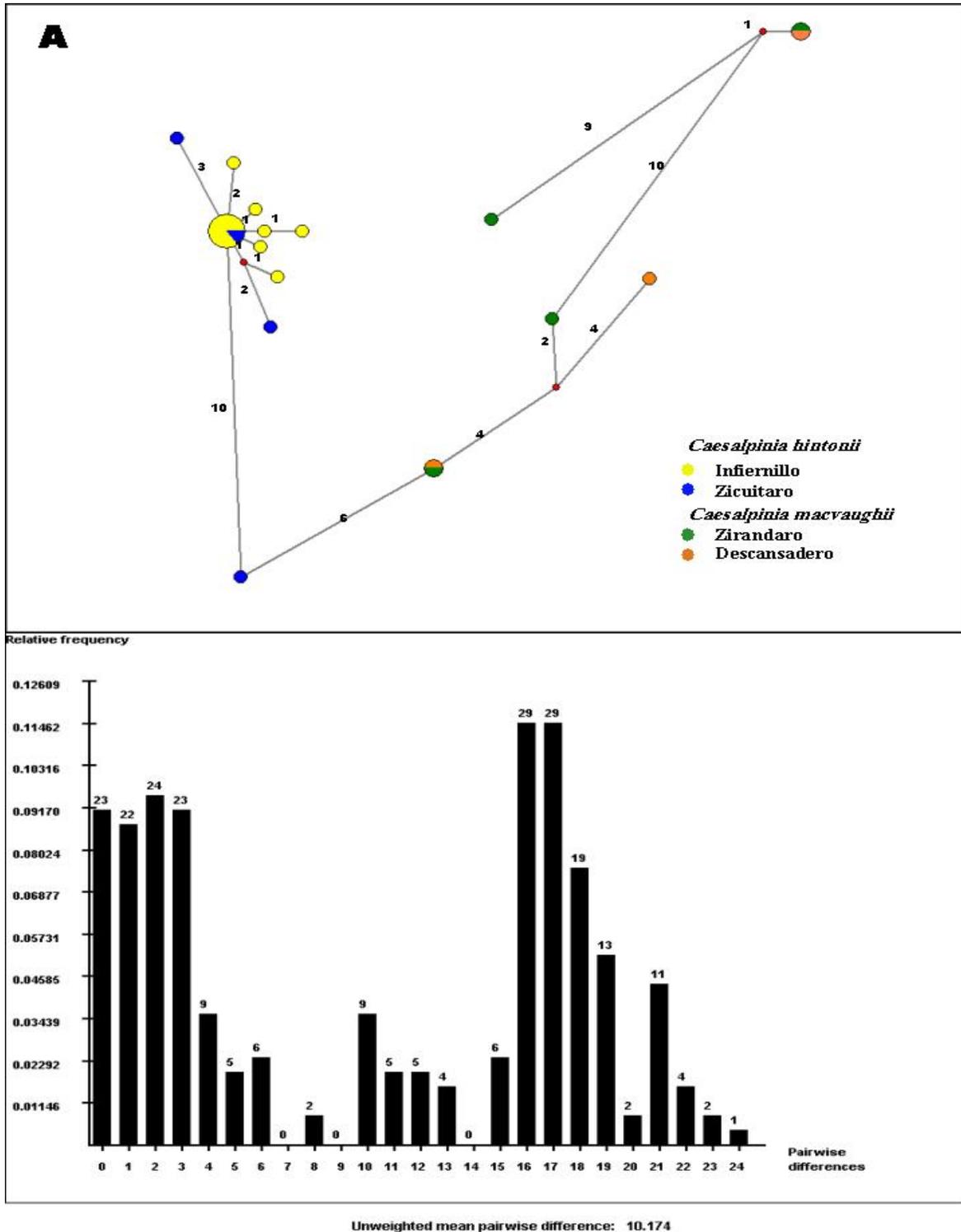


Figura 2- Redes de haplotipos y análisis de distribución mismatch generados para las especies del complejo *Caesalpinia hintonii* y el grupo hermano *C. pannosa*. A. porción oeste de la Depresión del Río Balsas. B. porción este de la Depresión del Río Balsas. C. *C. pannosa*, Península de Baja California. Los puntos rojos corresponden a haplotipos extintos o no muestreados. El tamaño de los círculos son proporcionales a la frecuencia de haplotipos. Los números sobre o debajo de las líneas son el número de sustituciones.

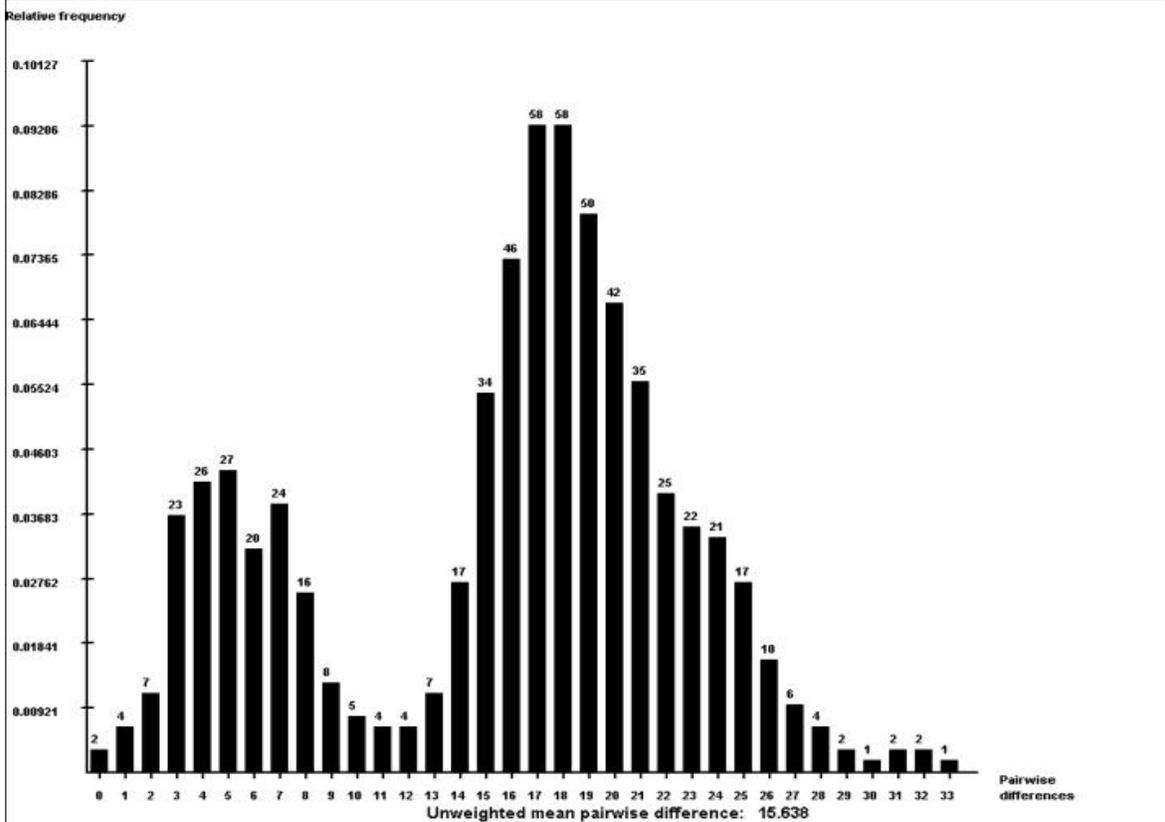
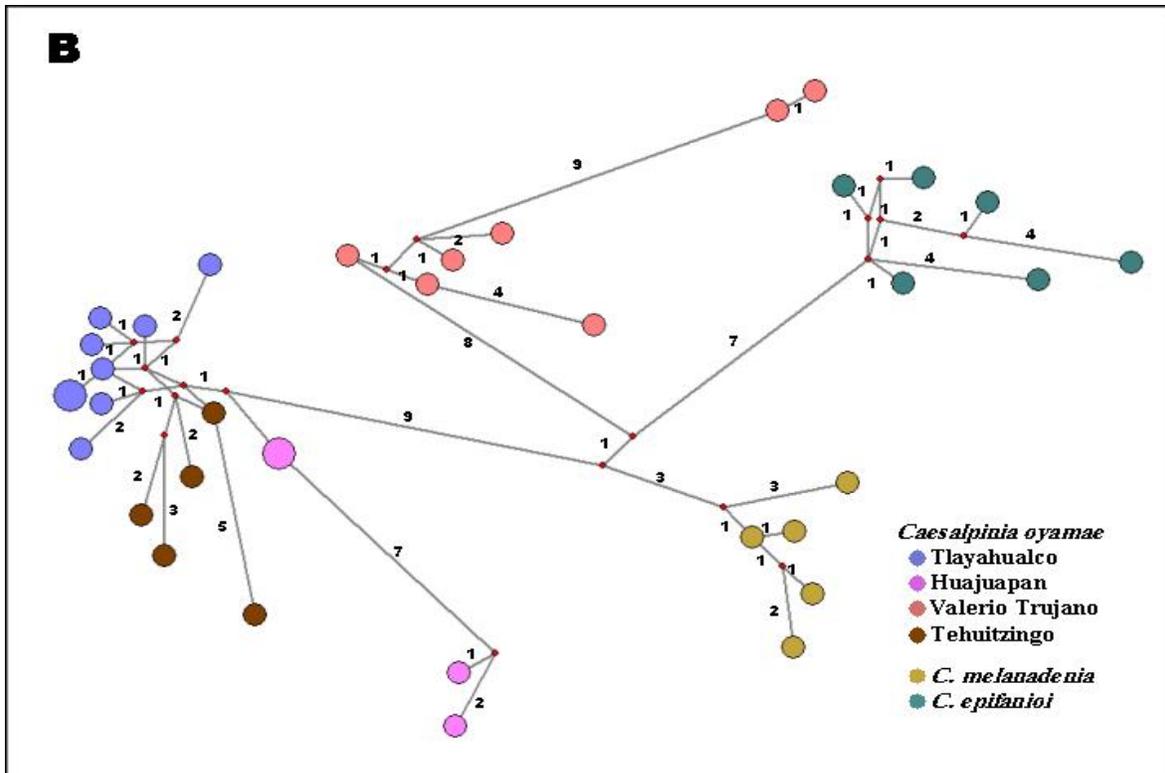
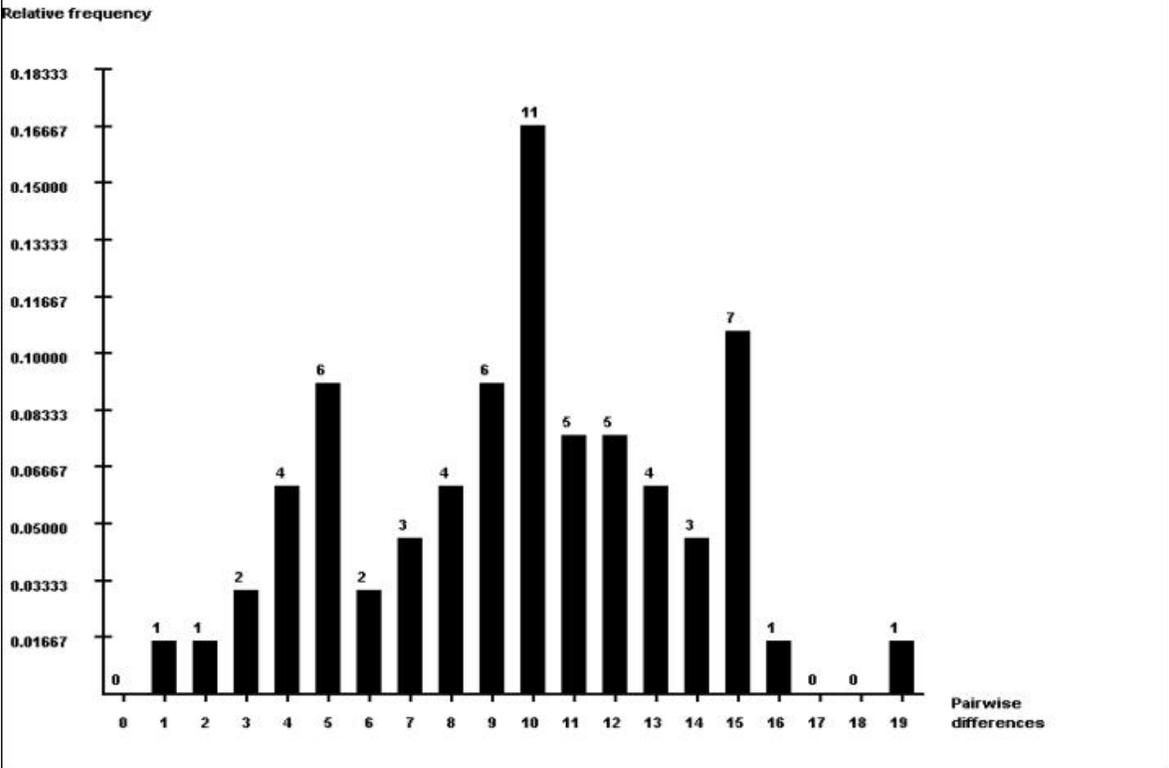
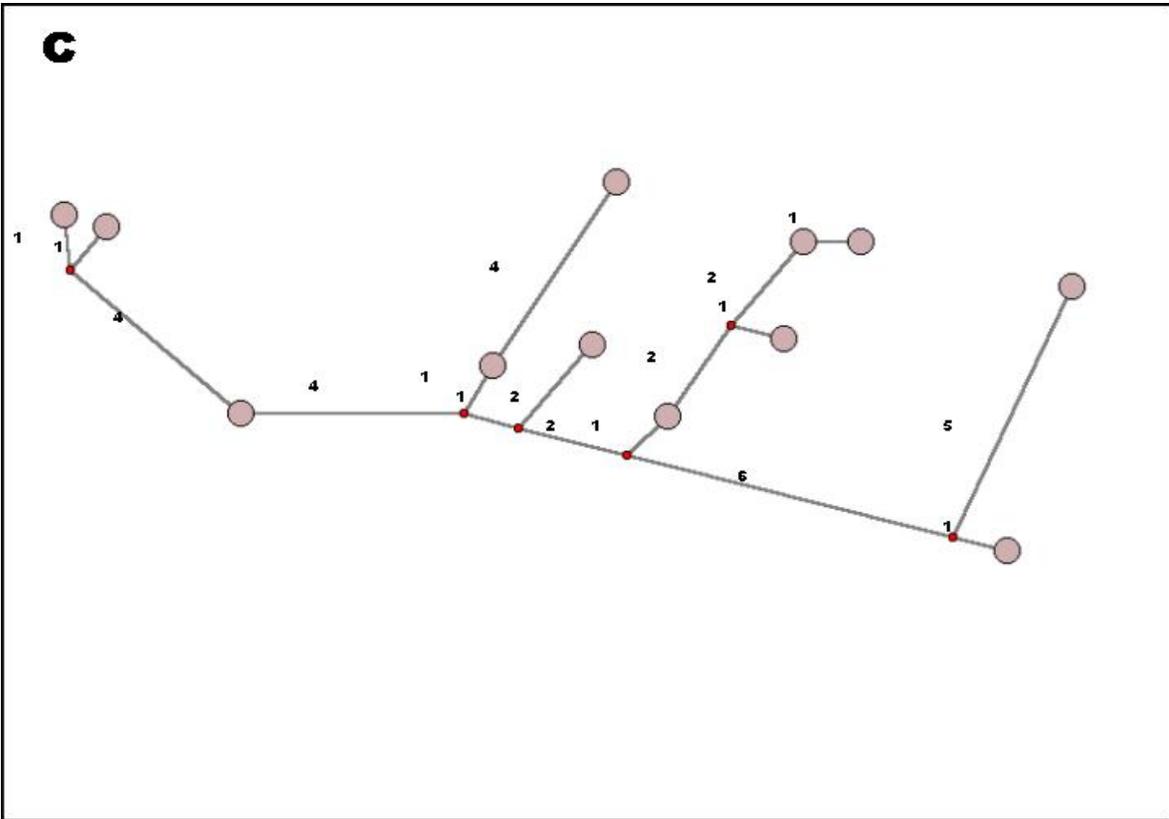


Figura 2B



Unweighted mean pairwise difference: 9.591

Figura 2C

Redes de haplotipos

Porción oeste de la Planicie Morfotectónica de la Sierra Madre del Sur

Se encontraron 14 haplotipos para los 23 individuos de las dos especies analizadas (*C. hintonii* y *C. macvaughii*); el número de mutaciones en el árbol más corto fue de 59. Los individuos de las poblaciones Infiernillo y Zicuítaro de *C. hintonii* son los que presentaron el menor número de cambios mutacionales entre ellos, compartiendo haplotipos. Los individuos de las poblaciones Zirándaro y Descansadero de *C. macvaughii* presentaron el mayor número de cambios entre individuos (Fig 5.2A).

Porción este de la Planicie Morfotectónica de la Sierra Madre del Sur

Se encontraron 32 haplotipos en las tres especies de *Caesalpinia* (*C. epifanoi*, *C. melanadenia* y *C. oyamae*) evaluando 36 individuos; el número de mutaciones en el árbol más corto fue de 134. Los individuos de la población Huajuapán (Oaxaca) de *C. oyamae* son los que presentan el mayor número de cambios mutacionales entre sí, mientras que la población Tlayahualco (Guerrero) es la que muestra el menor número de cambios entre individuos. No se compartieron haplotipos entre las diferentes poblaciones y especies. La red de haplotipos muestra la separación de la población Valerio Trujano (Guerrero) de *C. oyamae* de las otras poblaciones de su misma especie por 18 pasos mutacionales (Fig 5.2B).

Origen del complejo *C. hintonii*

El análisis de secuencias de las regiones de plastidio dió como resultado árboles con $L=1107$, $CI=0.78$ y $RI=0.74$ (Fig 5.3). El modelo que más se ajustó a los datos obtenidos fue TVM+I+G (frecuencia de las bases variable, transversiones variables y transiciones iguales con distribución gamma y sitios invariables) con los siguientes parámetros: $LsetBase=(0.3494\ 0.1681\ 0.1535)$, $Nst=6$, $Rmat=(0.8216\ 1.6176\ 0.2751\ 0.7493\ 1.6176)$,

Rates=gamma shape=0.6267, Pinvar=0.2423. La estimación de las frecuencias de las bases fueron A:0.339290; C:0.172620; G:0.171272; T:0.316818. El $-\ln\text{likelihood}$ =0.3150.33587 y la proporción de sitios invariables fue de 0.792. La hipótesis del reloj molecular (hipótesis nula) fue rechazada.

La edad estimada del ancestro del complejo y *C. pannosa* fue de 27.83 millones de años (Ma). (Cnaudroniano, Oligoceno), la edad del complejo *C. hintonii* se estimó en 22.11 Ma. (Aquitano, Arikareano, Mioceno), mientras que la divergencia del ancestro de *C. pannosa* se estimó en 24.19 Ma. (Orellano-Witneyano, Oligoceno) (Fig. 5.3).

Finalmente la edad aproximada en la que los linajes del complejo *C. hintonii* fueron separados en las porciones oriental y occidental del Balsas ocurrió hace 20.35 Ma (Burdigaliano, Mioceno) y 19.84 Ma. (Burdigaliano, Mioceno), respectivamente.

En la porción occidental de la Depresión las edades fueron 16.56 Ma (Burdigaliano, Mioceno) para *C. epifanioi*, 14.8 Ma (Langhiano, Mioceno) en *C. oyamae* y 6.98 Ma (Messiano, Mioceno) para *C. melanadenia* del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. En la porción oriental del Balsas la edad para *C. hintonii* fue de 6.83 Ma (Messiano, Mioceno) y para los dos linajes de *C. macvaughii* las edades fueron 8.36 Ma (Zirándaro de los Chávez, Guerrero) y 8.65 Ma (Descansadero, Nueva Italia, San Francisco y la Huacana, Michoacán), ambas edades pertenecen al Tortonian, Mioceno.

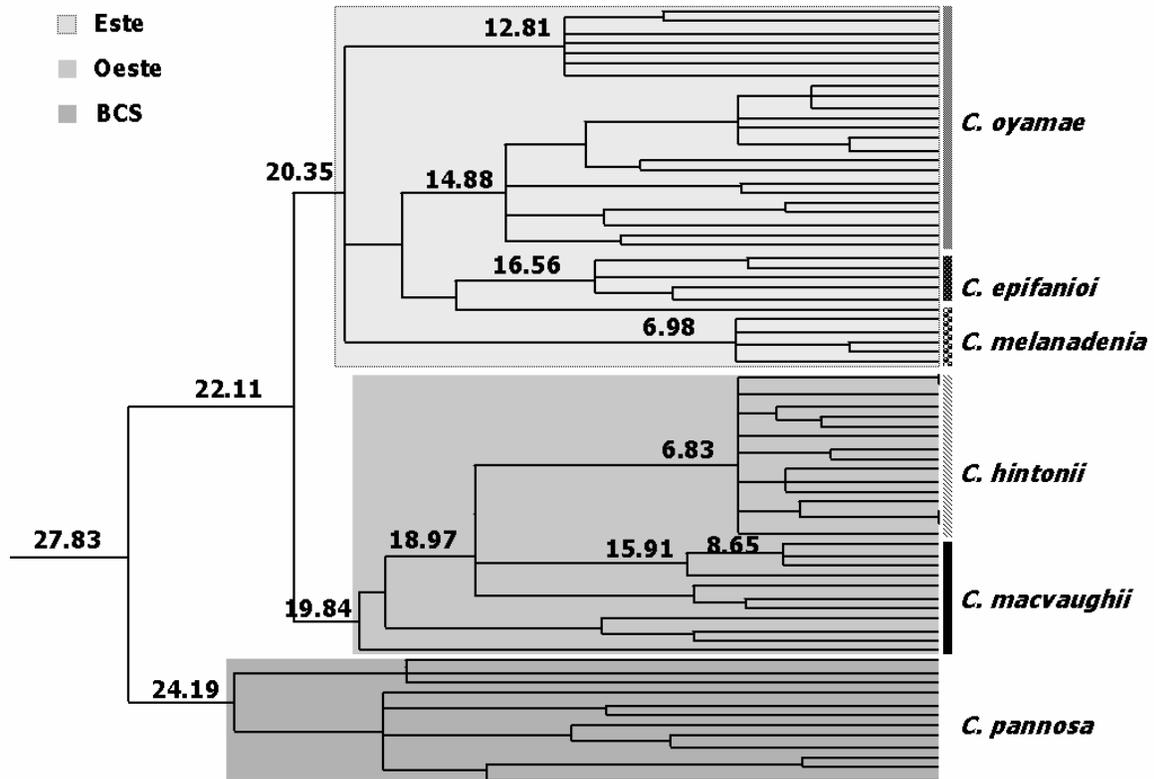


Figura 3- Árbol NPRS del complejo *Caesalpinia hintonii* y *C. pannosa* donde se muestran las edades aproximadas de divergencia de las distintas especies y poblaciones; así como, la separación de las dos porciones de la Depresión del Río Balsas y Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

Discusión

Asociación de la estructura geográfica y los factores históricos

La red de haplotipos claramente muestra que las poblaciones de *C. oyamae* están separadas en tres linajes que no sobrelapan sus distribuciones geográficas. La estructura geográfica está bien apoyada por el 72 % del total de la variación en las cuatro regiones de plastidio (análisis de AMOVA) y es claro que existe escasa variabilidad entre poblaciones dentro de cada uno de esos linajes (6%). El AMOVA y la diferenciación genética indican que existe diferenciación significativa entre las distintas poblaciones de *C. oyamae*; así mismo, el flujo génico es restringido en poblaciones como Valerio Trujano y Huajuapán encontrándose dos linajes divergentes en donde el flujo génico entre ellos es lo suficientemente raro como para evitar homogenización de la poza génica. Los niveles de flujo génico inferidos pueden ser el resultado de la interacción entre diversos factores bióticos, así como selección diferencial de los polinizadores. Dichos valores de flujo génico probablemente no ha sido suficiente para evitar la divergencia poblacional.

En la porción Este aunque el patrón general es bimodal se pueden distinguir tres tipos de picos en la distribución “mismatch” (Fig 5.2), lo que nos daría tres grupos en las comparaciones pareadas. El patrón refleja que se encontraron divergencias dentro y entre secuencias. Una posible interpretación de este patrón es un antiguo aislamiento entre cada uno de los grupos, estructuración y por lo menos un cuello de botella. Un patrón de alopatría a través del tiempo (poblaciones separadas) produciría una distribución “mismatch” bimodal. El patrón alopatrico junto con los valores de F_{st} indican también la estructuración poblacional.

En el caso de *C. pannosa*, la distribución “mismatch” en forma de campana, es característica de poblaciones que sufrieron expansiones. La especie es polimórfica variando

en tamaño, indumento y densidad de las glándulas; bajo el nombre de *C. pannosa* se sinonimizaron *C. arenosa*, *C. californica* y *C. mexicana* var. *californica* que se distribuyen desde San José del Cabo hasta Comondú (Lewis, 1998). Es ya sabido que la región del Cabo y el resto de la Península tienen orígenes distintos, así como que hubo una expansión de los desiertos de la parte media de la Península hacia las zonas del sur (Grismer, 1994) lo que seguramente ha repercutido en el polimorfismo encontrado en la especie.

Sin embargo, los resultados encontrados son similares a los de Riddle et al. (2000) en vertebrados de la Península de Baja California, donde ellos encontraron taxa crípticos geográficamente separados en la Península. Esta coincidencia en los mismos resultados sugieren que los cambios climáticos pueden haber dejado similitudes en los patrones de fragmentación y rutas de migración en las especies de zonas desérticas así como en las de bosques secos de la Península. Estudios filogeográficos en vertebrados de los desiertos cálidos de México muestran eventos históricos repetidos de divergencia consistentes con los eventos vicariantes propuestos desde el Mioceno hasta el Pleistoceno temprano (Schmidtly et al., 1993; Riddle y Hafner, 2006). *Caesalpinia pannosa* es parte de una de esas interrupciones filogeográficas al ser el taxa hermano del complejo *C. hintonii*. Parecería que un evento mayor en el pasado ocasionó la divergencia genética en diversos miembros de la fauna y flora en Baja California. Debido a que la divergencia se ha encontrado en otros taxa (e.g., Riddle et al., 2000; Crews y Hedin, 2006) es probable que un solo evento vicariante o una serie de eventos estrechamente relacionados hayan ocurrido en la misma área.

La variación intra e inter específica de las regiones de plastidio fue alta en casi todas las poblaciones y especies de este complejo, acorde con la variación de ADN observada en especies que fueron afectadas por los cambios climáticos (Hewitt, 2000). La diversidad genética para las poblaciones y especies en ambos lados de la Depresión del Balsas y el valle

de Tehuacán–Cuicatlán es también alta acorde con lo que se espera para linajes que se diferenciaron en distintos refugios glaciares (Hewitt, 1996, 2000; Griswold y Baker, 2002). El clima en la Depresión del Balsas es diverso, existen una variedad de substratos y el tipo de plantas en cada región también varía (M. Sousa-Sánchez com. pers.). Si los patrones climáticos y/o el cambio de hábitat estuvieron involucrados en la disminución del flujo génico y las diferencias genéticas observadas ciertamente esto aún no es obvio.

La separación morfológica de las distintas especies es clara, pero la diferenciación de *C. oyamae* en distintos linajes no lo es pues no existen diferencias morfológicas evidentes para separarlos. Sin embargo, podríamos dar dos explicaciones para los patrones de divergencia observados. La primera hipótesis implicaría una barrera permanente entre las poblaciones de Valerio Trujano y las demás (Tehuizingo, Tlayahualco y Huajuapán); de tal modo que la vicarianza podría haber generado especiación. Bajo esta misma hipótesis, el patrón observado en *C. oyamae* es consistente con una reciente divergencia, ya que las diferencias morfológicas y moleculares aún no se han acentuado, lo que esperaríamos para taxa separados por tiempo atrás. La segunda hipótesis implica una barrera no permanente, aquí las diferencias en los patrones de divergencia deberían estar reflejando diferencias en habilidades de dispersión o de polen. Patrones de divergencia similares en taxa distribuidos en las mismas localidades podrían ayudarnos a discernir entre estas dos alternativas. Una evidencia a favor de una barrera permanente, es el hecho de que no podemos reconocer divergencia morfológica en las especies de esta región, mientras que las regiones de plastidio revelan una clara divergencia entre esos haplotipos.

Aislamiento periférico

De acuerdo con el modelo de especiación peripátrica, la deriva génica pudo haberse acentuado en la periferia de la distribución de la especie debido al tamaño poblacional

pequeño, el flujo génico restringido y la adaptación a condiciones subóptimas (Carson y Templeton, 1984). Dichas diferencias en el arreglo espacial y el número de individuos en la especie de la *Caesalpinia* ancestral pudieron haber desencadenado la divergencia de *C. epifanoi* y *C. melanadenia* y, la deriva génica pudo ser la responsable de acentuar las diferencias genéticas y morfológicas en estas especies. Los resultados del AMOVA y el aislamiento geográfico indican que el flujo génico entre estas especies y lo que se conoció como *C. hintonii sensu lato* (*C. hintonii* y *C. oyamae*) es bajo. De la misma manera, la población Valerio Trujano de *C. oyamae* muestra un patrón de estructura genética y bajos niveles de flujo génico con sus poblaciones conespecíficas, el cual fue probablemente suficiente para desencadenar la diferenciación mediada por deriva génica.

Origen del complejo *Caesalpinia hintonii*

Para explicar la formación del complejo *C. hintonii* se debe incluir un evento vicariante durante el cual se separan *C. pannosa* y el ancestro del complejo *C. hintonii* hace aproximadamente ~27.83 Ma, el evento coincide con la separación de la Península de Baja California del resto de México, en particular de la región centro-occidente, evento que posteriormente dará lugar al Golfo de California (10-5 Ma) por diversos eventos específicos en donde se formará el mar de Cortés separando la flora y fauna continentales de la Península de Baja California. Esta separación se acentuó con la formación de la Sierra Madre Occidental y Meseta mexicana así como, con los cambios climáticos del Pleistoceno y Holoceno.

Contrariamente a la premisa de que fue en el Cuaternario donde el complejo *C. hintonii* tuvo su origen, el fechamiento preliminar muestra que fue durante el Mioceno temprano (23.7-16.6 Ma) y hasta poco antes del Plioceno cuando las poblaciones y especies del complejo diversificaron. La divergencia y evolución del ancestro para ambos linajes

debió ocurrir al final de la formación de la Sierra Madre Occidental (32-28 Ma), cuando un intenso volcanismo explosivo (el más grande del Terciario), constituyó el altiplano de elevaciones superiores a los 2000 m con una dirección ~NNW-SSE desde la frontera con los EEUU en Sonora hasta Guadalajara, Jalisco. Este volcanismo se prolongó al sur de la Faja Volcánica Transmexicana (Eje Neovolcánico, FVTM) hasta la región de la Presa el Infiernillo (Ferrari et al., 2000; Ferrari et al., 2002).

En la Península de Baja California las poblaciones de la endémica *C. pannosa* divergieron originando el polimorfismo en tamaño, indumento y densidad de glándulas que conocemos ahora (Lewis, 1998). La Península de Baja California fue separada de tierra firme entre 15-4 millones de años atrás. La filogenia calibrada de *Bursera* sugiere que las especies residentes en esas zonas fueron separadas de sus congéneres antes de la separación de la Península de Baja California (Becerra, 2005). Lo mismo encontramos en *C. pannosa* (24.19) que fue separada antes de dicho evento vicariante.

Por su parte el complejo *C. hintonii* inició su divergencia, en la ya constituida Depresión del Río Balsas, hace 22.11 Ma. La Depresión posee dos tipos de geomorfología y de clima, pero no existe un evento geológico evidente para la separación de ambos linajes en la zona comprendida entre los 99° 36' y los 100° 51'. El volcanismo en esta región de separación terminó 30 Ma atrás y la deformación orogénica que provocó la formación de las montañas ~N-S (Sierra de Taxco-Teloloapan) en la zona data de hace 80-70 Ma (Cabral-Cano et al., 2000). Sin embargo, una posibilidad es que el levantamiento de una cadena montañosa que bordea la Cuenca del Balsas, al sur de esta región, haya influido sobre la divergencia. Dicho levantamiento, es de suma importancia, ya que en la zona se encuentran expuestas rocas que se formaron entre los 15-20 km de profundidad. Aunque no se conoce con precisión la edad en que fueron exhumadas estas rocas, reconstrucciones regionales

indican que debió haber ocurrido a principios del Mioceno (Aquitano, 23.7-20 Ma) lo que coincide con la edad estimada de divergencia en el complejo (Morán-Zenteno et al. 1996). Existen varios eventos del Mioceno medio (16-11 Ma) que coinciden con el establecimiento de la FVTM al norte de la región. Durante el Mioceno temprano la FVTM rota en sentido de las manecillas del reloj aproximadamente 30° aproximándose a Baja California (Ferrari et al., 1999) y el volcanismo se extiende hasta el noroeste de Oaxaca (Ferrusquía-Villafranca, 1988) y durante el Mioceno tardío (11.2-5.3) el arco de la FVTM alcanza una orientación estable. Esta barrera de dirección ~E-W causó un cambio de clima y probablemente generó microclimas más al sur influyendo en la divergencia poblacional de las distintas especies en la porción oriental y occidental del Balsas.

Eventos más recientes como la divergencia de *C. hintonii*, *C. macvaughii* y *C. melanadenia* son de carácter local y se necesitarían datos de geología y geomorfología precisos de las distintas localidades; no existe influencia por parte de eventos geológicos globales. Sin embargo, el volcanismo de la FVTM tuvo pulsos de mayor intensidad separados por periodos de actividad reducida desde el Mioceno tardío (10-9 ma.), cuando la FVTM se caracteriza por un emplazamiento de grandes mesetas andesítico-basálticas en el sector occidental y central (Moore et al., 1973; Ferrari et al., 1994) y de estrato-volcanes andesíticos en el oriente (Carrasco-Nuñez et al., 1997). Todos ellos pudieron contribuir de alguna forma al origen y divergencia poblacional de dichas especies.

De acuerdo con Becerra (2005) para el género *Bursera* la mayor tasa de especiación se dio hace 26-20 Ma, lo cual coincide con el levantamiento de la Sierra Madre Occidental y el Eje Neovolcánico. Dichos datos coinciden también con lo que encontramos en el complejo *C. hintonii* en donde el origen y diversificación se da entre los 27.83-20.35 Ma. Becerra (2005) encuentra también que después de los 13.5 Ma decreció la diversificación en *Bursera*,

lamentablemente no existen datos de genética de poblaciones en el género como para compararlos con el complejo *C. hintonii*.

Consideraciones finales

El complejo *Caesalpinia hintonii* es el primer grupo de especies analizados filogeográficamente en la región del Balsas así que no se cuenta con especies con quienes comparar o correlacionar los resultados aquí obtenidos. Nuestros resultados apoyan la idea de que el grupo de *C. hintonii* es un complejo de especies. Los niveles de divergencia en las cuatro regiones de plastidio analizadas son mucho mayores a las encontradas típicamente dentro de las poblaciones de una misma especie. Aún más importante resulta que existe una clara relación, para la mayoría de las especies, de las regiones de indels únicas o compartidas en las secuencias de esas cuatro regiones con los caracteres morfológicos y las barreras geográficas en la Depresión del Río Balsas y valle de Tehuacán-Cuicatlán (datos no mostrados).

En cambio en *C. oyamae* se formaron haplogrupos distintos en donde la carencia de haplotipos compartidos es una clara evidencia de aislamiento reproductivo. A pesar de la variación a nivel molecular las poblaciones de *C. oyamae* exhiben escasa o nula variación fenotípica entre ellas. Su similitud probablemente refleja no sólo una ancestría común reciente sino la acción de selección estabilizadora para producir este ensamblaje mimético. Al contrario de lo que se esperaba debido a la similitud morfológica, las poblaciones de *C. oyamae* y *C. macvaughii* muestran mayor divergencia en las secuencias que otros pares de especies congénicas. Lo opuesto sucede con *C. hintonii*, en donde se describieron dos variantes morfológicas (Contreras, 1991) y la divergencia molecular es menor. Las divergencias entre individuos de los taxa restantes es baja y no excede el 1%.

Los haplogrupos encontrados en *C. oyamae* y *C. macvaughii* no pueden describirse formalmente como especies, ya que a pesar de que el empleo de las cuatro regiones de plastidio facilitó el reconocimiento de estos linajes, los caracteres morfológicos que hasta ahora hemos evaluado no muestran diferencia alguna entre ellos y a no ser que incluyamos la distribución geográfica no existe una manera de distinguirlas. A pesar de que los linajes encontrados en *C. oyamae* y *C. macvaughii* no adquieran la categoría de especie, la genealogía de ésta y otras especies pueden proporcionar información invaluable acerca de qué factores geológicos e históricos dieron origen a la gran cantidad de especies en la Depresión del Balsas. La genealogía del complejo *C. hintonii* sugiere una ruptura filogeográfica entre los linajes maternos dentro de las dos zonas (Este y Oeste) de la Depresión del Balsas. No existe un evento vicariante evidente que explique las divergencias de los haplogrupos en cada porción del Balsas, sin embargo podríamos especular sobre la presencia de barreras climáticas (e.g., glaciaciones) o geográficas.

Un análisis con numerosos grupos de plantas y animales podrían descubrir eventos vicariantes embebidos dentro de la estructura genética de las especies distribuidas en la Depresión del Balsas y valle de Tehuacán-Cuicatlán y que no son observables hasta ahora en otro tipo de análisis. Por lo tanto, se propone uno o más eventos vicariantes entre la porción occidental y oriental de la Depresión del Balsas basandose en la estructura genética poblacional del complejo *C. hintonii*. Genealogías congruentes de numerosos grupos taxonómicos podrían apoyar la existencia de estas barreras en distintas zonas del Balsas que aún no han sido detectadas físicamente.

Las edades estimadas para el complejo coinciden con otros estudios filogeográficos sobre taxa de vertebrados en los desiertos cálidos de México que han mostrado eventos históricos repetidos de divergencia consistentes con los eventos vicariantes propuestos para el

Mioceno- Pleistoceno temprano (Schmidly et al., 1993; Riddle y Hafner, 2006). Los datos encontrados indicarían que la Depresión del Balsas no fue afectada durante las glaciaciones del Cuaternario y que en realidad el sitio es un mosaico de “ambientes estables” en donde múltiples especies quedaron atrapadas hace 30-20 millones de años atrás.

Lo que aún queda por contestar es que está o ha pasado durante los últimos 10 millones de años donde aparentemente no hay divergencia en dichas especies, mientras que grupos como *Phaseolus* diversificaron en más de 60 especies en el mismo lapso de tiempo (Delgado-Salinas et al., 2006).

Literatura citada

- Akaike, H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*. 19:716-723.
- Bandelt, H-J, P. Forster y A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16:37-48.
- Becerra, X. J. 2005. Timing the origin and expansion of the Mexican tropical dry forest. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 102(31): 19019-10932.
- Bilton, D. T., P. M. Mirol y S. Mascheretti. 1998. Mediterranean Europe as an area of endemism for small mammals rather than a source for northwards postglacial colonization. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 265: 1219–1226.
- Cabral-Cano E., H. R., Lang, C. G. y A. Harrison. 2000. Stratigraphic assessment of the Arcelia-Teloloapan area, southern Mexico: implications for southern Mexico's post-Neocomian tectonic evolution. *American Earth Science* 13: 443-457.
- Contreras, J. L. 1991. Contribución al conocimiento del género *Caesalpinia* (Leguminosae: Caesalpinioideae) en el estado de Guerrero. Tesis licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Carrasco-Núñez, G., A. Gómez-Tuena y L. Lozano. 1997. Geologic map of Cerro Grande volcano and surrounding area, Central Mexico: Geological Society of America Maps and Charts series MCH 081, 10 p.
- Carson, H. L. y A. R. Templeton. 1984. Genetic revolutions in relation to speciation phenomenon: The founding of new populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15:97-131.

- Crews, S. C. y M. Hedin. 2006. Studies of morphological and molecular phylogenetic divergence in spiders (Araneae: *Homalonychus*) from the American southwest, including divergence along the Baja California Peninsula. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38: 470-487.
- Delgado-Salinas, A., R. Bibler y M. Lavin. 2006. Phylogeny of the genus *Phaseolus* (Leguminosae): a recent diversification in an ancient landscape. *Systematic Botany* 31(4): 779-791.
- Doyle, J.J., y J. L. Doyle. 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytology Bulletin* 19: 11-15.
- Excoffier, L., P. E. Smouse y J. M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes—application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479–491.
- Ferrari L, M. López-Martínez, G. Aguirre-Díaz y G. Carrasco-Núñez. 1999. Space-time patterns of Cenozoic arc volcanism in central Mexico: From the Sierra Madre Occidental to the Mexican Volcanic Belt. *Geology* 27: 303-306.
- Ferrari L., M. López-Martínez y J. Rosas-Elguera. 2002. Ignimbrite flare up and deformation in the southern Sierra Madre Occidental, western Mexico: implications for the late subduction history of the Farallon plate. *Tectonics* 21(4):1-24.
- Ferrari L., S. Conticelli, C. Vaggelli, C. Petrone y P. Manetti. 2000. Late Miocene mafic volcanism and intra-arc tectonics during the early development of the Trans-Mexican Volcanic Belt. *Tectonophysics* 318:161-185.
- Ferrari, L., V. H. Garduño, G. Pascuarè y A. Tibaldi. 1994. Volcanic and tectonic evolution of Central Mexico: Oligocene to Present. *Geofísica Internacional* 33:91-105.

- Ferrusquía-Villafranca I. 1993. Geology of Mexico: a synopsis. In: Biological Diversity in Mexico. Origins and Distribution, Ramamoorthy A. P., R. Bye, A. Lot, J. Fa (eds.). Oxford University Press, New York, NY. p 3-108.
- Grismer, L. L. 1994. The origin and evolution of the peninsular herpetofauna of Baja California, Mexico. *Herpetological Natural History* 2: 51-106.
- González-Rodríguez A., J.F. Bain, J.L. Goleen y K. Oyama. 2004. Chloroplast DNA variation in the *Quercus affinis-Q. laurina* complex in Mexico: geographical structure and associations with nuclear and morphological variation. *Molecular Ecology* 13:3467-3476.
- Grismer, L. L. 2000. Evolutionary biogeography on Mexico's Baja California Peninsula: a synthesis of molecules and historical geology. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 97: 14017–14018.
- Griswold, C. K. y A. J. Baker. 2002. Time to the most recent common ancestor and divergence times of populations of Common Chaffinches (*Fringilla coelebs*) in Europe and North Africa: insights into Pleistocene refugia and current levels of migration. *Evolution* 56:143–153.
- Hafner, D. J. y B. R. Riddle. 2005. Mammalian phylogeography and evolutionary history of northern Mexico's deserts. pp. 225-245. In: Biodiversity, ecosystems, and conservation in northern Mexico. J-L. Cartron, G. Ceballos, and R.S. Felger (eds.). Oxford University Press, New York.
- Hamilton, M. B. 1999. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology* 8: 521-523.

- Harris, D., D.S. Rogers y J. Sullivan. 2000. Phylogeography of *Peromyscus furvus* (Rodentia; Muridae) based on cytochrome *b* sequence data. *Molecular Ecology* 9: 2129-2135.
- Herendeen, P. S., y D.L. Dilcher. 1991. *Caesalpinia* subgenus *Mezoneuron* (Leguminosae: Caesalpinioideae) from Tertiary of North America. *American Journal of Botany* 78: 1-12.
- Hewitt, G. M. 1996. Some genetic consequences of ice ages and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247-276.
- Hewitt, G. M. 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* 10: 537-549.
- Holder, K., R. Montgomerie y V. L. Friesen. 1999. A test of the glacial refugium hypothesis using patterns of mitochondrial and nuclear DNA sequence variation in rock ptarmigan (*Lagopus mutus*). *Evolution* 53:1936–1950.
- Hudson, R. R., M. Slatkin M. y W. P. Maddison. 1992 Estimation of levels of gene flow from DNA sequence data. *Genetics* 132: 583-589.
- Lewis, G. P. 1998. A Revision of the Poincianella - Erythrostemon group. UK: Royal Botanic Gardens, Kew.
- Moore, D. G. 1973. Plate-edge deformation and crustal growth, Gulf of California structural province. *Geological Society American Bulletin* 84: 1183-1906.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Masatoshi Nei. New York : Columbia.
- Parkinson, C. L., K. R. Zamudio y H.W. Greene. 2000. Phylogeography of the pitviper clade *Agkistrodon*: historical ecology, species status, and conservation of cantils. *Molecular Ecology* 9: 411–420.

- Polzin, T. y S.V. Daneschmand. 2003. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letters* 31:12-20.
- Posada, D. y K. A. Crandall. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817-818
- Riddle, B. R., D. J. Hafner, L. F. Alexander y J. R. Jaeger. 2000. Cryptic vicariance in the historical assembly of a Baja California peninsular desert biota. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 97: 9740-9745.
- Riddle, B. R., y D. J. Hafner. 2006. Biogeografía histórica de los desiertos cálidos de Norteamérica. In: *Genética y mamíferos mexicanos: presente y futuro*, Vázquez-Domínguez E., Hafner D.J. (eds.). New México Museum of Natural History and Science Bulletin 32: 57-65.
- Rozas, J., J. C. Sánchez-Del Barrio, X. Messeguer y R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Sanderson, M. J. 1997. A nonparametric approach to estimating divergence times in the absence of rate constancy. *Molecular Biology and Evolution* 14: 1218-1231.
- Schmidly, D.J., K. T. Wilkins y J. N. Derr. 1993. Biogeography. In *Biology of the Heteromyidae*, Genoways H.H., Brown J.H. (eds.). pp. 319-356. American Society of Mammalogists, Special publication 10, USA.
- Schneider, S., D. Roessli, L. Excoffier. 2000. ARLEQUIN: a software for population genetics data analysis. University of Geneva, Geneva, Switzerland.
<http://anthr0.unige.ch/arlequin>.
- Slatkin, M. 1991. Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genet. Res.* 58: 167-175.

- Sotuyo, S., J. L. Contreras, A. Delgado-Salinas y K. Oyama. 2004. Genetic structure of the endemic *Caesalpinia hintonii* complex (Leguminosae: Caesalpinioideae). *Plant Systematics and Evolution* 247: 131-143.
- Sotuyo, S., GP. Lewis. 2007. A new species of *Caesalpinia* from the Río Balsas Depression, Mexico, and an updated taxonomic circumscription of the *Caesalpinia hintonii* complex (Leguminosae: Caesalpinioideae: Caesalpinieae: Poincianella group). *Brittonia* 59(1): 33-36.
- Sotuyo S. A. Delgado-Salinas, MW. Chase, GP. Lewis y K. Oyama. 2007. Cryptic speciation in the *Caesalpinia hintonii* complex (Leguminosae: Caesalpinioideae) in aseasonally dry Mexican forest. *Annals of Botany* (en prensa).
- Swofford, D. L. 2002. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Ver. 4.0b8. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Taberlet, P., L. Fumagalli, A. G. Wust-Saucy y J. F. Cosson. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7: 453-464.
- Tajima F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105:437-460.
- Takagawa, S., I. Washitani, R. Uesugi, Y. Tsumura. 2006. Influence of inbreeding depression on a lake population of *Nymphoides peltata* after restoration from the soil seed bank. *Conservation Genetics* 7(5):705-716.
- Takayama K., T. Kajita, J. Murata, Y. Tateishi. 2006. Phylogeography and genetic structure of *Hibiscus tiliaceus*- speciation of a pantropical plant with sea-drifted seeds. *Molecular Ecology* 15:2871-2881.
- Wright S .1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19: 395-420.

CAPÍTULO VI

Discusiones generales

For every complex problem there is a solution
that is simple, neat, and wrong
H.L. Mencken

Taxonomía del complejo.

La variación en nucleótidos e *indels* en las cuatro regiones de plastidio aportó un número considerable de datos informativos para este análisis. Los porcentajes de bases se encuentran dentro de los reportados para la subfamilia (Bruneau et al. 2000). El rango de valores de diferencias (incluyendo *indels*) nucleotídicas en *Caesalpinia hintonii* sensu lato es sumamente amplio, si se considera a todas las poblaciones como provenientes de una misma especie.

Resulta relevante el número de cambios existente entre la población Huajuapán (Oaxaca) y Valerio Trujano con respecto a las otras poblaciones de la región oriental del Balsas (Tlayahualco y Tehuitzingo), así como el número de diferencias nucleotídicas entre ambas porciones de la Depresión del Balsas. Algunos autores como Smith y Patton (1993) y Mink et al. (1996) aducen que basta una diferencia del 3% entre poblaciones para ser consideradas especies distintas. Con los datos obtenidos, propusimos que la especie *C. hintonii* se escindiera en dos, una que corresponde a la porción oriental del Balsas *Caesalpinia oyamae* S. Sotuyo y G.P. Lewis sp nov. y *C. hintonii* correspondiente a la porción occidental. Sin embargo, *C. oyamae* podría contener más de un taxa, aunque no encontramos caracteres morfológicos suficientes que nos permitieran tomar tal decisión.

La dificultad para definir nuevas especies a partir de haplogrupos siempre deriva de la falta de caracteres morfológicos detectables para hacer las distinciones. Sin embargo, los haplogrupos detectados pueden ser considerados como unidades evolutivas (ESUs), a pesar de carecer de un estatus taxonómico. Las ESUs son ahora ampliamente usadas en las políticas de conservación (Riddle y Hafner 1999). Con respecto a la taxonomía tradicional, frecuentemente corresponden a subespecies, pero bajo algunas circunstancias pueden referirse sólo a poblaciones aisladas (Karl y Bowen 1999). Los haplogrupos encontrados

representan linajes evolutivos cuyo estatus se encuentra indefinido, aunque podrían considerarse entidades taxonómicas distintas de *Caesalpinia oyamae*. Análisis más rigurosos sobre la morfología quizá deben realizarse para encontrar los caracteres diagnósticos que apoyen estos taxa. Adicionalmente, con evidencia de marcadores nucleares será necesario corroborar los límites taxonómicos propuestos con regiones de plastidio.

El estudio filogenético-filogeográfico no apoya la hipótesis de Contreras (1991) en donde sugiere que geográfica y morfológicamente se pueden distinguir tres variantes dentro de *Caesalpinia hintonii*. Dentro del complejo esta especie era de particular interés debido a que presentaba la mayor área de distribución geográfica, y en la cual, con antelación habíamos encontrado estructuración genética utilizando aloenzimas (Sotuyo et al. 2004). Hubo tal grado de variación en las regiones de plastidio que ninguno de los análisis pudo agruparla en un solo clado definido por lo que se propuso la especie nueva.

Divergencia genética.

La actual relación entre las poblaciones de *C. oyamae* dada su cercanía geográfica concuerda con el modelo de especiación alopátrica; sin embargo, la divergencia genética observada entre las poblaciones no se esperaba. La estrecha cercanía de *C. hintonii* con *C. macvaughii*, prácticamente sin límites tampoco era esperada. Lo anterior puede deberse a factores ecológicos a escala local que aislaron reproductivamente determinadas poblaciones de la especie con mayor distribución y flujo génico continuo, y en esta medida, una vez aisladas, se ven sometidas a presiones evolutivas particulares y únicas para dicha población.

Por otra parte, procesos como la deriva génica o selección direccional, en poblaciones pequeñas, pudo acelerar la tasa de evolución (Wilcox et al. 1985) produciendo con ello una divergencia genética mayor si se compara con la de otras poblaciones de la

misma especie que aún conservan distribuciones geográficas mayores y/o flujo génico continuo. Lo antes descrito permite hacer inferencias acerca de que en la porción oriental del Balsas las poblaciones de *C. oyamae* se aislaron sin seguir un patrón geográfico definido y que esto se deba a procesos evolutivos locales o eventos geológicos y ecológicos regionales presentes a lo largo de la FVTM. El cuál desde el Mioceno ha presentado pulsos volcánicos de distinta naturaleza.

Diversos autores reconocen la existencia de zonas geográficas distintas con características particulares en la Faja Volcánica Transmexicana (Lynch 1985; Fa & Morales 1991); no obstante existen discrepancias en los límites exactos en el reconocimiento de dichas áreas. Lo anterior es relevante pues la población de *C. oyamae* en Valerio Trujano es la más alejada del resto, y pudo ser la población que se aisló primero del resto de las demás, presentando por ello mayor divergencia genética. Bajo este escenario, a través de nuevos procesos, geológicos y ecológico-geográficos de escala regional, las poblaciones de Guerrero-Puebla-Oaxaca podrían haberse aislado y posteriormente divergir.

Es probable que mientras la población Valerio Trujano se aislaba del resto de las poblaciones de Guerrero-Puebla, las poblaciones de Tlayahualco y Tehuizingo mantuvieron flujo génico por algún corredor de vegetación presente en la zona hasta su aislamiento geográfico total, quizá producto de la fragmentación de dicho corredor o simplemente, las presiones de selección locales para dichas poblaciones fueron de menor magnitud en esa área, produciendo una divergencia menor entre ellas. De la misma forma, las diferencias encontradas entre la población Valerio Trujano con sus conespecíficas podría deberse a una reciente expansión dentro de la zona (12.81 ma.).

Para el caso de *Caesalpinia macvaughii*, también encontramos diferencias entre las poblaciones de Michoacán y Guerrero y al igual que en *C. oyamae* no existen diferencias

morfológicas que apoyen esta divergencia molecular. Lo anterior muestra la gran variación genética dentro del grupo, producto posiblemente, de una historia de divergencia similar al de *C. hintonii sensu lato*, es decir, cuando *C. macvaughii* se separa como unidad evolutiva independiente, inicia un proceso de divergencia rápido o al mismo nivel que en el resto del complejo.

El origen del complejo y el caso *Caesalpinia pannosa*.

La especie o población ancestral que dio origen al complejo *Caesalpinia hintonii* y a *C. pannosa* debió distribuirse en la costa del pacífico ~30 millones de años atrás cuando la Península de Baja California aún se encontraba completamente unida al continente. Parte de esa población debió expandirse hacia el sur adentrándose en la Depresión del Balsas, mientras que otra parte se estableció en lo que sería millones de años después la región del Cabo en la Península de Baja California.

Durante la separación de Baja California del continente pudieron ocurrir dos cosas la primera hipótesis es que *C. pannosa* se originara antes de ese evento vicariante y continuo divergiendo de la población ancestral durante la separación del continente. La segunda hipótesis es que ya constituida como *C. pannosa* parte de las poblaciones (o una sola) de dicha especie son separadas durante la apertura del Golfo de California; en esta “isla” continúan su divergencia mientras que todas las poblaciones de *C. pannosa* en la costa se extinguen. Independientemente del proceso por el cual se origina la especie es notorio que no pudo expandirse en toda la Península de Baja California y que su distribución se restringió a la región del Cabo y sus alrededores probablemente debido a las inundaciones múltiples ocurridas en el Istmo de la Paz, la subdivisión peninsular, así como, el levantamiento de la Sierra de la Giganta durante el Mioceno (Hausback, 1984; Umhoefer et al. 2001). Así mismo, extensiva actividad geológica en las zonas bajas de la sierra

Giganta durante el Plioceno y Pleistoceno (Dorsey et al., 1997, Umhoefer et al 2002) y una posterior depositación de sedimentos marinos entre los 3.4-1.9 ma (McLenan, 1988). Los eventos anteriores debieron frenar y extinguir poblaciones de *C. pannosa* y el polimorfismo que encontramos en la especie debe ser reflejo del intento de invadir nuevas zonas.

Conclusiones.

El complejo *Caesalpinia hintonii* como modelo de especiación.

El trabajo de Demastes et al. (2001) con roedores distribuidos a lo largo de la Sierra Madre Occidental y la FVTM dan una idea de la complejidad filogeográfica que presenta la última zona. Sin embargo, no existen datos filogeográficos publicados para la Depresión del Río Balsas. Existen un par de estudios en proceso con musarañas del género *Sorex* (M. Esteva com. pers.) y otra leguminosa, *Aeschynomene* (Sotuyo y Delgado-Salinas en proceso) que muestran patrones similares de divergencia poblacional a los encontrados en el complejo *Caesalpinia hintonii*.

El elevado número de especies de plantas endémicas en el Balsas, que comparten 2 o 3 subcuencas, o bien que se ubican en cada una de las subcuencas (Sousa datos no publicados), ya que comparten áreas de distribución podrían utilizarse en estudios filogeográficos para establecer si existen patrones similares de variación y estructura filogeográfica en la región.

Claramente, mayor evidencia geológica es necesaria para dilucidar la historia genealógica completa del complejo *Caesalpinia hintonii*. Así mismo una mayor cantidad de estudios genealógicos para las especies de la región será necesario para esclarecer la historia de las especies en la Depresión del Río Balsas. De la misma manera patrones filogeográficos podrían sugerir escenarios paleogeográficos no antes sugeridos por los modelos geológicos. Sin embargo, un panorama más antiguo deberá contemplarse para las historias genealógicas de las especies de la región, tal como el sugerido para el complejo *C. hintonii*, y deberá ser evaluado en conjunto con evidencia similar.

La historia genealógica antigua revelada en este grupo sugiere que las hipótesis de especiación propuestas para la flora y fauna de la Depresión del Balsas deberán poner

atención en los tiempos de divergencia de las especies para discernir entre especies que migraron y colonizaron recientemente la región de que las se formaron *in situ* en tiempos distintos. Estudios en otros grupos dentro de la misma región podrían corroborar y/o enriquecer la información sobre los procesos de especiación en una de las regiones más diversas del país.

- No existe evidencia de que el grupo *Poincianella* sea monofilético. Los datos morfológicos y moleculares indican que de todas las alianzas y complejos propuestos por Contreras (1991) y Lewis (1998), sólo el complejo *Caesalpinia hintonii* es monofilético.
- *C. hintonii* reveló una alta tasa de diferenciación-divergencia molecular no encontrados antes en plantas. La especie, comprende más de un taxa, por lo menos uno, *C. oyamae*, puede ser elevado a la categoría de especie.
- La divergencia en dos linajes dentro de la Depresión del Río Balsas coincide con las dos unidades fisiográficas propuestas y el evento de divergencia puede asociarse con distintos procesos geológicos.
- Las relaciones genealógicas de las poblaciones de *C. oyamae* no siguen un patrón geográfico, debido al proceso dinámico que ocurre en la Faja Volcánica Transmexicana y a las modificaciones humanas asociadas con la agricultura y ganadería dentro de la zona.
- En general, los marcadores de plastidio empleados muestran una estructura jerárquica concordante con la geografía.

- Se requiere de más estudios filogeográficos de plantas y animales en la región para saber si poseerán estructuras filogeográficas similares a las encontradas en el complejo *C. hintonii*.

Literatura citada.

Arroyo, M. T. K., 1981. Breeding systems and pollination biology in Leguminosae. En Polhill, R. M., Raven, P. H. (eds): Advances in Legume systematics. Part 2, 723-769. Kew: Royal Botanic Gardens.

Avise, JC. 2000. Phylogeography. The history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, MA.

Avise, JC., Arnold, J., Ball, RM., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, JE., Reeb, CA., Saunders NC. 1987. Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. Annual Review in Ecology and Systematics 18: 489-522.

Ayala, R., Griswold, TL., Bullock, SH. 1993. The native bees of Mexico. En Ramamoorthy, T. P., Bye, R., Lot, A., Fa, J: Biological diversity of Mexico origins and distribution. Oxford University Press, Oxford, UK.

Barracough, TG., Nee S. 2001. Phylogenetics and speciation. Trends in Ecology and Evolution 16:391-399.

Britton, N., Rose, J. 1930: Caesalpinaceae. North American Flora 23 (4): 318-341.

Bruneau, A., Forest, F., Herendeen P. S., Klitgaard B. B., Lewis P. G. 2001. Phylogenetic relationships in the Caesalpinioideae (Leguminosae) as Inferred from Chloroplast *trnL* intron sequences. Systematic Botany 26(3):487-514.

Bullock, SH., 1984. Breeding systems in the flora of a tropical deciduous Forest in Mexico. Biotropica 17 (4): 287-301.

Cande, SC., Kent DV. 1992. A new geomagnetic polarity time scale for the late Cretaceous and Cenozoic. Journal of Geophysical research 97 (B10): 13917-13951.

Claridge, MF., Dawah, HA., Wilson MR. 1997. Species: the units of biodiversity. Chapman and Hall, London.

Claridge, MF., Dawah, HA., Wilson, MR. 1997. Species in insect herbivores and parasitoids- sibling species, host races and biotypes. En Claridge, MF., Dawah, HA., Wilson, MR. (eds): Species. The Units of biodiversity. Chapman & Hall, London. 247-272 pp.

Cocucci, A., Galetto L., Sersic, A., 1992. El síndrome de *Caesalpinia gillesii* (Fabaceae-Caesalpinioideae). Darwiniana 31: 11-135.

Comisión de la Conurbación de la Desembocadura del Río Balsas (CONURBAL) 1978. Plan de ordenación de la zona conurbada de la desembocadura del río Balsas. Cuatro volúmenes y un anexo gráfico.

Contreras, JL., 1991. Contribución al conocimiento del género *Caesalpinia*. (Leguminosae: Caesalpinioideae) en el estado de Guerrero, México. Tesis, Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México.

Cowling, RM. 1987. Fire and its role in coexistence and speciation in Gondwana shrublands. *South African Journal of Botany* 83: 106-112.

Coyne, JA. 1992. Genetics and speciation. *Nature* 355: 511-515.

Coyne, JA., Orr HA. 1989. Two rules of speciation. En Otte, J.A., Endler J. A. (Eds.). *Speciation and its consequences*. Sinauer Associates, Sunderland. pp. 180-207.

Cracraft, J. 1989. Speciation and its ontology: the empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. En Otte DA., Endler J. (Eds.). *Speciations and its consequences*. Sinauer Associates, Sunderland. pp. 28-59.

Crowson, RA. 1970. *Classification and biology*. Atherton Press, New York.

Cruden, RW., Hermann-Parker, SM. 1979. Butterfly pollination of *Caesalpinia pulcherrima*, with observations of psycophilous syndrome. *Journal Ecology* 67: 155-168.

Danley, PD., Kocher, TD. 2001. Speciation in rapidly diverging systems: lessons from Lake Malawi. *Molecular Ecology* 10:1075–1086.

Davis, JI. Heywood VH. 1963. *Principles of Angiosperm taxonomy*. Oliver and Boyd, Edinburgh.

De Haro, A. 1999. Relaciones filogenéticas entre artrópodos, onicóforos, anélidos y lofoforados. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa* 26:161-169.

Delgado-Argote, LA., López-Martínez, M., del Carmen Perrilliat, M. 2000. Geologic reconnaissance and Miocene age of volcanism and associated fauna from sediments of Bahía de los Angeles, Baja California, central Gulf of California. En Delgado-Granados, H., Aguirre-Díaz, G., Stock, JM. (Eds.): *Cenozoic tectonics and volcanism of Mexico*, Boulder, Colorado, Geological Society of America Special Paper 334, pp. 111–121.

Dobzhansky, T. 1935. A critique of the species concept in biology. *Philosophy of Science* 2:344-355.

Dobzhansky, T. 1937. *Genetic and the origin of species*. Columbia University Press, New York.

Dobzhansky, T. 1951. *Genetic and the origin of the species*. 3ra. Edición. Columbia University Press, New York.

Dorsey, RJ., Stone, KS., Umhoefer, PJ. 1997. Stratigraphy, sedimentology, and tectonic development of the southeastern Loreto basin, Baja California Sur, Mexico. En Johnson, ME.,

Ledesma-Vasquez (Eds.): Pliocene carbonates and related Facies Flanking the Gulf of California, Baja California Sur, Mexico. Geological Society of America. Special paper. 318:83-109.

Doyle, J.J., Doyle, J.L. 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19: 11-15.

Dupré, J. 1999. On the impossibility of monistic account of species. En R. A. Wilson (Ed.). *Species: new interdisciplinary assays*. MIT Press, Cambridge. pp. 3-22.

Ehrlich P.R., Raven. 1969. Differentiation of populations. *Science* 165: 1228-1232.

Ehrlich, P.R. 1961. Intrinsic barriers to dispersal in a checkerspot butterfly. *Science* 134:108-109.

Ehrlich, P.R., Raven P.H. 1969. Differentiation of populations. *Science* 165: 1228-1232.

Eldredge, N. 1989. *Macroevolutionary dynamics: species, niches, and adaptive peaks*. New York. McGraw-Hill.

Eldredge, N., Cracraft J. 1980. *Phylogenetic patterns and the evolutionary process*. Columbia University Press, New York.

Endress, P. K., 1994. *Diversity and evolutionary biology of tropical flowers*. 511 pp. Cambridge University Press: UK.

Ereshefsky, M. 1992. *The units of evolution: Essays on the nature of species*. MIT Press, Cambridge.

Excoffier, L., Smouse P.E., Quattro J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.

Foote, M. 1997. The evolution of morphological diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28:129-152.

Gavrilets, S. 1999. A dynamical theory of speciation on holey adaptive landscapes. *American Naturalist* 154:1-22.

Ghiselin, M.T. 1987. Species concepts, individually, and objectivity. *Biology and Philosophy* 2: 127-143.

Hausback, B.P. 1984. Cenozoic volcanic and tectonic evolution of Baja California, Mexico. *Geology of the Baja California Peninsula*. En Frizzell, V.A. (Ed.). *Geology of the Baja California Peninsula*. Society of Economic Paleontologists and Mineralogists, Pacific Section, pp 219-236.

Hawkins, J.D. 1996: *Systematics of Parkinsonia L. and Cercidium Tul. (Leguminosae: Caesalpinioideae)*. Tesis, Doctorado. University of Oxford.

Herendeen, P. 1992. The fossil history of the Leguminosae from Eocene of Southeastern North America. En Herendeen, PS., Dilcher DL. (Eds): Advances in legume systematics 4: The fossil record, pp. 85-160. UK: Royal Botanic Gardens, Kew.

Herendeen, P. Crane, P. 1992. Early Caesalpinoid fruits from the Paleogene of Southern England. En Herendeen, PS., Dilcher, DL. (Eds): Advances in legume systematics 4: The fossil record. UK: Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 57-68.

Heslop-Harrison, JS. 1992: The angiosperm stigma. En Cresti M., Tiezzi, A. (Eds.). Sexual plant reproduction, pp: 59-68. Springer-Verlag: Berlin.

Hewitt, GM. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247-276.

Hewitt, GM. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-913.

Hey, J. 2001. The mind of the species problem. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 326-339.

Howard, DJ. Berlocher SH. (eds) 1998. *Endless Forms: Species and Speciation*. Oxford University Press, New York.

Hull D.L. 1999. On the plurality of species: questioning the party line. En Wilson, R.A. (Ed.). *Species: new interdisciplinary essays*. MIT Press, Cambridge. pp. 23-48.

Hull, DL. 1997. The ideal species concept and why we can't get it. En Claridge, M.F., Dawah, H.A., Wilson M.R. (Eds.). *Species: the units of biodiversity*. Chapman and Hall, London. pp. 357-380.

Hull. DL. 1981. Discussion: kitts and kitts and Caplan on species. *Phylosophy of Science* 48: 141-152.

Jeanmonod, D. 1984. La spéciation: Aspects divers et modèles récents. *Candollea* 39: 151-194.

Johannesson, K. 2001. Parallel speciation: a key to sympatric divergence. *Trends in Ecology and Evolution* 16:148-153.

Kanz, E. K., Tucker, SC., 1994. Developmental basis of floral characters in the Caesalpinieae. En Ferguson, Y. K., Tucker, S. (Eds.). *Advances in legume systematics 6: Structural Botany*. Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 33-40.

Kay, QON. 1987. Ultraviolet patterning and ultraviolet-absorbing pigments in flowers of the Leguminosae. En Ferguson, Y. K., Tucker, S. C. (Eds.). *Advances in legume systematics, part 6: Structural Botany*. pp. 317.

Kitcher, P. 1984. *Species. Philosophy of Science* 51: 308-333.

- Knox, EB. 1998. The use of hierarchies as organizational models in systematics. *Biological Journal of the Linnean Society* 63: 1-49.
- Kocher, TD. 2003. Evolutionary biology: fractious phylogenies (news and views). *Nature* 423:489-491.
- Kondrashov, AS., Mina MV. 1993. Sympatric speciation: when is possible? *Biological Journal of the Linnean Society* 27: 201-223.
- Levin, DA. 1979. The nature of plant species. *Science* 204: 381-384.
- Lewis G.P. Gibbs P. 1999. Reproductive biology of *Caesalpinia calycina* and *C. pluviosa* (Leguminosae) of the caatinga of north-eastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* 217: 43-53.
- Lewis, GP. 1998. A Revision of the Poincianella - Erythrostemon group. - UK: Royal Botanic Gardens, Kew.
- Lewis, GP., Schrire, BD. 1995. A repaisal of the Caesalpinia Group (Caesalpinioideae: Caesalpinieae) using phylogenetic analysis. En M. Crisp, Doyle, J. J. (Eds): *Advances in legume systematics 7: Phylogeny*. UK: Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 41-52.
- Linnaeus, C. 1758. *Systema Naturae*, Ed. X. (*Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis*. Tomus I. Editio decima, reformata.) Holmiae. *Systema Nat.* ed. 10i-ii, 1-824.
- Loevtrup, S. 1987. On species and other taxa. *Cladistics* 3: 157-177.
- Lovette, IJ., Bermingham, E. 1999. What is a wood-warbler? Molecular characterization of a monophyletic Parulidae. *The Auk* 119(3): 695-714.
- Malhotra, A., RA.Torpe, H. Black, J., Daltry, W. Wüster. 1996. Relatin geographic patterns to phylogenetic processes. En PH. Harvey, AJ. Leigh, J. Maynard Smith, S. Nee (Eds.): *New uses for new phylogenies*, 185-202 pp. Oxford University Press. Oxford.
- Mayden, RL. 1997. A hierarchy of species concepts: The denouement in the Saga of the species problem. En Claridge, MF., Dawah, H.A., Wilson, MR. (Eds.): *Species: The units of biodiversity*. Chapman and Hall, London. pp. 381-424.
- Mayr, E. 1942. *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press, New York.
- Mayr, E. 1958. Species concepts and definitions. En E. Mayr (Ed.). *The species problem*, 2da. Edición. American association for the advancement of science (Publ.) 50, Washington, D.C. pp. 1-22.
- Mayr, E. 1970. *Population, species, and evolution: an abridgment of animal species and evolution*. Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge.

McDade, LA. 1995. Species concepts and problems in practice: Insight from Botanical Monographs'. *Systematic Botany* 20: 527-533.

Minelli, A. 1993. *Biological systematics: the state of the art*. Chapman and Hall, London.

Mishler, BD. 1999. Getting rid of species? En R. A. Wilson (Ed.). *Species: New interdisciplinary essays*. MIT Press, Cambridge. pp. 307-315.

Moore, DG. 1973. Plate-edge deformation and crustal growth of the Gulf of California since the late Pliocene. *Science* 84: 1883–1906.

Nelson, GJ., Platnick, NI. 1981. *Systematics and biogeography: cladistics and vicariance*. Columbia University Press, New York.

Nixon, KC., Wheeler, QD. 1990. An amplification of the phylogenetic species concept. *Cladistics* 6: 211-223.

Ödeen, A., Florin, AB. 2000. Effective population size may limit the power of laboratory experiments to demonstrate sympatric and parapatric speciation. *Proceedings of the Royal Society B* 267:601-606

Orr, R., Smith, TB. 1998. Ecology and speciation. *Trends Ecol. Evol.* 13:502–506.

Ortlieb, L. 1980. Neotectonics from marine terraces along the Gulf of California. En Mörner, NA. (Ed.): *Earth Theology, Eustasy, and Isostasy*. Wiley Interscience, New York. pp 497-504.

Otte D, Endler JA, (eds). 1989. *Speciation and its Consequences*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Owens, SL. 1989. Stigma, style, pollen and pollen-stigma interaction in Caesalpinioideae. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 29: 113-126.

Owens, SL. 1990. The morphology of the wt, non papillate (WN) stigma form in the tribe Caesalpiniae (Caesalpinioideae: Leguminosae). *Bot. J. Linn. Soc.* 104:293-302.

Owens, SL., 1985. Stigma structure and the pollen-stigma interaction in Caesalpinioideae-Leguminosae. En Willemse, M. T. M., Van Went, J. L. (compiladores). *Proceedings of the 8^o. International Syposium on sexual reproduction in seed plants, ferns and mosses, August 1984*: 84-87. Wageningen: Pudoc.

Owens, SL., Lewis, GP. 1989. Taxonomic and functional implications of stigma morphology in species, *Chamecrista* and *Senna* (Leguminosae: caesalpinioideae). *Plant Systematics and Evolution* 163: 93-105.

Owens, SL., Lewis, GP. 1995. Stigma morphology in the Leguminosae: The wet, papillate (WP) stigma in Caesalpinioideae. *Kew Bulletin* 51(1):119-131.

Paterson, HEH. 1985. The recognition concept of species. En E.S Vrba (Ed.). Species and Speciation. Transvaal Museum Monograph No. 4. Pretoria, South Africa: Transvaal Museum. pp. 21–29.

Percival, M. 1961. Types of nectars in angiosperms. *New Phytologist* 60: 235-281.

Polhill, RM., Vidal, JE. 1981: Caesalpinieae.- En Polhill, R. M., Raven, P. H. (Eds): *Advances in legume systematics*. UK: Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 81-95.

Posada, D., Crandall KA. 2001. Selecting models of nucleotide substitution: An application to the human immunodeficiency virus 1 (HIV-1). *Molecular Biology and Evolution* 18(6): 897-906.

Proctor, M., Yeo, P., Lack, A., 1996: *The Natural History of Pollination*. Portland, Oregon: Timber Press. 479 pp.

Prothero, DR. 1994. *The Eocene-Oligocene Transition, paradise lost*. Columbia University Press. New York. 292 pp.

Rice, WR., Hostert, EE. 1993. Laboratory experiments on speciation: what have we learned in 40 years? *International Journal of Organic Evolution* 47:1637-1653.

Riesberg, LH., Brouillet, L. 1994. Are many plant species paraphyletic? *Taxon* 43: 21-32

Rüber, LJ., Van Tassell, L., Zardoya, R. 2003. Rapid speciation and ecological divergence in the American seven-spined gobies (Gobiidae, Gobiosomatini) inferred from a molecular phylogeny. *Evolution*. 57:1584–1598.

Shivanna, KR., Owens, SJ. 1989. Pollen-pistil interactions (Papilionoideae). En Stirton, CH., Zarucchi, JL. (Eds.). *Advances in Legume Biology, Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 29:157-182.

Simpson G.G. 1961. *Principles of animal taxonomy*. New York. Columbia University Press. pp 150-153.

Simpson, B. Miao, B-M. 1997. The circumscription of *Hoffmannseggia* (Fabaceae, Caesalpinioideae, Caesalpinieae) and allies using morphological and cpDNA restriction site data. *Plant Systematics and Evolution*. 205: 157-178.

Simpson, B., 1999. A revision of *Hoffmannseggia* (Fabaceae) in North America. *Lundelia* 2: 14-54.

Simpson, B., Latkin, L., Weeks, A. 2003. Progress towards resolving the relationships of the Caesalpinia group (Caesalpinieae: Caesalpinioideae: Leguminosae). En B. Klitgaard, Bruneau, A. (Eds): *Advances in legume systematics 10: Higher level systematics*. UK: Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 123-148.

Sotuyo, S. 1999. Estructura genética de tres especies endémicas de *Caesalpinia* (Leguminosae: Caesalpinioideae). Tesis Licenciatura, FC, UNAM.

Sotuyo, S., Contreras, JL., Delgado-Salinas A., Oyama, K. 2004. Genetic variation in *Caesalpinia hintonii* complex (Leguminosae: Caesalpinioideae). *Plant Systematics and Evolution* 247: 131-143.

Sotuyo, S., Ibarra-González M., Delgado-Salinas A. 2001. Semillas y plántulas en *Poincianella* (Caesalpininae: Leguminosae) y su importancia en sistemática y filogenia. *Memorias del XVI Congreso mexicano de Botánica*.

Sousa, MS., Delgado, AS., 1993. Mexican Leguminosae: Phytogeography, endemism, and origins. En Ramamoorthy, A.P., Bye, R., Lot, A., Fa, J. (Eds.). *Biological diversity in Mexico, origin and distribution*. Oxford: Oxford University Press. pp. 459-511.

Swofford DL. 2001. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Ver. 4.0b8. Sinauer Associates, Sunderland, MA.

Templeton, AR. 1989. The meaning of species and speciation: A genetic perspective. En Otte D., Endler J.A. (Eds.). *Speciation and Its Consequences*. Sunderland, MA,

Tsukada, M., 1963. Pollen morphology and identification. I. *Eucaesalpinieae*. *Pollen et spores* 5(2): 239-284.

Tucker, SC., Stein, OL., Derstine, KS., 1985. Floral development in *Caesalpinia* (Leguminosae). *American Journal of Botany* 72(9): 1424-1434.

Turelli M. Barton NH., Coyne JA. 2001. Theory and speciation. *Trends in ecology and Evolution* 16:330-343.

Van Valen, L. 1976. Ecological species, multispecies, and oaks. *Taxon* 25: 233–239.

Vogel, S. 1954. Blütenbiologische Typen als Elemente der Sippendliederung, dargestellt anhand der Flora Südafrikas. Fischer Jena.

Vogel, S. 1990. Radiación adaptativa del síndrome floral en las familias neotropicales. *Boletín de la Academia nacional de Ciencias, Córdoba* 59:5-30

Wiley EO. 1978. The evolutionary species concept reconsidered. *Systematic Zoology* 27:17-26.

Wilson R. 1999. Realism, essence, and kind: resuscitating species essentialism? En R. Wilson (Ed.) *Species: new interdisciplinary studies*. Cambridge, Massachusetts: MIT Press.

Woodger JH. 1952. From biology to mathematics. *British Journal for the Philosophy of Science* 3:1-21.

Apéndice I Especímenes de herbario examinados por especie para el análisis filogenético con caracteres morfológicos.

Caesalpinia acapulcensis: **Jalisco**, Lott et al. 3205 (K), Lott 3297 (K); Rico & Windsor-Shaw 836 (K MEXU); Rico & Vázquez 1026; Rico et al., 630; **Colima**, Palmer F (K, NY); **Michoacán**, Hinton et al. 16198 (K); Hughes 628 (K, MEXU); McVaugh 22987 (NY); **Guerrero**, Barkley 14106 (MEXU); Boege 1622 (MEXU); Contreras 1846 (K, MEXU), Contreras 1842 (K, MEXU); Contreras 1844 (MEXU); Tenorio 3247 (K, MEXU); Germán et al. 224 (MEXU, NY); Grether & Quero 895 (MEXU); Hinton et al. 10991 (K, NY), Hinton et al. 16198 (K); Hughes & Styles 142 (K); Lorence et al. 3825 (MEXU); MacQueen et al. 447 (K, MEXU) Martínez & Tellez 89 (MEXU); Mexia 8798 (K, NY) Palmer 505 (isotypes K, MEXU, NY); Diego 5701 (K, MEXU).

C. caladenia: **Sonora**, Contreras 2728 (K); Contreras 2728 (K), Contreras 2729 (K), Contreras 2731 (K); Gentry 1378 (K, MEXU); Gentry 2989 (K), Lewis et al., 2072 (FCME, K, MEXU); Lewis et al. 2073 (FCME, K, MEXU); Lewis et al. 2074 (FCME; K; MEXU), Lewis 2075 (K, MEXU, FCME); Rose et al. 12660 (photo MEXU, isotype NY).

C. coccinea: **Oaxaca**, Bravo et al., 101 (MEXU); Delgadillo 234 (MEXU); Ernst 2502 (MEXU); Hughes 954 (K, MEXU); Lewis et al. 1802 (holotype MEXU, isotypes (FCME, K, NY); Lewis et al. 1803 (FCME, K, MEXU), 1794 (MEXU); MacDougal (MEXU); Sousa 10144 (MEXU); Torres et al. 4339 (MEXU); Torres 10743 (MEXU); Martínez 781, 1349, 2199 (MEXU); Reyes-García 2822 (B008/13); Elorsa 1215 (MEXU), 3964 (MEXU), 3994 (MEXU), 4517 (MEXU); Salas 1951 (MEXU), 2860 (MEXU).

C. epifanioi: **Guerrero**, Contreras 1818 (FCME; K, MEXU), 1825 (holotype FCME, isotype MEXU), 1835 (FCME, K, MEXU), 2039 (FCME, K), 2040 (FCME, K), 2041 (FCME, K), 2042 (FCME, K), 2045 (FCME, K), 2248 (FCME, K), 2293 (FCME, K), 2294 (FCME, K); Ocampo & Contreras 115 (FCME, K, MEXU), 124 (FCME, K, MEXU); Antonio & Contreras 124 (K); Sotuyo & Sotuyo 20 (MEXU); Sotuyo et al. 63 (MEXU, K).

C. eriostachys: **Sinaloa**, Gentry 5371 (MEXU, NY), 6782 (NY), 5717 (MEXU, NY); Hughes 601 (K, MEXU); Kinnach & Lyons 668 (MEXU); Lamb 383 (NY); Ortega 5222 (K), 864 (MEXU), 5677 (K), 47 (MEXU); 117 (K); Rose et al. 14538 (NY); **Jalisco**, Boege 1395 (MEXU); Bullock 1307 (MEXU), 1096 (MEXU); Magallanes 489 (MEXU), 514 (MEXU), 608 (MEXU), 6762 (MEXU); McVaugh & Koetz 1689 (MEXU); McVaugh 22974 (NY); Pérez 821 (MEXU); Saldaña 22 (MEXU); **Colima**, Palmer A. 2-18 (K), Palmer 1309 (K); **Michoacán**, Hinton et al. 16216 (K); McVaugh 22870 (MEXU, NY); Nuñez & Andrade 533 (MEXU, NY); Nuñez & Soto 3774 (MEXU); Nuñez 3234 (MEXU); Soto et al. 89 (MEXU); Sousa et al. 10732 (MEXU); Tenorio et al. 3271 (K, MEXU); **Guerrero**, Barkley 14051 (MEXU); Carlson 3092 (MEXU); Chiang et al. 747 (MEXU); Forment 705 (MEXU); 1348 (MEXU); Germán et al., 261 (MEXU); Halbinger (MEXU); Hinton 5659 (K, MEXU), Hinton et al. 6929 (K); Langlassé 709 (K); MacQueen & Nileshwar 449 (K, MEXU); MacQueen & Nileshwar 436 (K, MEXU); Miranda 4756 (MEXU), 4326 (MEXU); Nuñez et al. 12095 (K), 12395 (K); Palmer 546 (K); Tenorio et al. 3143 (K, MEXU); 396 (MEXU); **Oaxaca**, Alexander 169 (NY), 70 (NY); Barr 63-47

(MEXU); Boege 3320 (MEXU), 1057 (MEXU); Cedillo 572 (K, MEXU); Diego 5790B (K, MEXU); Gallardo 493 (K, MEXU); Hinton et al. 6929 (K); Lott 3447 (K, MEXU); Lewis & Hughes 1799 (K, MEXU, NY); McDougall (MEXU, NY), 82 (NY); MacQueen 289 (K, MEXU), 449 (K; MEXU), 408 (K), 436 K, MEXU); Mejorada 535 (MEXU); Mell 634 (NY); Miranda 6806 (MEXU); McVaugh 22448 (MEXU, NY); Shapiro 338 (MEXU); Sousa et al. 7614 (MEXU), 5320 (MEXU), 11941 (K, MEXU), 7412 (MEXU), 7474 (MEXU), 5285 (MEXU), 5580 (MEXU), 6617 (MEXU), 6379 (MEXU); Sousa & Tellez 8673 (MEXU); Sousa 9089 (MEXU), 9131 (MEXU); Torres 4804 (K, MEXU); **Chiapas**, Hughes 529 (K, MEXU); Lewis & Hughes 1775 (K, MEXU, NY), 1774 (K, MEXU, NY); Miranda 6903 (MEXU); Voorhies & Sánchez 22-2 (MEXU).

C. exostemma: **Puebla**, Contreras sn. (BUAP).

C. exostemma subsp. *exostemma*: **Oaxaca**, Alexander 2394 (MEXU, NY), Atkinson & MacQueen 5 (K, MEXU), MacQueen 495 (MEXU, K, NY) Lewis & Hughes 1779 (K, MEXU, NY), Lewis 1804 (K, MEXU, NY), MacDougall (NY), Mejorada 527 (MEXU), Mell 2208 (NY), Seler 1618 (K, MEXU), Sousa et al. 9091, 1978, 10092, 10170 (MEXU), Torres & Cedillo 44 (MEXU), Trigos 550 (MEXU, NY); **Chiapas**, Lewis & Hughes 1776 (MEXU, K), MacQueen & Atkinson 388 (MEXU, K).

C. exostemma subsp. *tampicoana*: **Veracruz**, Nee & Taylor 25792 (K, IEB, MEXU), Ventura 15094 (MEXU), Puig (MEXU), Palmer 556 (MEXU).

C. gaumeri: **Yucatán**, Arias & Vara 78, 113 (MEXU), Cabrera & Cabrera 11277 (MEXU), 11243 (MEXU), 11334 (MEXU); Enríquez 288, 547 (MEXU); Gaumer 1623 (NY), 349 (K, NY), (K); Hughes 941 (K); Lewis & Hughes 1764 (K, MEXU, NY); Pennington & Sarukhan 9568 (K, NY); White & Mott 82 (MEXU), 105 (MEXU); Zepeda et al. 194 (MEXU); Quintana Roo, Barrera et al. (MEXU); Cabrera & Cabrera 6306, 9247 (MEXU); Cabrera & Téllez 11071, 11126 (MEXU); Cabrera & Cortéz 274 (MEXU); Cabrera & Zárate 1467 (MEXU); Cowan & Cabrera 5087 (MEXU); Duran & Olmsted 846, 849 (MEXU); Grether 441 (MEXU); Grether et al. 1314 MEXU); Hughes 492 (K, MEXU); Lewis & Hughes 1762 (K, MEXU, NY); Moreno 561 (MEXU); Sousa et al. 11003, 12329, 12435 (MEXU); Téllez & Cabrera 1200, 1871, 3649 (MEXU); Uitzil et al. 15 (MEXU), **Campeche**, Cabrera & Cabrera 2361 (MEXU); Miranda 7969 (MEXU); Pennington & Sarukhán 9624 (K); Schubert & Gómez Pompa 1683 (MEXU)

C. hintonii: **Michoacán**; Núñez & Silva 3905 (MEXU); Sotuyo et al. 41, 46, 47, 48 (MEXU, K); **Puebla**, Huitrón 16 (MEXU); Lemus 878 (K, MEXU); McVaugh 22492 (MEXU, NY); Sousa et al. 7196 (K); Contreras 2371 (K); Sotuyo et al. 65, 66, 67, 68; **Guerrero**, Contreras 2372 (K); 2371 (K), 1850 (K, MEXU), 1851 (K), 2275 (K), 2038 (K), 2327 (K), 1837 (K), 2261 (K), 2388 (MEXU, K), 807 (K); Hinton 5567 (K); Hinton et al. 7746 (holotype K, isotypes MEXU); Hughes 882 (K, MEXU); MacQueen et al. 428 (K, MEXU); MacQueen & Nileshwar 446 (K, MEXU); McVaugh 22202 (NY); Medina 878 (K); Sotuyo et al. 50 (MEXU, K), 52 (MEXU, K), 55 (MEXU, K), 57 (MEXU, K), 58 (MEXU, K), 59 (MEXU, K), 60 (MEXU, K); Sotuyo & Sotuyo 18 (MEXU); **Oaxaca** Sotuyo & González 17 (MEXU), Sotuyo et al. 72 (MEXU, K), 74 (MEXU, K), 75 (MEXU, K).

C. hughesii: **Colima**, Magallanes 2832 (MEXU); **Michoacán**, Langlassé 823 (K), Freelan & Spetzman 145 (MEXU), MacQueen 409 (K), **Oaxaca**, Hughes 839 (K), MacQueen 391, 270 (K), Ernst 2820 (MEXU), Grimes et al. 2637 (NY), Lewis et al. 1795 (holotype K, isotypes FCME, K, MEXU), MacQueen & Atkinson 391 (K, MEXU), Sousa et al. 4376, 5550, 7081, 7110 7152, (MEXU); Torres et al. 2263 (MEXU).

C. laxa: **Guerrero**, Contreras 2112 (MEXU, K), 2119 (MEXU, K), 2183 (K, MEXU), Germán et al. 967 (MEXU), Delgado 1071 (MEXU), Valencia 1245 (FCME, MEXU); **Oaxaca**, Hartweg 455, 1839 (K).

C. macvaughii: **Michoacán**, Lorence et al. 3820 (K, MEXU); McVaugh 22517 (NY, photo K); **Guerrero**, Contreras 2343, (holotype FCME, isotypes MEXU, K), 2340 (FCME, MEXU), 2341 (MEXU, K), 2342 (K, FCME), 2513 (MEXU, K), 2514 (MEXU, K), 2508 (MEXU, K), 2520 (FCME); Steinmann 3175 (MEXU), 3176 (MEXU); Sotuyo et al. 8 (MEXU), 8bis, (MEXU), 54 (MEXU), 55 (MEXU, K).

C. melanadenia: **Puebla**, Boege 999 (MEXU); Brenan et al. 14373 (K, MEXU); Chiang et al. F-95, F-446, F-1922 (MEXU); Hughes et al. 1641, 2074 (K, MEXU, NY); Lewis et al. 1791, 1792 (MEXU, K), 1787 (MEXU, K), 1784 (FCME, MEXU, K); Ripley & Barneby 14723 (NY); Rzedowski 19131 (MEXU); Salinas & Dorado F-3092 (MEXU); Sousa et al. 9036, 6945 (MEXU), 6178 (MEXU); **Oaxaca**, Hughes 2091 (K, MEXU); Téllez 505 (MEXU); Vázquez et al. 4014 (NY).

C. mexicana: **Monterrey**, Castillón 629 (K, MEXU); Dwyer et al. 18 (NY, MEXU); Eaton & Edwards 14 (K), 80 (K); Edwards & Eaton (NY); Graham & Johnston 4621 (MEXU); Grimes et al. 2362 (NY); Hinton et al. 17744 (MEXU), 17624 (MEXU); Hughes 691 (K, MEXU); Manning & Manning 53100 (MEXU); Mendoza 146 (MEXU); Mueller & Mueller 3559 (MEXU); Palmer 282 (K); Pringle 1908, 9724 (K, MEXU,); Royal (MEXU); Torres et al. 963 (MEXU); Trott et al. 108 (MEXU); Webster et al. 11222 (MEXU); **San Luis Potosí**, Alcorn 1942 (NY), 2470 (MEXU); Clausen 7426 ((MEXU, NY); Hughes et al. 1604, 1606 (K); Palmer 1054 (K); Pringle 6989 (K, MEXU); Barlett 19141 (MEXU); **Tamaulipas**, Clausen 7536 (MEXU); Crutchfield & Johnston 5191 (MEXU); Hughes 1054 (K); King 3835 (NY); Lasseigne 4879 (MEXU, NY), 4874 (MEXU); Manning & Manning 53405 (MEXU), Mathwig & Janzen 1077 (MEXU); Maxwell 17 (NY); Medrano 726 (MEXU); Medrano et al. 2907 (MEXU); Nee & Taylor 25709 (MEXU); Nee 22215 (MEXU); Palmer 26, 177, 224, 571 (K); Rozynski 357 (NY); Sharp et al. 50356 (NY); Toledo & Medrano 2813 (MEXU); **Querétaro**, Carranza 1446 (MEXU, IEB); Hernández & Tenorio 719 (MEXU); **Hidalgo**, Hughes 1609 (K); Medrano et al. 8892 (MEXU); Magaña et al. 6081 (MEXU); Rzedowski 34682 (MEXU, NY); Sotuyo 1 (MEXU); **Veracruz**, Calzada 4270 (MEXU); Castillo & Tapia 787 (MEXU); Ventura 11131 (MEXU), 11192 (MEXU).

C. nelsonii: **Guerrero**, Martínez 3372, 115 (MEXU); Nelson 2303 (isotype NY); **Oaxaca**, Boege 3325 (MEXU), Lewis et al. 1794 (K, MEXU, NY); MacDougall H427 (NY); MacQueen 466 (K, MEXU); Sousa et al. 5193 (MEXU), 5203 (MEXU), 5210 (MEXU),

5498 (MEXU), 5512 (MEXU), 7059 (MEXU), 7666 (MEXU), 10582 (MEXU); Sousa & Zárate 9912 (MEXU); Tenorio & Torres 214 (MEXU), 243 (MEXU); Jurgensen (K).

C. pannosa: **Baja California**, Ahuatzin (MEXU); Ames et al. 77-54 (MEXU), Ames et al. 77-98 (MEXU); Anthony 311 (K); Brandegee (NY); Breedlove & Axelrod 43124 (MEXU); Burgess & Newland 6154 (MEXU); Carter 4998 (MEXU, NY); Carter & Moran 5251 (NY), 5252 (NY); Carter et al. 2133 (K), 2124 (K, MEXU), 2285 (K); Chambers 810 (MEXU); Constance 3162 (K, MEXU, NY); Contreras 2704 (K), 2712 (K), 2713 (K); 2727 (K), 2726 (K), 2696 (K), 2721 (K); Daniel 2439 (NY); Gentry 4438 (K), 4298 (K); Hughes & Styles 158 (K); Johnston 3774 (K, NY); Jones 24018 (NY), 27257 (NY); León de la Luz 994 (MEXU); Lewis et al. 2051 (FCME, K, MEXU), 2049 (FCME, K, MEXU), 2045 (FCME, K, MEXU), 2043 (FCME, K, MEXU, NY), 2042 (MEXU, K, FCME), 2041 (FCME, MEXU, NY, K), 2035 (FCME, K, NY, MEXU); 2033 (FCME, NY, K); Moran 6994 (K), 7108 (K, MEXU); Palmer 114 (K, MEXU, NY); Porter 293 (MEXU); Purpus 486 (K); Reeder & Reeder 6779 (MEXU); Rudd 3392 (MEXU); Turner & Burgess 6158 (MEXU); Webster 19524 (MEXU), 19561 (MEXU); Whitehead 839 (MEXU); Wiggins 14605 (K, MEXU), 14670 (K, MEXU); Wiggins & Ernest 577 (MEXU); Wiggins & Wiggins 18109 (MEXU); Wiggins et al. 444 (MEXU); Xantus 28 (K).

C. palmeri: **Sonora**, Carter et al. 75-29 (MEXU); Dillon & Rodríguez 1041 (NY); Felger 2415 & Lowe 1615 (MEXU); Gentry 1378 (MEXU), 4464 (K), 7035 (NY); Johnston 3104 (K); Lewis et al. 2065 (FCME, K, MEXU), 2063 (FCME, K, MEXU, NY), 2064 (FCME, K, MEXU); Mahler & Thieret 6000 (NY); Miranda 8939 (MEXU); Norris & Taranto 12477 (MEXU); Palmer 70 (isotype K, NY), 146 (K, NY); Rose et al. 12508 (NY), 12380 (NY); Rudd 2088 (MEXU); **Sinaloa**, Contreras 2739 (K); Gentry 5522 (MEXU, K), 7139 (NY); Mahler & Thieret 5978, 5958 (NY); Ortega 5498 (K), 188 (MEXU); Rose et al. 14851 (NY), 13871 (NY); Rose 13486 (NY); Sanders et al. 4248 (NY).

C. phyllantoides: **Tamaulipas**, Crutchfield & Johnston 5071, 5343 (MEXU); Nee 32666 (K, NY); Wooton s.n. (isotype NY).

C. standleyi: **Sinaloa**, Lamb 341 (K, NY); **Nayarit**, Contreras 2745, 2694 (K); Lewis et al. 2078 (FCME; K; MEXU); Rose et al. 14190 (holotype NY); **Jalisco**, Mexia 1887 (NY).

C. yucatanensis: **Yucatán**, Bradburn & Darwin 1252 (MEXU); Bruff 1498 (MEXU); Darwin 2513 (MEXU, NY); Darwin & Sundell 2106 (MEXU); Enríquez 271 (MEXU); Gaumer 371 (K, NY); Hughes 493 (K, MEXU); Lewis & Hughes 1766, 1765 (K, MEXU, NY); Schubert & Gómez-Pompa 1628 (MEXU); Zepeda et al. 190 (MEXU); **Quintana Roo**, Cabrera & Torres 1241 (MEXU), 4166 (MEXU); Cabrera & Zarate 1580 (MEXU), 1469 (MEXU); Cabrera & Cabrera 4166 (MEXU), 2533 (MEXU); Cabrera & Durán 562 (MEXU); Durán & Olmstead 866 (MEXU); Grether & Quero 1565 (MEXU); Lewis & Hughes 1761 (K, MEXU); MacQueen 478 (K, MEXU); Moreno 529 (MEXU); Gómez-Pompa 1707 (MEXU).

Poincianella robinsoniana: **Jalisco**, Pringle 5467 (isotype MEXU).

C. bonduc: **Sinaloa**, Gentry 5426 (MEXU); **Nayarit**, Calzada et al. 18983 (MEXU); Campos 1049 (MEXU); Chiang 1022 (MEXU); Téllez 9261 (MEXU); **San Luis Potosí**,

Alcorn 2203 (MEXU), 3338 (MEXU); **Veracruz**, Chávez (MEXU); Jiménez (MEXU); Márquez et al. 828 (MEXU); Nevling & Gómez-Pompa 433 (MEXU); Vázquez-Yañez 21 (MEXU); **Puebla**, Basurto & Durán 288 (MEXU); **Guerrero**, Contreras 829 (MEXU); Gil 239 (FCME); López 929 (MEXU); **Oaxaca**, Torres & Tenorio 264 (MEXU).

C. sclerocarpa: **Jalisco**, Delgado et al. 187 (MEXU); Domínguez & Calónico 925 (MEXU); Pérez 523 (MEXU); 375 (MEXU); Solís 1014 (MEXU), 2660 (MEXU); **Nayarit**, Novelo et al. 640 (MEXU); **Oaxaca**, Campos 1651 (MEXU); 2030 (MEXU); Castillo et al. 9384 (MEXU); Elorsa 51 (MEXU); 425 (MEXU); 1108 (MEXU); Ramos et al. 164 (MEXU); Torres et al. 536 (MEXU); Torres 4067 (MEXU).

C. cacalaco: **Durango**, González 6574 (MEXU); **Michoacán**, MacQueen 231 (MEXU); Martínez 15299 (MEXU); Soto 2000 (MEXU), 6227 (MEXU), 10704, (MEXU); Soto & Boom 2024 (MEXU); Soto et al. 14 (MEXU); **Guerrero**, Antonio 149 (FCME); Bruff 1112 (MEXU); Calónico 13878 (MEXU), 18931 (MEXU); Campos 215 (FCME); Contreras 1135 (MEXU), 2244 (FCME), 2565 (FCME), 2680 (FCME); Chavelas GR-75 (MEXU); Diego 4803 (MEXU); Domínguez et al. 264 (MEXU); Fonseca 1286 (MEXU); Germán et al. 614 (FCME); Hughes et al. 2154 (FHO , MEXU); Ladd 134 (MEXU); Miller et al. 464 (MEXU); Rzedowski 37161 (MEXU); Torres 1089 (FCME, MEXU); **Oaxaca**, Conzatti 5468 (MEXU), 5476 (MEXU); Salinas & Dorado F-3005 (MEXU); **Puebla**, Guízar 2296 (MEXU); Vázquez 3 (MEXU), 4 (MEXU).

C. pulcherrima: **Guerrero**, Aguilar 249 (FCME); Boege 646 (MEXU); Campos 1200 (FCME), 1360 (FCME); Carlson 3051 (MEXU); Coello 108 (FCME); Contreras 2583 (FCME), 2233 (FCME); Duke 16998 (MEXU); Espinoza 84 (FCME); Fonseca 1018 (FCME); García et al. 164 (FCME); Gaxiola 457 (FCME); Germán et al. 227 (MEXU); Hinton 6666 (MEXU); Laglassé sn (MEXU), 241 (MEXU), 411 (MEXU); Luna 62 (FCME); Miller et al. 291 (MEXU); Montenegro 16 (FCME); Ochoa (FCME); Pringle 8396 (MEXU); Sharp 441332 (MEXU); Soto et al. 5982 (MEXU); Tenorio et al. 1342 (MEXU); Torres 123 (MEXU); Urbina sn (MEXU); Valencia 291 (FCME).

Hoffmannseggia glauca: **Baja California**, Boyd 8022 (MEXU); Elias et al. 10884 (MEXU); Estrada 5816 (MEXU); Tenorio 13137 (MEXU); Thomas 8181 (MEXU); Wiggins & Thomas 210 (MEXU); **Nuevo León**, Frue & Frye 2349 (NY); Kuntze 23488 (NY); **San Luis Potosí**, Luckow 2685 (NY); **Tamaulipas**, Bierner & Turner 114 (NY); **Chihuahua**, Chiang 8887 (MEXU); Dwyer 14162 (MEXU); Fierros 1893 (MEXU); Forman 1612 (MEXU); Grether et al 1064 (MEXU); Hernández 8442 (MEXU); Molinar 45 (MEXU); Pringle sn (MEXU); Tenorio 8417 (MEXU); Valdés VR-03 (MEXU); Valdés et al. 55 (MEXU); White 2611 (MEXU); **Durango**, Clausen 7590 (MEXU); Estrada 1324 (MEXU); Gillett 17083 (MEXU); Hinton et al. 24723 (MEXU); Johnston et al. 10509 (MEXU); Johnston et al. 10373 (MEXU); Johnston & Muller 1253 (MEXU); Mayfield et al. 1103 (MEXU); Pringle 9028 (MEXU); Seigler & Lockwood 8996 (MEXU); Stanford et al. 267 (MEXU); **Guanajuato**, Ventura López 7765 (IEB); Kichler 246 (MEXU); Rzedowski 38796 (IEB, MEXU); Takaki (MEXU); **Querétaro**; Argüelles 817 (MEXU).

H. humilis: **Tamaulipas**, Johnston et al 11147 (MEXU); Mora-Olivo 5033 (MEXU); **San Luis Potosí**, Hiriart et al. 677 (MEXU); **Hidalgo**, Galeotti 3228 (photo, MEXU);

Hernández et al. 6213 (MEXU); Simpson 91-VII-18-8 (MEXU); **Puebla**, González-Medrano et al. 12340 (MEXU).

Pomaria gladulosa: **Querétaro**, Rose 2575 (MEXU); Ventura & López 9294 (MEXU); Magaña et al. 6050 (MEXU); Zamudio & Zamudio 10246 (MEXU); Argüelles 856 (MEXU), 1398 (MEXU), 1916 (MEXU), 2153 (MEXU), 2522 (IEB, MEXU), 2971 (MEXU); González & García (MEXU).

Cercidim praecox: **Baja California Sur**, Carter 4533 (K); Hughes & Styles 150 (FHO); Hawkins 81 (FHO, MEXU), 89 (FHO, MEXU), 92 (FHO, MEXU); **Michoacán**, MacQuenn 233 (FHO); Hawkins 31 (FHO, MEXU), 32 (FHO, MEXU), 36 (FHO, MEXU), 38 (FHO, MEXU); Hinton 5455 (K); Hughes 1163 (FHO, K, MEXU), 1848 (FHO, K, MEXU); Onicutt 3309 (K); **Guerrero**, Hawkins 41 (FHO, MEXU), 71 (FHO, MEXU), 72 (FHO, MEXU), 77 (FHO, MEXU); Hughes 889 (FHO, MEXU); **Puebla**, MacQuenn 396 (FHO); Hawkins 70 (FHO, K, MEXU); Hughes 1181 (FHO, MEXU), 1617 (FHO, K, MEXU); Oaxaca, Hawkins 19 (FHO, K, MEXU), 55 (FHO, MEXU); Hughes 552 (FHO, K, MEXU), 553 (FHO, K, MEXU), 1298 (FHO, K, MEXU); Sousa 11950 (K, MEXU); Pennington 9505 (K), 9335 (K).

Cercidium floridum: **Baja California**, Antony 363 (K); Carter 4531 (K), 4537 (K), 5681 (K), 5609 (K), 5796 (K), 5798 (K); Gentry 4458 (K); Hawkins 80 (FHO, MEXU), 86 (FHO, MEXU), 101 (FHO, MEXU), 109 (FHO, MEXU), 126 (FHO, MEXU); Hughes 1555 (FHO, K, MEXU); **Sonora**, Carter 4359 (K), 5238 (K); Hawkins 135 (FHO, MEXU), 142 (FHO, MEXU), 143 (FHO, MEXU); Hughes 1562 (FHO, MEXU, K).

Parkinsonia aculeata: **Guanajuato**, Peralta (IEB, MEXU); Rubio 271 (IEB, MEXU); Puga 279 (IEB); **Querétaro**, Argüelles 346 (MEXU); Fernández (IEB, MEXU); Hawkins 40 (FHO, MEXU), 56 (FHO, MEXU), 59 (FHO, MEXU), 79 (FHO, MEXU), 149 (FHO, MEXU), Hughes 1160 (FHO, K, MEXU).

**Apéndice II Clave taxonómica para las especies del complejo *Caesalpinia hintonii*
(sensu Contreras 1991) en la Depresión del Río Balsas y Valle de Tehuacan-
Cuicatlán**

- Foliolos en su mayoría con líneas glandulares negras en el margen
 - Hojas con 3-5 pinnas
 - Foliolos 2-3 pares por pinna; inflorescencias dispuestas sobre braquiblastos; pedúnculos simples de 2-8 cm de largo; plantas conocidas de la Depresión oriental del Río Balsas, en los alrededores de Ozomatlán, Guerrero.....*C. epifanioi*
 - Foliolos 4-6 pares por pinna; inflorescencias racemosas; pedicelos glandulares estipitados; conocida del valle de Tehuacan-Cuicatlán.....*C. melanadenia*
 - Hojas con 7-13 pinnas, foliolos 4-11 pares por pinna; inflorescencias axilares; braquiblastos ausentes, pedúnculos ramificados cerca de la base
 - Pétalos amarillos, pedicelos articulados por debajo de la mitad, brácteas esgarrosas; foliolos en su mayoría oblongo elípticos.....*C. macvaughii*
 - Pétalos rojizos o rosa pálido
 - pedicelos articulados por arriba de su mitad; brácteas erectas o incurvadas; foliolos en su mayoría obovados a elípticos.....*C. hintonii*
 - pétalo estandarte rosa claro con mácula roja en la base; filamentos de los estambres con glándulas verde brillante.....*C. oyamae*
- Foliolos sin líneas glandulares negras en el margen o superficie
 - Sufrutices o arbustos de menos de 2 m de alto; flores deflexas; tubo calcíneo no comprimido, sépalos membranosos; filamentos glandulares; legumbre de 4.7-7.1 cm de largo; habita de 1400-2000 m en las estribaciones de la Sierra Madre del Sur.....*C. laxa*

Apéndice III Métodos moleculares.

Este apéndice incluye los protocolo de extracción, amplificación de muestras en la PCR, limpieza de muestras y secuenciación. El complejo *Caesalpinia hintonii* hasta antes del presente estudio comprendía cinco taxa: *C. epifanioi*, *C. hintonii*, *C. laxa*, *C. macvaughii* y *C. melanadenia* (Contreras 1991; Lewis 1998). *Caesalpinia laxa* no fue incluida por no haber obtenido ADN de los ejemplares de herbario durante las extracciones y por no haber encontrado muestras frescas en campo debido a la deforestación en las zonas donde originalmente fue colectada.

Obtención y cuantificación de ADN

El ADN total de todas las muestras se aisló de material congelado, hojas frescas, hojas secas en sílica gel o partes de hojas, frutos y tallos de ejemplares de herbario (FCME, FHO, K, MEXU) utilizando una modificación del método de Doyle y Doyle (1987) basado en la utilización de 2xCTAB utilizando la siguiente receta para 100 ml.

2% CTAB	2g
1.4M cloruro de Sodio	8.12g
20 mM Disodio EDTA	4ml de stock 0.5M
100 mM trs-HCl (pH 8)	10ml de stock 1M
1% PVP-40T	1g
0.02% β -mercaptoetanol	2 μ l/ml (agregar justo antes de usarse)

Para algunas de ellas se utilizó el método de gradiente de bromuro de etidio, dichas muestras están depositadas en el banco de ADN de The Royal Botanic Gardens, Kew (RBG, Kew). Todos los sDNA fueron limpiados utilizando columnas Quiagen para eliminar azúcares, proteínas, RNA, remanentes de metabolitos secundarios y residuos de cloroformo que interfirieran con la PCR siguiendo las instrucciones de la compañía.

La cuantificación del ADN se realizó midiendo la absorbancia en un espectrofotómetro a 260 y 280 nm. Se calculó la relación de absorbancias a 260 nm y 280 nm (D.O260/D.O 280) para determinar la relación de ácidos nucleicos y proteínas de cada muestra: un valor de 1.8 resulta óptimo, mientras que uno inferior indica exceso de proteínas o restos de alcohol isoamílico-cloroformo en la muestra, y

un valor superior indica presencia en exceso de ARN. Una alícuota (4-6 μ l) del ADN extraído se corría en geles de agarosa al 1% para comprobar la calidad del ADN extraído.

Las muestras de ADN provenientes de ejemplares de herbario (K, MEXU) con ADN degradado o escaso fueron utilizadas en las amplificaciones obteniéndose un éxito de amplificación del 65% de las muestras. Se probaron un total de 18 regiones nucleares y de plastidio para la reconstrucción filogenética del género *Caesalpinia* sección Poincianella. (Cuadro II-1). Las mismas regiones fueron probadas en el complejo *C. hintonii*.

Debido a problemas como amplificación inconsistente, múltiples bandas y pseudocopias con las regiones nucleares para la reconstrucción filogenética de la sección Poincianella (*Caesalpinia*) y para la reconstrucción filogeográfica del complejo *C. hintonii* trabajamos con secuencias de cuatro regiones de plastidio: espaciador *trnL*, intron *trnL-F*, (Taberlet et al. 1991), espaciador intergénico *psbA-trnH* (Hamilton 1999) y espaciador *accD-psaI* (Mendenhall 1994). Todas las regiones anteriores han sido reportadas con alta variabilidad en nucleótidos e indels. La amplificación de las regiones se realizó utilizando el método de PCR de punto final.

ADN de plastidio

El genoma de plastidio es circular y su tamaño oscila entre 30 hasta 200 kpb (kilo pares de bases) (Martín y Herman 1998). En angiospermas así como en la mayoría de las algas, la estructura genómica (Figura 4) se encuentra arreglada en dos fragmentos invertidos (*inverted repeats*, IR) separando a una región grande (*large single copy*, LSC) de una región pequeña (*small single copy*, SSC) (Curtis y Clegg, 1984; Turmel et al. 1999). La estructura, así como los genes, son altamente conservados.

El creciente desarrollo de *primers* universales para regiones no codificadoras en los genomas de plastidio (Taberlet et al. 1991; Demesure et al. 1995; Dumolin-Lapegue et al. 1997; Hamilton 1999) han revelado variación intraspecífica substancial para algunos grupos taxonómicos (Newton et al. 1999). Dichos *primers* han sido utilizados de manera extensiva para estudios filogeográficos (e.g. Petit

et al. 1993; Petit et al. 1997; Caron et al. 2000; Dutech et al. 2000; Raspe et al. 2003) y de sistemática de plantas (e.g. Ferris et al. 1993; Gielly y Taberlet 1996).

Cuadro II-1 Regiones probadas para la reconstrucción filogenética y filogeográfica en *Caesalpinia*.

Región	
Nuclear	
<i>ITS</i>	Al menos 12 seudocopias detectadas
<i>GPAT</i>	Sin variación en bases e indels
<i>GPDx</i>	Seis copias detectadas
<i>WAXY</i>	Sin amplificación
<i>LEAFY</i>	Sin amplificación
<i>NIA</i>	Múltiples copias detectadas
<i>MS</i>	Sin amplificación
<i>Pistillata (Pi)</i>	Sin amplificación consistente
<i>NcpGS</i>	Amplificación inconsistente
<i>H3D</i>	Sin amplificación
<i>MMK1</i>	Al menos cinco copias detectadas
Plastidio	
<i>trnL</i>	Variación en indels y bases
<i>trnL-trnF</i>	Variación en indels y bases
<i>psbA-trnH</i>	Variación en indels y bases
<i>accD-psaI</i>	Variación en indels y bases
<i>rpl16</i>	Sin amplificación
<i>rpo</i>	Sin amplificación
<i>mat-K</i>	Sin variación en bases e indels
<i>rbcL-atpB</i>	Sin amplificación

El ADN de plastidio (pDNA) es uniparental, la herencia citoplasmática es predominantemente materna y aparentemente no lleva a cabo fenómenos de recombinación efectiva (Mongensen 1996). El pDNA es transmitido solo a través de las semillas, con lo que su potencial para estimar flujo génico es menor que el de genes nucleares, los cuales pueden moverse vía polen. En consecuencia, la variación genética del genoma de plastidio está más estructurada geográficamente que el genoma nuclear. Debido a los fenómenos de deriva, baja recombinación y de mutación, la tasa de evolución y por ende de polimorfismo en el pDNA es baja (Wolfe et al. 1987; Birky 1988). En el pDNA se pueden observar los patrones de los procesos sobre escalas de tiempo grandes (Ennos et al. 1999) por lo que es ideal para estudiar patrones históricos de flujo génico, en particular de migración y colonización (Cavers et al. 2003), proveyéndonos de una historia genética alternativa a la mostrada por el genoma nuclear. Lo

anterior es posible porque los plastidios se heredan maternamente, son dispersados por semillas y la colonización ocurre por el mismo medio.

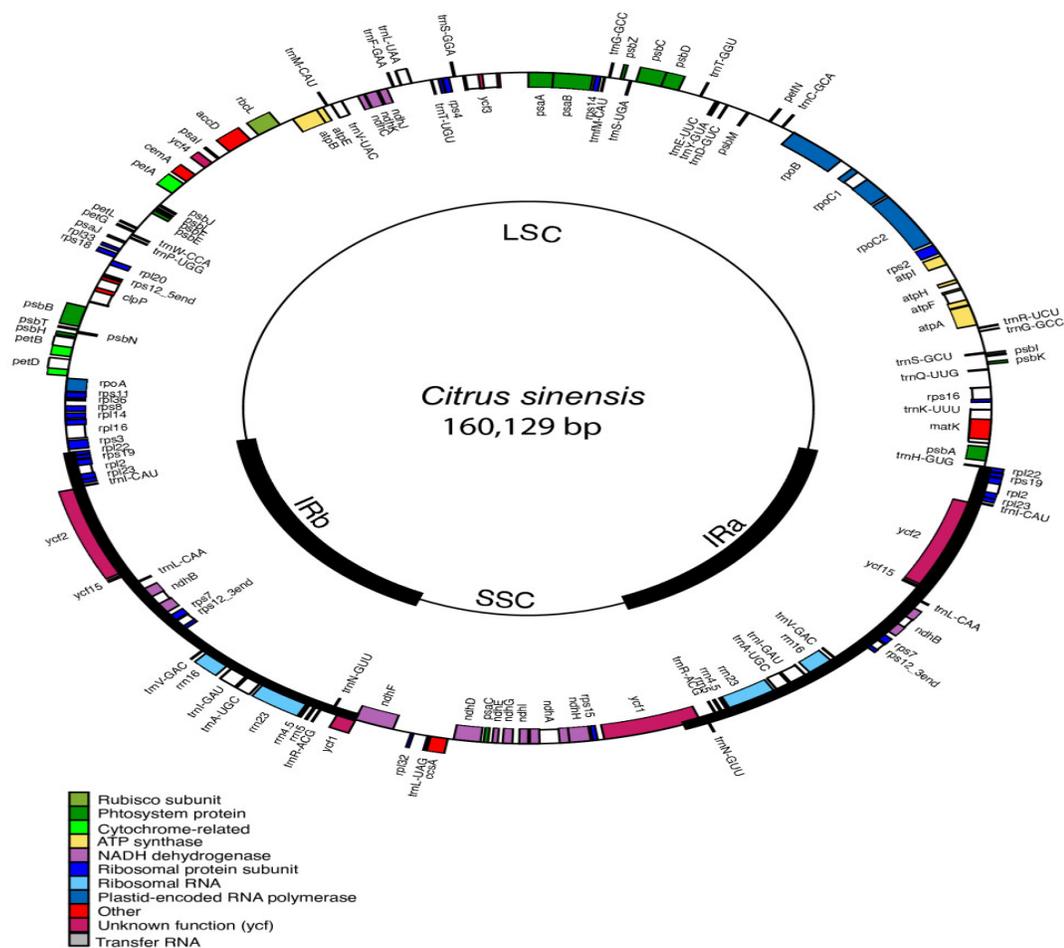


Figura II-1 Mapa genómico del plastidio de *Citrus cinensis*.

Amplificación y limpieza de fragmentos de ADN de plastidio

Todas las amplificaciones se llevaron a cabo utilizando la mastermix de *Abgene* verde y/o roja dependiendo de la cantidad de $MgCl_2$ que necesitara la muestra. El intron *trnL* y el espaciador *trnL-F* (Taberlet et al. 1991) fueron amplificados con el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94°C por 2 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 20 segundos, alineamiento a 58°C por 20 segundos, extensión a 72°C por 20 segundos y una extensión final a 72°C por 5 minutos. Los espaciadores *psbA-trnH* (Hamilton 1999) y *accD-psaI* (Mendenhall 1994) fueron amplificados con una desnaturalización inicial a 94°C 2 minutos, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C 45 segundos,

alineamiento a 49°C 1 minuto, extensión a 72°C 1.15 minutos y una extensión final a 72°C 7 minutos. Los productos de PCR fueron purificados utilizando columnas de sílica QIAquick siguiendo las instrucciones del producto. Posteriormente fueron almacenadas a 4°C para su posterior limpieza y secuenciación.

Reacciones de secuencia y secuenciación

Las reacciones de secuencia se realizaron de la siguiente manera: en 10µl de reacción se agregaron 0.75µl primer F o R según el caso (dilución 1:20 de la PCR), 3µl de buffer de secuencia 2.5x, 1µl de BigDye v3.0 (PE Biosystems), producto de PCR limpio en cantidad necesaria para la concentración de primer [22/ lectura de espectrofotómetro a 260nm (2.75)] y se completaba a 10µl con ddH₂O. Para muestras difíciles de secuenciar se utilizaron 3µl de producto de PCR limpio, 0.25µl de primer a 10 pmol/µl y 2µl de BigDye v3.0. El programa para las reacciones de secuencia fue el siguiente: 26 ciclos, 96°C 10 segundos, 50°C 5 minutos, 60°C 4 minutos. Todas las reacciones de secuencia se limpiaron con etanol y acetato de sodio al 3M con la siguiente receta

1. En un tubo de 1.5 ml agregar el producto de la reacción de secuencia, 1µl de AcNa 3M y 25 µl de etanol absoluto
2. Dejar reposar 30 minutos en hielo
3. Centrifugar durante 25 minutos a 13, 200 rpm
4. Tirar sobrenadante y secar sobre papel absorbente
5. Agregar 300 µl de etanol 70 % y centrifugar a 13, 200 rpm durante 15 minutos
6. Tirar sobrenadante y secar sobre papel absorbente
7. Repetir pasos 5 y 6
8. Dejar secar toda la noche en la oscuridad o bien secar en la estufa a no más de 60°C