



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD
SISTEMÁTICA

**EL COMPLEJO *FICUS AUREA* (SECT. *AMERICANA*E, SUBG. *SPHEROSUKE*,
MORACEAE): TAXONOMÍA INTEGRATIVA, FILOGENÓMICA Y COEVOLUCIÓN
CON SUS POLINIZADORES**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

KAREN BEATRIZ HERNÁNDEZ ESQUIVEL

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. GUILLERMO IBARRA MANRÍQUEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM

COMITÉ TUTOR: ANTONIO GONZÁLEZ RODRÍGUEZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM

COMITÉ TUTOR: EDUARDO RUIZ SÁNCHEZ

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS, Udg

MORELIA, MICHOACÁN, NOVIEMBRE. 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD
SISTEMÁTICA

**EL COMPLEJO *FICUS AUREA* (SECT. *AMERICANA*E, SUBG. *SPHEROSUKE*,
MORACEAE): TAXONOMÍA INTEGRATIVA, FILOGENÓMICA Y COEVOLUCIÓN**
CON SUS POLINIZADORES

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

KAREN BEATRIZ HERNÁNDEZ ESQUIVEL

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. GUILLERMO IBARRA MANRÍQUEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM

COMITÉ TUTOR: ANTONIO GONZÁLEZ RODRÍGUEZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM

COMITÉ TUTOR: EDUARDO RUIZ SÁNCHEZ

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS, Udg

MORELIA, MICHOACÁN

2020

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ENTIDAD: IIES-MORELIA

OFICIO CPCB/691/2020

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que, en la reunión ordinaria del Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas, del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **18 de mayo de 2020** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la estudiante **HERNÁNDEZ ESQUIVEL KAREN BEATRIZ**, con número de cuenta **304019715** con la tesis titulada "**El complejo *Ficus aurea* (sect. *Americanae*, subg. *Spherosuke*, Moraceae): taxonomía integrativa, filogenómica y coevolución con sus polinizadores**", realizada bajo la dirección del **DR. GUILLERMO IBARRA MANRÍQUEZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidenta: DRA. NATALIA IVALÚ CACHO GONZÁLEZ
Vocal: DRA. CAROLINA GRANADOS MENDOZA
Secretario: DR. ANTONIO GONZÁLEZ RODRÍGUEZ
Suplente: DR. ALEJANDRO ZALDÍVAR RIVERÓN
Suplente: DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 21 de octubre de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas por la oportunidad de cursar mis estudios Doctorado, los apoyos otorgados y las facilidades.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca para estudios de Doctorado (413983) y la beca de Movilidad.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el financiamiento del proyecto IN208217.

A l'institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE) Francia, por proveer parte del financiamiento para esta investigación. Al cluster Genologin Toulouse Midi Pyrenes, France, por los recursos bioinformáticos.

A la Universidad de Florida, por la beca completa para asistir al curso Tropical Botany 2017.

A los miembros de mi comité tutor por su apoyo en la planeación, desarrollo y revisión tanto del proyecto como de la tesis.

Al Dr. Guillermo Ibarra Manríquez por la dirección.

A los Drs. Antonio González Rodríguez y Eduardo Ruíz Sánchez por ser parte del comité tutor.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

A mi tutor, Guillermo Ibarra Manríquez, gracias por todo el apoyo brindado y por estos años de formación que me has dado durante mis estudios de pre y posgrado. Por tenerme la confianza para darme este proyecto. Por tu amistad y los valores enseñados.

A Antonio González Rodríguez por la activa participación en el proyecto, por permitirme hacer ensayos en tu laboratorio, las ideas y guía que brindaste fueron indispensables para esta tesis. A Eduardo Ruíz Sánchez por su disponibilidad, interés y apoyo en el proyecto. Por tus ideas que fueron imprescindibles para que el artículo tuviera la calidad con que llegó a su término. Gracias a ambos por sus enseñanzas y todo el conocimiento compartido, sin ustedes no lo habríamos logrado.

A los Doctores Jean-Yves Rasplus y Astrid Cruaud, por su activa colaboración en el proyecto y la ayuda brindada en lo teórico, en lo metodológico y en los análisis bioinformáticos. A Astrid por su ayuda con la logística de mi estancia. Son un ejemplo de trabajo en equipo, es un placer aprender de su ustedes. A Laure Saune y Sabine Nidelet por su ayuda en el trabajo de laboratorio para ambos grupos biológicos. Todos son excelentes personas, ha sido muy grato trabajar con ustedes.

Al Centre de Biologie pour la Gestion des Populations (CBGP), el Institute de la Recherche pour le Développement (IRD) y la Université de Montpellier SupAgro que pertenecen al INRAE, Francia, que brindaron sus instalaciones, laboratorio y equipo para desarrollar parte de esta tesis.

A las personas que ayudaron en las salidas a campo. A Santiago Sinaca Colín, además de ayudarme a coleccionar en repetidas ocasiones, por tus conocimientos para reconocer los *Ficus* en Los Tuxtlas y los buenos ratos que nos haces tener a todos los que nos guías. A Eva Piedra Malagón, por compartir conmigo memorables salidas a campo, no sólo de *aurea* si no de *petiolaris* en Tacámbaro, por llevarme a conocer las poblaciones de Coatepec, por las colectas en Tuxtla Gutiérrez, El Triunfo, Nizanda, y Orizaba. A Francisco J. Rendón, Ana Mirón Monterrosas y Alejandro Zabalgoitia por las colectas en Jalisco, Colima y Nayarit, hicieron que fuera una de mis salidas más placenteras. A Armando Navarrete Segueda, por su ayuda en la colecta y manejada en Veracruz, Tuxtla Gutiérrez y

La Lacandona, te rifaste. A Gonzalo Contreras y Oscar de Luna por su ayuda en las colectas de Tamaulipas y San Luis Potosí, por la aventura de un viaje tan largo. A Eduardo Ruíz Sánchez, por tu ayuda en Coatepec mientras tenías una gripe horrible. A Paulina Vázquez Quintana, por sus dedicadas colectas de Querétaro. Ángela Rojas, por las colectas de Querétaro y las avispas de Manantlán. A Iván Ek por su ayuda en Los Tuxtlas y las anécdotas con mi carro descompuesto. A Pablo Sánchez Vindas, Isaac Mesen Montano y Maynor Carranza por su ayuda, todas las facilidades y hospitalidad que nos brindaron a Memo y a mí en nuestra salida a Costa Rica. A Teodoro Clase y Pedro Toribio por el trabajo de campo en República Dominicana, fueron un excelente equipo, sin ustedes no lo hubiera hecho. A Brett Jestrow por proveernos las muestras para obtención de DNA de la población de Florida y a Francisco J. Ortega por las facilidades para hacérselas llegar.

A las personas que me brindaron su apoyo en el trabajo de gabinete. A Mayra Flores Tolentino por su ayuda con la separación de avispas y los datos de WorldClim. A Juley Encarnación Piñeiro por su ayuda en la logística de mi visita a República Dominicana, por la hospitalidad y gran amistad. A Eva Piedra Malagón, por su participación en los tutorales, por tu colaboración en el proyecto de morfometría, es muy placentero trabajar y conocer personas como tú, por tu amistad. A Luis Mendoza Cuenca por su colaboración y ayuda en el proyecto de morfometría. A Guadalupe Cornejo Tenorio por su colaboración en el procesamiento de hojas para la morfometría y en las descripciones taxonómicas. A Ricardo Gaytán Legaria por su trabajo con las mediciones de los siconos, fue muy importante. A Nadia Castro Cárdenas por tu ayuda para separar las avispas para mi estancia, con las fotos de las avispas montadas; por las ideas y conocimiento compartido, las largas horas de discusión que nos han ayudado a crecer, por tu amistad. A Andrew Reeve, por la revisión del inglés en el artículo de requisito, el Capítulo III y en todo momento que lo he necesitado; por la motivación, el apoyo y el tiempo compartido en distintas latitudes.

Al Laboratorio de Ecología y Genética Molecular, el Laboratorio Nacional de Microscopía y el Laboratorio de Análisis y Síntesis Ecológica, de la Escuela Nacional de Estudios Superiores, UNAM Morelia, por el uso de los microscopios para realizar la

medición de los siconos, en el primero; y para las micrografías que ilustran a las avispas en esta tesis, en los siguientes dos.

A los donadores Doug Williams, Kenneth Bloom y Anne MacDonald Korth que a través de la Universidad de Florida me otorgaron la beca completa para asistir al curso Tropical Botany 2017, a los profesores por ese maravilloso curso, Drs. Walter Judd, Christopher Baraloto y Lucas Majure; y a mis compañeros. Al profesor Judd y a Chris, por mostrarme *Ficus aurea* en Florida, no lo habría encontrado sola.

A los curadores y técnicos de los herbarios visitados. A Héctor Gómez Domínguez, curador del Herbario de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, también por su ayuda en la salida a El Triunfo, nunca habiéramos encontrado los caminos. A Mary Merello por su gran ayuda en el Missouri Botanical Garden Herbarium, y al curador Dr. James Solomon por permitirme hacer la visita. A los técnicos del Herbario Nacional de México: Alberto Reyes García por su ayuda en la sala Blettia; y a María del Rosario García Peña por el trámite de los préstamos, aún me queda trabajo pendiente; al Dr David Gernandt curador de MEXU en ese momento. Nuevamente a Brett Jestrow, Juley Encarnación y Pablo Sánchez Vindas por permitirme revisar las colecciones del Fairchild Tropical Botanic Garden Herbarium, el Herbario del Jardín Botánico Rafael Moscoso y el Herbario de la Universidad Nacional de Costa Rica, respectivamente.

A los integrantes del Laboratorio de Genética de la Conservación por su ayuda mientras hice ensayos en el laboratorio. A Goreti, Tamara, Ingrid, Ricardo, Yesenia, Mariana, de todos y cada uno aprendí, gracias por hacerme sentir parte del laboratorio. Gracias a Flor Rodríguez Gómez, por tus enseñanzas en la teoría y en la práctica para preparar bibliotecas genómicas, por tu tiempo y por tu amistad.

Al jurado revisor de esta tesis, los doctores Carolina Granados Mendoza, Luis Eguiarte Fruns, Natalia Ivalú Cacho González y Alejandro Zaldívar Riverón. Sus comentarios hicieron crecer enormemente la tesis, gracias por el tiempo, la dedicación e interés que todos mostraron.

Al Dr. William Ramírez por su disponibilidad para enseñarnos a montar avispas, y compartirnos sus conocimientos y experiencia en el mutualismo. A John Nason y Finn

Piatscheck, las horas de conversación sobre *Ficus*, avispas y todo lo referente en su visita a México, fue enriquecedor.

Al personal administrativo del IIES, por toda la ayuda y disponibilidad en todos estos años. A Leonarda Terán Cárdenas, secretaria del posgrado en el instituto.

A Víctor Trejo, por ser el mejor amigo y cuidar a Timina. A mis hermanas por el apoyo en momentos difíciles. A mi mamá y a Eugenio, por su ayuda, por darme su tiempo y correr conmigo a las terminales en cada salida o viaje.

Dedicatoria

A mi padre[†]

A mi madre

A mis hermanas

This tendency has developed, I think, from three causes. First, convincing examples of coevolution have accumulated slowly, because it is extremely time-consuming and expensive to study interactions from the viewpoints of both (or all) species. In the interim, it has become cliché to hear at scientific

J. T. Thompson. 1994

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
CAPÍTULO I	5
INTRODUCCIÓN GENERAL	7
ANTECEDENTES	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	49
OBJETIVO GENERAL	49
OBJETIVOS PARTICULARES	49
REFERENCIAS	50
CAPÍTULO II	65
Unraveling the extreme morphological variation in the neotropical <i>Ficus aurea</i> complex (subg. <i>Spherosuke</i> , sect. <i>Americanae</i> , Moraceae)	67
CAPÍTULO III	86
Phylogenomics and species delimitation of the <i>Ficus aurea</i> complex (sect. <i>Americanae</i>) based on RADSeq data	88
CAPÍTULO IV	122
New insights into the coevolutionary history of the fig-fig wasp mutualism in the Neotropics using genomic data: the case of <i>Ficus aurea</i> complex and its pollinating fig-wasps	124
CAPÍTULO V	157
DISCUSIÓN GENERAL	159
CONCLUSIONES	170
REFERENCIAS	171

RESUMEN

El género *Ficus* L., adscrito a la familia Moraceae, es uno de los linajes arbóreos más diversos en el mundo. Al mismo tiempo, presenta uno de los mutualismos más especializados que se pueden encontrar en la naturaleza, ya que mantiene una asociación específica con las avispas de la familia Agaonidae (Hymenoptera: Chalcidoidea), cuyo desarrollo de vida es necesario para llevar a cabo la polinización de las especies de *Ficus*. Las especies de este género que se distribuyen en América son endémicas del continente, el grupo más diverso pertenece al subgénero *Spherosuke*, sección *Americanae*. Una parte de las especies de esta sección muestra características morfológicas con una variación muy compleja, que ha ocasionado problemas para determinarlas, por lo que, se han propuesto complejos de especies para caracterizar las especies taxonómicamente.

En el presente trabajo se tomó como modelo el complejo *Ficus aurea*, cuya historia taxonómica ha sido intrincada y, había quedado sin una resolución adecuada en trabajos taxonómicos previos. En la primera parte de la tesis, se resuelven estas controversias a través del análisis de variables morfométricas, tanto de atributos vegetativos, como reproductivos. A partir de los resultados obtenidos se realizó un tratamiento taxonómico que reconoce cinco especies dentro del complejo: *F. aurea* Nutt., *F. cookii* Standl., *F. isophlebia* Standl., *F. tecolutensis* (Lieb.) Miq., *F. tuerckheimii* Standl. En la segunda parte de esta investigación se realizaron análisis filogenómicos de 21 poblaciones de las especies del complejo *F. aurea*. El análisis de Máxima Verosimilitud de los datos concatenados y el árbol de especies dieron resultados coincidentes. Las cinco especies pueden separarse en clados diferenciados con valores de *bootstrap* > 96%. El análisis de delimitación de especies recuperó siete grupos genéticos dentro del complejo *F. aurea*, esto coincide con la formación de subclados dentro de las especies *F. aurea* y *F.*

tuerckheimii. Con base en estos resultados, sería necesario modificar el tratamiento taxonómico propuesto. El análisis de ascendencia compartida, obtenido a partir de la comparación pareada de alelos entre individuos, arrojó evidencia de eventos recientes de intercambio genético entre las especies del complejo. Al mismo tiempo que se evidencia una fuerte estructura poblacional en *F. aurea*.

Al tener una taxonomía resuelta y el esclarecimiento de las especies como linajes independientes, es posible enfocarse en realizar estudios sobre los procesos coevolutivos del mutualismo *Ficus*-Agaonidae en el Neotrópico. En el último capítulo, la filogenia generada por medio de Elementos Ultra Conservados (UCEs) para las avispas polinizadoras del género *Pegoscapus*, arrojó 15 linajes que en el futuro deberá estudiarse si pertenecen a posibles especies o subespecies genéticas, asociadas a las especies del complejo de *Ficus* aquí estudiado. Los resultados de los datos de UCEs, concuerdan con las aproximaciones obtenidas en análisis previos de este mismo grupo, realizados con marcadores moleculares mitocondriales. Los resultados del análisis de reconciliación de árboles usando un método basado en eventos para correlacionar la filogenia de *Ficus* y *Pegoscapus*, sugieren procesos coevolutivos significativos que pudieron haberse dado en etapas tempranas de la divergencia de estos linajes, ya que los nodos más internos son los que presentan mayor significancia al reconciliar los árboles. Además, en tiempo evolutivo más reciente pudieron ocurrir eventos de duplicación de polinizadores o pérdida de linajes de los mismos (debido a procesos de extinción, segregación incompleta de linajes, o sesgo de muestreo), pero no se encontró evidencia que sugiera eventos de cambio de hospedero (o host-switch). Este trabajo documenta, por primera vez, una historia coevolutiva entre los *Ficus* neotropicales y sus avispas polinizadoras.

ABSTRACT

The genus *Ficus* L. (Moraceae), is one of the most diverse arboreal lineages in the world. At the same time, they present one of the most specialized mutualisms that can be found in nature: the specific association with wasps of the family Agaonidae (Hymenoptera: Chalcidoidea), which life cycle is needed to carry out the pollination of the fig trees. Native *Ficus* species are endemic to America, and the most diverse taxa are classified in the subgenus *Spherosuke*, section *Americanae*, which display remarkable variation in morphological traits. Such variation has caused taxonomical inconsistencies through the history of the study of this genus. In order to accommodate this variation, species complexes have been proposed within the section *Americanae*.

In the first section of this study, taxonomical controversies in the *Ficus aurea* species complex are dissected through the analysis of morphometric variables in both, vegetative and reproductive traits. From the results obtained, a taxonomic treatment was generated which recognizes five species within the complex; all of which had been described previously: *F. aurea*, *F. cookii*, *F. isophlebia*, *F. tecolutensis* and *F. tuerckheimii*. In the second part of this dissertation, a phylogenomic population analysis was performed on 21 populations of the *F. aurea* species complex. Gene tree and species analyses tree gave similar results. The five species were recovered in well-defined clades with bootstrap support values >96%. The species delimitation analysis recovered seven genetic groups within the complex, this is coincident with the subclades present in *F. aurea* and *F. tuerckheimii*. For this reason, it will need a new taxonomical assessment. The analysis of shared ancestry, obtained from the allele pairwise comparison between individuals, threw evidence of recent events of genetic exchange between the species in the complex, excepting *F. aurea*. This last species evidenced a strong population structure.

A resolved taxonomy and clarification of the species as independent lineages in the *F. aurea* species complex, allows for investigation of the coevolutionary processes of the *Ficus*-Agaonidae mutualism in the Neotropics. In the last chapter of this work, a phylogenetic analysis for fig wasps of the genus *Pegoscapus* based on Ultra Conserved Elements (UCEs), revealed 15 lineages that were designated as possible genetic species or subspecies associated to the five species of the *Ficus* complex studied here. The results of the UCE data are concordant with the approximations obtained previously, using mitochondrial markers in the same group of fig wasps. The reconciliation test to correlate the phylogenies of *Ficus* and *Pegoscapus* resulted in significant coevolutionary processes that could have occurred in early stages of the divergence of these lineages, given that internal nodes were more significant in the reconciliation test. In addition, in recent evolutionary times could have occurred duplications of the pollinators or losses of lineages (due to extinctions, incomplete lineage sorting or subsampling); but no host-switch events were detected. The results of this work document a coevolutionary signal between figs and their pollinators for Neotropical *Ficus* for the first time.

CAPÍTULO I



Ficus del Viejo Mundo. Izquierda superior: *Ficus dammaropsis* (subg. *Sycomorus*, sect. *Dammaropsis*), la especie con el sicono más grande del género. Izquierda inferior: *Ficus auriculata* (subg. *Sycomorus*, sect. *Sycomorus*). Derecha superior. *Ficus aspera* (subg. *Sycidium*, sect. *Sycidium*). Derecha inferior: *Ficus sur* (subg. *Sycomorus*, sect. *Sycomorus*). Plantas cultivadas en el Fairchild Tropical Botanic Garden, Florida, USA. Fotografías: Karen B. Hernández

INTRODUCCIÓN GENERAL

La familia Moraceae Gaudich., se encuentra entre las diez familias que, en estructura y composición, son las más diversas de las comunidades de bosques tropicales a nivel mundial (Gentry, 1988). De las aproximadamente 1050 especies y 37 géneros que integran a Moraceae (Berg et al., 2006), cerca de 750 especies pertenecen al género *Ficus* L. (Berg, 1989; Berg & Corner, 2005). Una de las razones por las que *Ficus* ha sido un grupo ampliamente estudiado es debido a la especializada y compleja interacción que tiene con sus avispas polinizadoras de la familia Agaonidae Walker (Hymenoptera). Esta interacción se considera como uno de los sistemas mutualistas más específicos que hay en la naturaleza y por ello es un modelo ideal para realizar estudios sobre coevolución (Datwyler & Weiblen, 2004; Rønsted et al., 2008).

Este complejo sistema ha carecido de estudios exhaustivos sobre su diversidad e interacciones en las regiones neotropicales. Todavía existen grandes vacíos en el conocimiento sistemático y taxonómico, tanto de *Ficus* como de Agaonidae del nuevo mundo, y esto incluye estudios con un enfoque coevolutivo. Debido a ello, la presente investigación tuvo como objetivo contribuir con la solución de problemas asociados con la taxonomía, morfología, la sistemática y la delimitación de uno de los complejos de *Ficus* presentes en el neotrópico. Además, se enfocó en el estudio de las relaciones filogenéticas de las avispas polinizadoras asociadas al complejo y a evaluar los posibles patrones de coevolución que éstas tienen con sus hospederos.

La presente introducción tiene como objetivo sentar las bases teóricas y metodológicas que se consideraron en este trabajo, así como dar cuenta del estado del conocimiento de la sistemática, taxonomía y relaciones coevolutivas de *Ficus* y *Agaonidae*, los cuales representan el punto de partida para este estudio.

El problema de las especies como unidad biológica

Las especies son una de las unidades fundamentales en biología, las cuales son usadas como punto de referencia y comparación en todos los campos del conocimiento biológico (de Queiroz, 2005). Actualmente, es posible detectar algunos problemas centrales en torno al estudio de las especies biológicas como son: el concepto de especie, la delimitación de especies, su descubrimiento y su clasificación (con base en sus relaciones filogenéticas).

En las siguientes secciones se abordarán los problemas referentes al concepto, la delimitación de especies y sus relaciones evolutivas. La delimitación de especies y la inferencia de filogenias o de árboles de especies son problemas difíciles de resolver debido a que procesos como la segregación incompleta de linajes, la introgresión o la duplicación de genes conllevan a que: 1) los árboles de genes no coincidan con el árbol de especies y 2) sea difícil delimitar especies provenientes de dos linajes que no se han separado completamente (O'Meara, 2010).

El concepto de especie

Todavía no existe consenso en la aceptación de un concepto de especie universal que pueda aplicarse a todos los organismos vivos. Las diferencias morfológicas son tradicionalmente el criterio decisivo de especie, aunque éstas no permiten tratar a las especies como entidades históricas que forman linajes (E. Mayr, 2000). El concepto biológico de especie ha sido uno de los más aceptados por décadas, el cual propone que las especies comprenden individuos aislados reproductivamente de otros grupos de individuos (E. Mayr, 1942). Sin embargo, se ha demostrado que las barreras reproductivas son semipermeables, así que las especies se pueden diferenciar, a pesar de estar entrecruzándose (de Queiroz, 2005). Existe el acuerdo

de que las especies que reconocemos son segmentos de un linaje evolutivo en el tiempo, como Darwin (1859) señaló, las especies no pueden ser inmutables al mismo tiempo que evolucionan, por lo que están conectadas por gradaciones intermedias. Debido a ello, el concepto de especie debe tomar en cuenta las etapas de la especiación para poder definir los límites entre especies (Choi, 2016); uno de los mejor sintetizados es el concepto unificado de especie (de Queiroz, 2005). En esta propuesta, las especies deben cumplir con la propiedad primaria que las define: linajes a nivel de población que evolucionan separadamente; un linaje puede entenderse como una línea directa de descendencia, mientras que las propiedades secundarias pueden o no estar presentes en una especie, por ejemplo, monofilia, aislamiento reproductivo, nicho exclusivo o distinción fenética. En la Tabla 1 se señalan algunos de los conceptos más conocidos, que incluyen alguna de las propiedades secundarias definidas por de Queiroz (2005), así como aquellos formulados recientemente. De manera general, cada uno de éstos es válido o aplicable para determinados organismos. Sin embargo, para algunos de ellos es confusa su interpretación o resultan tan complejos, que sería difícil demostrar los límites entre especies, no sin antes conocer todas las funciones genéticas involucradas en los procesos evolutivos, lo cual va en detrimento de las necesidades actuales para poder definir y reconocer una especie.

Tabla 1. Conceptos de especie.

Criterio	Definición	Limitaciones*
Morfológico	Los grupos más pequeños que son consistentemente distintos.	No toma en cuenta especies crípticas, ni retención de polimorfismos ancestrales. ¹
Biológico	Individuos aislados reproductivamente de otros.	Barreras reproductivas son semipermeables. ²
Ecológico	Linaje con el mismo nicho o zona adaptativa.	Especies cercanas pueden compartir el mismo nicho. ³
Unificado	Linajes a nivel de población que evolucionan separadamente.	Cada población con diferenciación genética podría ser una especie. ⁴
Filogenético	Conjunto de individuos diagnosticables con un patrón parental ascendencia-descendencia.	Restringe a los individuos que están separados por barreras geográficas. ^{5,6}
Genealógico	Grupo de individuos cuyos genes coalescen a lo largo de la genealogía de genes de una población. Las unidades monofiléticas más pequeñas que se pueden distinguir.	Si una especie marca el límite entre una estructura reticulada y jerárquica no hay modo de saber que es monofilética. ⁷
Génico	Grupos que están <i>adaptados diferencialmente</i> y, bajo contacto, no son capaces de compartir los genes que controlan esos caracteres adaptativos, por intercambios directos o a través de poblaciones intermedias híbridas.	Además de la adaptación, algunos otros procesos pueden causar especiación tal como la deriva génica. ⁸
Adecuación diferencial	Grupos de individuos que están caracterizados recíprocamente por rasgos que tendrían efectos negativos en la adecuación de otros grupos y que no pueden ser intercambiados regularmente entre grupos bajo contacto.	Es difícil saber la manera en que los rasgos tienen efectos negativos en la adecuación de los individuos. ⁹

*Tomado de Hausdorf, 2011. 1) Cronquist, 1978; 2) E. Mayr, 1942; 3) van Valen, 1976; 4) de Queiroz, 2005; 5) Cracraft, 1983; 6) Donoghue, 1985; 7) Baum & Shaw, 1995; 8) Wu, 2001; 9) Hausdorf, 2011.

Delimitación de especies

La delimitación de especies es el proceso de determinar sus límites y número a partir de datos empíricos (Dayrat, 2005). Desde hace un tiempo se ha tratado de promover el uso de distintos tipos de datos para delimitar especies, además de las características morfológicas, las cuales son el tipo de evidencia más comúnmente usada. La integración de datos genéticos, ecológicos, geográficos, climáticos, de comportamiento, entre otros, permiten mejorar los resultados al implementar métodos de delimitación de especies. A este enfoque se le ha llamado “taxonomía integrativa” (Dayrat, 2005), pero conviene destacar que difiere del enfoque de “evidencia total”, ya que los datos que se usan en este último son una combinación de datos moleculares y morfológicos, que se analizan a través de árboles filogenéticos, por lo que se orientan más a la delimitación de especies usando monofilia recíproca (Eernisse & Kluge, 1993).

Delimitación de especies y el círculo taxonómico. Uno de los problemas de la delimitación de especies es que cualquier evidencia de datos tiene sus límites, independientemente de si su origen es morfológico, genético, ecológico o citogenético (Valdecasas et al., 2008). Los taxones (incluidas las especies) son hipótesis, por ello, Valdecasas et al. (2008) mencionan que debe de haber libertad intelectual para formular hipótesis particulares. El requisito debiera ser que hagan predicciones y, por lo tanto, sean comprobables, es decir que distintos datos de aproximadamente la misma calidad respalden las agrupaciones dadas y no sugieran agrupaciones alternativas.

Partiendo de la idea de que las especies son hipótesis, DeSalle et al. (2005) señalan que se debe evitar un pensamiento circular cuando se trata de delimitar especies. Así, estos autores proponen el círculo taxonómico (Figura 1), en el que se parte de una hipótesis nula (no hay diferenciación) y cuyo punto de partida se puede basar en la geografía; a partir de ahí, el taxónomo puede probarla con herramientas taxonómicas como morfología, ecología o comportamiento, entre otras. Si estas herramientas no aceptan la hipótesis nula y se detecta diferenciación entre dos entidades geográficas, se procede a la descripción. Otro ejemplo es cuando las herramientas taxonómicas no pueden rechazarla, con lo que se recurre a la evidencia genética. Si existen diferencias genéticas, pero no morfológicas, la hipótesis nula se rechaza, por lo que se determina que se trata de un caso de especiación críptica. Si ninguna evidencia la rechaza, se debe concluir que hay una única entidad taxonómica. Cuando las hipótesis comparten la misma área geográfica, se parte de las diferencias morfológicas y se pueden usar otras herramientas, como las genéticas, para probarlas.

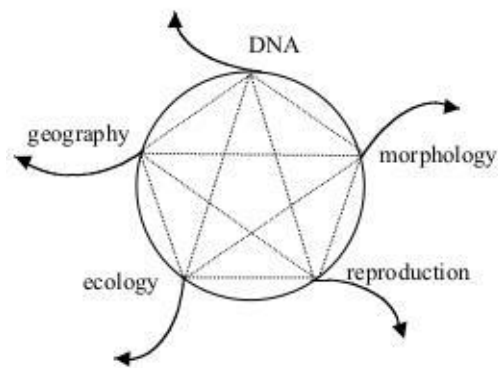


Figura 1. El círculo taxonómico de DeSalle et al. (2005). Para probar una hipótesis de no diferenciación de especies, el taxónomo debe cruzar de una evidencia a otra. Si la hipótesis se rechaza, se sale del círculo y se procede a la descripción. Si la evidencia no la rechaza, se puede continuar cruzando dentro del círculo, en búsqueda de otras evidencias.

Métodos de delimitación de especies con datos de secuencias de ADN.

Usando datos genéticos, los métodos para delimitar especies pueden dividirse en aquellos que se basan o no en árboles; estas categorías, a su vez, se pueden dividir en aquellos que se apoyan de algoritmos probabilísticos o no y, finalmente, con base en el criterio que siguen. Dentro de los métodos basados en árboles están el criterio de exclusividad (Baum & Shaw, 1995) o la distancia genética por aislamiento (Good & Wake, 1992). El primero de éstos se basa en el concepto genealógico de especie (Baum & Shaw, 1995); en este caso, las especies son delimitadas por nodos exclusivos, es decir, que todos sus miembros están más cercanamente relacionados entre ellos mismos que con otros organismos fuera del grupo (Sites & Marshall, 2003). En el caso de la distancia genética por aislamiento (Good & Wake, 1992), se correlaciona la distancia genética pareada contra el aislamiento geográfico; si la línea de regresión pasa sobre el origen, las muestras se interpretan como conespecíficas (Sites & Marshall, 2003).

Dentro de los métodos probabilísticos que no necesita un árbol filogenético, el más usado es el análisis de estructura genética, se encuentra basado en un enfoque bayesiano, el cual asume que las poblaciones consisten en individuos cuyos alelos de un locus están bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg; las combinaciones y las frecuencias de los alelos en una población son distintas de los de otra (Choi, 2016), el programa Structure (Pritchard et al., 2000) es el más usado para realizar este análisis. Por otro lado, el método "Bayesian Phylogenetics and Phylogeography" (BPP) (Yang & Rannala, 2010, 2014) es un método probabilístico que puede usar un árbol filogenético de entrada; está basado en la teoría de coalescencia, puede ser aplicado para más de una especie y rastrea la historia genealógica hacia un ancestro en común para las muestras que están representando distintas especies.

Otro de los métodos más usados en delimitación de especies, es el Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC; Jombart et al., 2010). Este enfoque permite construir un análisis de componentes principales, usando las frecuencias alélicas en los individuos y usa una función del análisis discriminante para detectar la máxima separación entre grupos genéticos; con el número de grupos apropiados, se minimiza el criterio de información Bayesiana, se calculan las probabilidades posteriores de cada grupo formado (Pyron et al., 2016) y se puede poner a prueba si las especies conforman grupos.

Árbol de especies y árboles de gen

El árbol de un gen, en un grupo de individuos, es el reflejo de la demografía histórica poblacional, ya que existen diferentes vías genealógicas en la transmisión de alelos, hablando de organismos sexuales, lo que produce una serie variable de árboles de cada alelo a través de distintos individuos (Avice, 2008). Esto significa que la relación entre organismos individuales que comprenden linajes evolutivos independientes puede ser reticulada y no estrictamente dicotómica (Avice, 2008). Por esta razón, el árbol de especies no puede ser inferido a partir de un locus único (Allendorf et al., 2010). No obstante, existe la posibilidad de que, en la historia de un gen, este haya sido transmitido acorde a la historia de las especies (Avice, 2008).

Los genes pueden ser analizados a través de modelos de coalescencia, que se define como el rastreo del tiempo hacia el pasado en el que los alelos estuvieron fusionados en los linajes ancestrales (Avice et al., 1987). Por este proceso, todos los linajes sufren una transición de un estado inicial polifilético hasta que la separación de éstos lleva, eventualmente, a la monofilia recíproca (Avice, 2000). Entre más tiempo desde la separación haya pasado, más probabilidad de que los árboles de genes se parezcan más al árbol de especies (Rosenberg & Nordborg, 2002).

Rastrear los linajes hacia atrás en el tiempo permite identificar a aquellos que han evolucionado de manera independiente (Fujita et al., 2012), sobre todo cuando el proceso de especiación no se ha completado.

El enfoque tradicional para estimar un árbol de especies es el análisis concatenado de genes, en el que algún método de inferencia filogenética es aplicado a una súper matriz, como el de Máxima Verosimilitud, asumiendo que todos los *loci* evolucionan en un árbol común (Molloy & Warnow, 2018). Sin embargo, procesos como la segregación incompleta de linajes, la transferencia horizontal y la introgresión causada por hibridación, pueden resultar en historias evolutivas diferentes (Pante et al., 2015).

En la actualidad se han desarrollado distintos métodos para estimar árboles de especies. Los métodos de “resumen” infieren un árbol de especies a partir de una colección de árboles de genes, éstos últimos se analizan individualmente a través de métodos de inferencia filogenética y sirven como entrada para los programas de análisis (Zhang et al., 2018). Estos métodos son estadísticamente robustos bajo modelos de coalescencia, funcionan mejor que los métodos concatenados cuando hay segregación incompleta de linajes, además de que manejan adecuadamente la longitud de las ramas (Solís-Lemus et al., 2016). Sin embargo, cuando los datos no contienen suficiente información filogenética, su estimación es débil y en ausencia de segregación incompleta de linajes, los métodos concatenados pueden ser más precisos (Mirarab et al., 2014).

Los métodos de “sitios” (refiriéndose a polimorfismos de nucleótido simple, SNPs por sus siglas en inglés) son adecuados para inferir árboles de especies cuando los *loci* tienen poca señal filogenética (Molloy & Warnow, 2018). Por ejemplo, programas como SNAPP (Bryant et al., 2012) y SVDQuartets (Chifman & Kubatko, 2014), estiman directamente un árbol de especies a partir de marcadores bialélicos

(que se asumen desligados), sin reconstruir previamente árboles de gen (Cutter, 2013); estos métodos asumen que cada sitio tiene su propia genealogía trazada bajo un modelo coalescente (Chifman & Kubatko, 2014).

Datos de secuenciación de nueva generación y su aplicación

Con la obtención de datos genómicos o secuenciación de nueva generación (NGS, por sus siglas en inglés), se pueden resolver problemas relacionados con la delimitación de especies y con la historia evolutiva de los linajes, así como encontrar las causas evolutivas que originan la discordancia entre los árboles de gen *vs* el árbol de especies (Pyron et al., 2016), debido al poder de resolución estadístico que brinda obtener grandes cantidades de datos (Dodsworth, 2015).

Existen distintas técnicas para obtener datos genómicos, las cuales pueden dividirse en secuenciación del genoma completo y de representación reducida. Debido a la facilidad, el menor costo y la cantidad de datos que pueden ser obtenidos, esta última ha tenido preferencia en los estudios filogenómicos (McCormack et al., 2013). Ejemplos de estas técnicas son el “Restricted site Associated DNA” (RADseq; Baird et al., 2008) y el “Genotyping by Sequencing” (GBS; Elshire et al., 2011). El objetivo de éstas es obtener SNPs en cantidad masiva, sin necesidad de llegar a una secuencia genética específica, logrando esto a través del uso de enzimas de restricción, y su aplicación principal es a nivel intraespecífico (McCormack et al., 2013). Sus desventajas se relacionan con el bajo rendimiento y la falta de reproducibilidad si el DNA obtenido no es de buena calidad (McCormack et al., 2013). Otras técnicas basadas en una representación reducida del genoma es la captura de secuencias o enriquecimiento híbrido (Hodges et al., 2007), el cual consiste en dirigir la secuenciación hacia regiones genómicas específicas, lo que permite obtener una gran variedad de loci, sin hacer reacciones en cadena de

polimerasa específicas (PCR, por sus siglas en inglés); en este caso, se requiere de conocimiento previo de los genomas para poder dirigir la captura y su aplicación es más de carácter supraespecífico (McCormack et al., 2013). Dentro de la captura de secuencias, los marcadores genéticos conocidos como Elementos Ultraconservados (UCEs) (Bejerano et al., 2004), han sido de los más llamativos en años recientes, debido a que tienen un elevado nivel de conservadurismo, con lo que se pueden aplicar a lo largo de grandes grupos biológicos (hasta ahora sólo usados en grupos de animales), al mismo tiempo que ofrecen suficiente variación en los sitios que flanquean las regiones conservadas y que, además, en su mayoría, carecen de copias parálogas, lo que permite resolver relaciones filogenéticas menos profundas (Faircloth et al., 2012).

ANTECEDENTES

El género *Ficus* L.

El género *Ficus* tiene una distribución pantropical y marginalmente subtropical. Las especies del género comúnmente presentan la forma de crecimiento arbórea, pero también existen, en menor abundancia, arbustos y lianas. Las especies de *Ficus* pueden ser organismos de vida libre, pero también hemiepífitos estranguladores. La característica diagnóstica del género es el sicono o higo (Figura 2). Éste es una inflorescencia urceolada, la cual sólo tiene conexión con el exterior a través de un orificio apical estrecho, el cual es llamado ostiolo (Berg & Corner, 2005); es a través de este orificio que los polinizadores pueden ingresar al sicono y realizar su función. Las flores dentro del sicono son unisexuales y se clasifican en flores estaminadas, flores pistiladas con estilo corto y flores pistiladas con estilo largo (Figura 2). Los individuos pueden ser dioicos (ginodioicos) o monoicos, condición que se asocia con grupos taxonómicos como subgéneros o secciones (Berg & Corner, 2005). Por

ejemplo, todos los *Ficus* neotropicales (sección *Pharmacosycea* y sección *Americanae*), son monoicos.

El desarrollo del sicono está estrechamente acoplado con el ciclo de vida de las avispas Agaonidae las cuales se desarrollan completamente dentro del

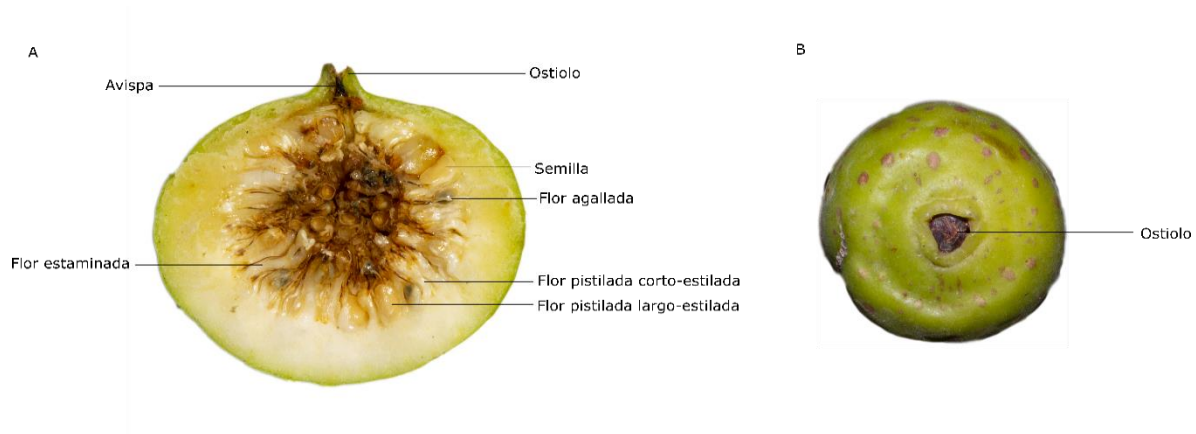


Figura 2. Características morfológicas del sicono. A) Corte longitudinal de *Ficus yoponensis* Desv.; B) Vista apical de *Ficus velutina* Humb. et Bonpl. ex Willd. Imagen: Karen B. Hernández.

sicono, pasando ahí la mayor parte de su vida (Galil & Eisikowitch, 1968). Las fases de desarrollo del sicono fueron descritas por Galil y Eisikowitch (1968): la fase pre femenina o fase A, es la fase más joven, durante la cual éste se encuentra envuelto en las brácteas basales y el ostiolo se encuentra cerrado; en la fase B o femenina, las flores llegan a la madurez, los estigmas se vuelven receptivos, las brácteas del ostiolo comienzan a abrirse y las avispas hembra recién emergidas de otro sicono, cargadas con polen, pueden ingresar al sicono; la fase C o interfloral, es la más larga y va de 3 a 4 semanas en *Ficus sycomorus* L. hasta 6 a 9 semanas en *Ficus petiolaris* Kunth (Piedra-Malagón et al., 2019), en esta etapa, las larvas de las avispas y las semillas se desarrollan en los ovarios; en la fase D o masculina las avispas macho emergen de los ovarios, ayudan a las hembras a salir y son fecundadas, las

anteras maduran y liberan el polen al mismo tiempo que los machos cavan un orificio para que las hembras salgan del sicono con el polen en sus cuerpos; en la fase E o postfloral el sicono cambia de color y textura para poder ser ingerido y dispersado (Figura 3).



Figura 3. Apariencia externa de las fases de desarrollo del sicono en una especie del subgénero *Spherosuke*, sección *Americanae*. Las letras indican las fases en las que los siconos señalados están presentes. Fase A o prefemenina, fase B o femenina, fase C o interfloral, fase D o masculina, fase E o postfloral. Fotografías Karen B. Hernández.

Estos ciclos de vida acoplados son sujeto de interacciones antagonistas con avispas no polinizadoras. Éstas, pueden ser avispas parásitas que ovipositan desde el exterior de los higos, dejando sus huevos dentro de las flores o en la pared del higo (Borges, 2015). También hay avispas parasitoides, las cuales dejan sus huevos dentro de las avispas que ya se están desarrollando dentro de alguna estructura del sicono. Un último grupo incluye a las avispas cleptoparásitas, éstas ovipositan dentro de las agallas formadas por otras avispas, para después matar a las larvas que se desarrollaban previamente (Borges, 2015; Piatscheck, 2019).

Al contrario de lo específico que es la polinización, la dispersión de *Ficus* es llevada a cabo por un gran número de especies, entre las que se encuentran, en mayor abundancia, aves y mamíferos, y de éstos últimos, los murciélagos son los principales; también peces y reptiles han sido documentados como dispersores (Shanahan et al., 2001). Una de las hipótesis para explicar la alta abundancia de especies frugívoras en *Ficus*, es que los siconos son estructuras fácilmente comestibles, que no requieren de picos o uñas especializados para ingerirlos, y que sus semillas, al ser pequeñas, son de fácil deglución (Shanahan et al., 2001).

Sobre el origen del sicono

La familia Moraceae se caracteriza por tener inflorescencias con una alta densidad de flores y en las especies de *Ficus* se observa la máxima expresión de este carácter. Moraceae está incluida dentro del orden Rosales, siendo Rosaceae Juss., el grupo hermano al resto de las familias incluidas en este orden (APG IV, 2016). Con base en las estimaciones de Magallon et al. (2015), Moraceae y Urticaceae Juss., fueron las últimas familias del orden en divergir, hace cerca de 68.5 Ma, mientras que sus familias hermanas, Cannabaceae Martinov. y Ulmaceae Mirb., divergieron hace aproximadamente 73.5 y 79.2 Ma, respectivamente. De acuerdo con la historia evolutiva del orden Rosales, las flores vistosas y la polinización biótica son parte de sus rasgos ancestrales. La familia Rosaceae posee flores pentámeras, poco especializadas (Figura 4.2), por lo que pueden ser polinizadas por diversos tipos de insectos, entre los que se encuentran abejas pequeñas, abejas de probóscide larga, mariposas, moscas o escarabajos (Judd et al., 2016). No obstante, en el clado al que Moraceae pertenece dentro de Rosales, la mayoría de las familias se caracterizan por poseer flores inconspicuas, normalmente carentes de verticilos diferenciados, y

con polinización abiótica y dioicismo; este es el caso de Cannabaceae, Ulmaceae, Urticaceae y Moraceae (Figura 4.1a).

Dentro de Moraceae, los linajes que se originaron primero, como la tribu Moreae (Figura 4.1b), son en su mayoría polinizados por viento (Datwyler & Weiblen, 2004) y las tribus de origen posterior, Ficeae y Castilleae, presentan polinización biótica (Figura 4.10-13). La tribu Dorstenieae, grupo hermano de estas últimas tribus (Clement & Weiblen, 2009), había sido caracterizada con un sistema de polinización abiótico (Datwyler & Weiblen, 2004), sin embargo, estudios recientes en la biología de reproducción de *Dorstenia* L. han revelado que sus especies son polinizadas por pequeños dípteros (de Araújo et al., 2017). Por otro lado, *Dorstenia* posee un receptáculo en forma de plataforma, que en algunas especies se encuentra cerrado en la etapa inicial de desarrollo (Thorogood et al., 2018). Tanto en *Dorstenia* como en *Ficus*, al igual que en la tribu Castilleae, se ha sugerido que la presencia de un involucro pudo haber promovido la visita de polinizadores especializados (Berg, 1990; Datwyler & Weiblen, 2004). Además, se ha encontrado que tanto en *Castilla* Cerv. como en *Dorstenia*, sus polinizadores (thrips y moscas, respectivamente), se desarrollan dentro del receptáculo de estas plantas (de Araújo et al., 2017; Zerega et al., 2004). Esto ha llevado a hipotetizar que el ancestro de *Dorstenia* pudo haber sido un intermedio en la transición hacia la evolución del sicono (Thorogood et al., 2018).

y que algún ancestro relacionado con *Castilla* pudo haber dado origen al sicono característico de los *Ficus* (Zerega et al., 2004).

Especificidad del mutualismo *Ficus* y avispas polinizadoras Agaonidae

La relación simbiótica de *Ficus* con sus polinizadores responde al hecho de que sus ciclos de vida son completamente dependientes uno del otro. A pesar de que es posible el ingreso de otro tipo de avispas al sicono, éstas no sólo no polinizan, sino que suelen ser parásitas o parasitoides (Ramírez, 1974; Wiebes, 1979).

Los primeros taxónomos de avispas Agaonidae (Grandi, 1959; G. Mayr, 1885) notaron la estrecha asociación que éstas compartían con los *Ficus*, sin embargo, el nivel especificidad no había podido ser determinado debido a la inadecuada identidad taxonómica de los hospederos (Wiebes, 1963). Posteriormente, casi de forma simultánea, fue confirmado por diversos autores que cada especie de avispa se asociaba específicamente a una especie de *Ficus* (Baker & Hurd, 1968; Galil & Eisikowitch, 1969; Ramírez, 1970a; van der Vecht, 1956; Wiebes, 1963, 1979). Este grado de asociación especie-específica fue reconocida casi de forma universal y se le conoce como la regla “uno a uno” (Cook & Rasplus, 2003; Cruaud, Cook, et al., 2012).

No obstante, esta relación no es siempre así y es posible detectar distintos grados de especificidad, ya sea que una especie de avispa polinice distintas especies de *Ficus* o que distintas especies de *Ficus* sean polinizadas por una sola especie de avispa (Wiebes, 1979). También se reconoce que encontrar más de una especie de avispa del grupo de las polinizadoras dentro de un sicono, no garantiza

que éstas sean polinizadores efectivos, y tampoco se asegura que su presencia ocasione el establecimiento de las semillas del hospedero (Ramírez, 1970a).

Coevolución, codiversificación y cofilogenia en *Ficus* y avispas polinizadoras Agaonidae

Dado que la relación entre *Ficus* y Agaonidae es uno de los mutualismos más estrictos que se conocen en la naturaleza, se asume que ambos linajes han coevolucionado (Ramírez, 1974; Wiebes, 1979). La coevolución es definida como la selección natural recíproca entre dos o más organismos interactuantes (Thompson, 2005). Cuando sólo uno de los linajes efectúa presión selectiva sobre el otro linaje interactuante, y no viceversa, se conoce como evolución secuencial (Ehrlich & Raven, 1964). Para demostrar que dos linajes están coadaptados, se requiere mostrar que sus ancestros han evolucionado conjuntamente (Ridley, 1996).

La coevolución entre *Ficus*-Agaonidae está parcialmente demostrada debido a que las avispas polinizadoras tienen modificaciones en sus estructuras que son específicas de su interacción con la morfología de los siconos (Ramírez, 1974); por ejemplo, la longitud del ovipositor se encuentra correlacionado con el largo de los estilos, o el aplanamiento dorsoventral de los cuerpos de las avispas coinciden con la disposición horizontal de las brácteas ostiolares (van Noort & Compton, 1996). Adicionalmente, el fechamiento realizado para estimar el origen, tanto de *Ficus*, como de avispas Agaonidae, ha resultado en edades muy similares (Cruaud, Rønsted, et al., 2012; Rønsted et al., 2005). Las estimaciones sobre el tiempo de origen de los grandes grupos de cada linaje (p. ej., subgéneros de *Ficus* y géneros de avispas) han mostrado que ambos están significativamente correlacionados (Cruaud, Ronsted, et al., 2012; Rønsted et al., 2005). Se estima que el origen del mutualismo *Ficus*-Agaonidae se ubica entre 60 y 100 Ma (Cruaud, Rønsted, et al.,

2012; Datwyler & Weiblen, 2004; Machado et al., 2001; Rønsted et al., 2005). La estimación más reciente señala una edad media del origen para avispas y *Ficus* de 75 y 74 Ma, respectivamente (Cruaud, Cook, et al., 2012)¹. Otra evidencia que apoya la coevolución es el hecho de que ambos linajes son monofiléticos (Cruaud, Cook, et al., 2012), lo que implica que la explicación más sencilla es que su interacción estrecha haya evolucionado una sola vez en la historia de la vida. También, a escala macroevolutiva, tres subgéneros de *Ficus* (*Sycomorus* (Gasp.) Miq., *Sycidium* (Miq.) Miq. y *Synoecia* (Miq.) Miq.) son polinizados exclusivamente por tres géneros de avispas (Tabla 2). Además, las secciones pertenecientes a los tres subgéneros restantes de *Ficus* (*Ficus* Corner, *Pharmacosycea* (Miq.) Miq. y *Spherosuke* Raf.), son polinizadas casi de forma exclusiva por un solo género de avispas, con algunas excepciones (Tabla 2).

Por otro lado, otras hipótesis señalan que la especiación de los polinizadores es mediada por la especiación de las plantas hospederas y, en consecuencia, una separación de especies hospederas hermanas, promoverá la divergencia de sus polinizadores (Cruaud, Cook, et al., 2012). A este proceso se le conoce como coespeciación, la cual se define como los eventos de especiación coincidentes y su co-ocurrencia, a través del tiempo, entre dos o más linajes interactuantes (Cruaud & Rasplus, 2016; Hembry & Althoff, 2016). En consecuencia, el resultado de esta especiación se tendría que ver reflejada en filogenias compatibles, las cuales deberían mostrar una topología a modo de espejo (Figura 5), llamada la regla de Fahrenholz (Cruaud, Cook, et al., 2012; Ridley, 1996). Por lo tanto, el campo que se enfoca en estudiar las relaciones coevolutivas, a nivel filogenético, formadas entre

¹ Aunque como puede ser notado, esta estimación es más antigua que la que se conoce para el origen de la familia Moraceae. Este traslape con el origen del mutualismo puede estar sesgado por los métodos de fechamiento utilizados. Magallón et al. (2015) no usaron fósiles de Moraceae en el fechamiento del clado Rosales, mientras que para *Ficus*-Agaonidae hay pocos fósiles confiables: las avispas de los ámbares de República Dominicana de 15 Ma (Poinar, 1993) y los aquenios de *Ficus* de 60 Ma (Collinson, 1989).

dos linajes interactuantes, se le llama cofilogenética (Charleston, 1998; Cruaud & Rasplus, 2016).

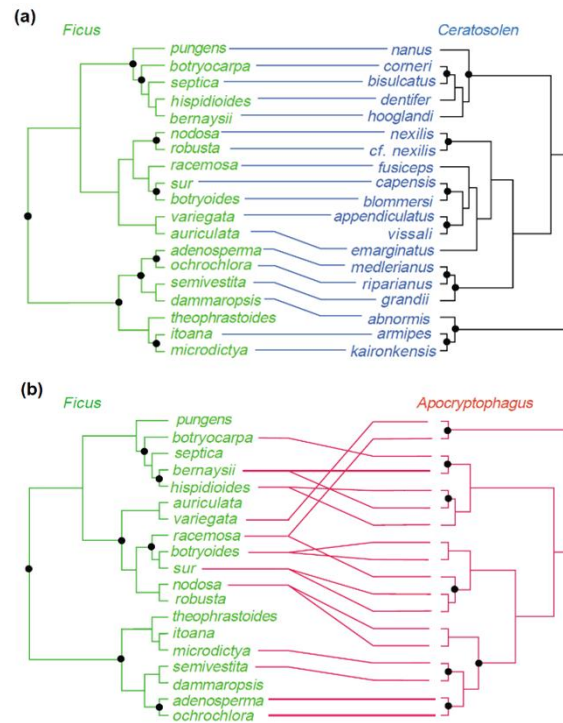


Figura 5. Filogenias comparadas en un grupo de *Ficus* y avispas (tomada de Cook & Rasplus, 2003). A) Filogenias de un grupo de especies de *Ficus* y sus polinizadores del género *Ceratosolen*. B) Filogenias del mismo grupo de *Ficus* y de especies parásitas del género *Apocryptophagus*.

En los grandes grupos taxonómicos de *Ficus* y avispas, es decir, subgéneros y secciones de *Ficus* con géneros de avispas, la coespeciación evaluada a través de métodos cofilogenéticos ha mostrado ser estadísticamente significativa (Cruaud, Ronsted, et al., 2012). En contraste, al evaluar la congruencia filogenética de los dos grupos de *Ficus* que existen para el neotrópico y sus avispas polinizadoras correspondientes, la coespeciación estricta no se cumple (Machado et al., 2005; Satler et al., 2019), aunque estos últimos autores no determinaron el tiempo de origen y divergencia de dichos grupos, lo cual es uno de los requisitos para probar coespeciación (Cruaud & Rasplus, 2016).

Entonces, para realizar un análisis cofilogenético se necesita (Cruaud, Cook, et al., 2012; Cruaud & Rasplus, 2016): 1) un muestreo exhaustivo de hospederos y sus asociados (actuales y de ser posible extintos); 2) hipótesis filogenéticas resueltas y confiables y 3) análisis de fechamiento. Como puede observarse, determinar la coespeciación de dos grupos no es fácil y uno de los mayores impedimentos para realizar este tipo de análisis es el déficit taxonómico y filogenético que aún prevalece (Hembry & Althoff, 2016).

Los análisis cofilogenéticos tienen sus orígenes en la comparación de los ensamblajes entre hospederos y parásitos; con este propósito Page (1990, 1993, 1994), desarrolló el método de reconciliación de árboles filogenéticos “basado en eventos”. Estos métodos consideran los eventos históricos posibles que llevaron a la asociación actual de los interactuantes (Charleston, 1998; Page & Charleston, 1998). Los primeros modelos trataban de explicar las incongruencias de la forma más parsimoniosa; más tarde, se mejoraron los algoritmos para buscar todas las posibles combinaciones al mapear un árbol sobre el otro, y así encontrar soluciones óptimas (Charleston, 1998). De este modo, la incongruencia de las topologías de los árboles puede deberse a cambios de hospedero (“host switch”), eventos de extinción (“losses”), duplicación (especiación del parásito, pero no del hospedero) y fallas en la asociación al momento de que ocurre la divergencia (“failure to diverge”)(Page & Charleston, 1998). Estos métodos se han ido mejorando, añadiendo la posibilidad de incluir la incertidumbre de las filogenias (Baudet et al., 2015) o usar filogenias que incluyan un mayor número de taxa (Doyon et al., 2010).

La contraparte de los métodos “basados en eventos” son los métodos de “ajuste global”, que pueden incorporar filogenias con politomías y asociaciones de parásitos con múltiples hospederos (Legendre et al., 2002), aunque los métodos de

“ajuste global” no muestran los escenarios alternativos al proceso de coespeciación (Jousselin et al., 2008).

Al usar métodos basados en eventos, las pruebas de reconciliación de árboles realizadas en el mutualismo *Ficus*-avispa de higo han arrojado diferentes resultados dependiendo del grupo analizado. En especies de *Ficus* subg. *Sycomorus*, se encontró que la filogenia de las avispas polinizadoras *Ceratosolen* está asociada significativamente a eventos de coespeciación con los hospederos, mientras que no fue así para las avispas parásitas *Apocryptophagus*. Por el contrario, en la sect. *Galoglychia* se determinó que existen eventos de coespeciación significativos con los géneros de avispas parásitas *Otitesella* y *Phylotrypesis*, pero no con las polinizadoras (Jousselin et al., 2008). Finalmente, para una comunidad de especies de *Ficus* neotropicales, no se han detectado eventos de coespeciación significativos con sus polinizadoras (Jackson et al., 2008; Machado et al., 2005).

Clasificación del género *Ficus*

La taxonomía de *Ficus* ha sido complicada de establecer debido a su enorme diversidad de especies. Gasparrini (1844) lo subdividió en diez géneros distintos (Tabla 2). Posteriormente Miquel (1867) lo reagrupó nuevamente en un género y creó distintos subgéneros, a partir de la clasificación hecha por Gasparrini. Tiempo antes de que fuera publicada la propuesta de Miquel, Rafinesque (1838) ya había creado distintos subgéneros, no obstante, sus publicaciones pasaron inadvertidas. Casi un siglo más tarde, Corner (1965), dada su gran labor en la revisión de los *Ficus* de Asia y Australia, tanto en material de campo como de herbario, extendió la propuesta de Miquel.

Con base en la estrecha relación que mantienen los *Ficus* con sus avispas polinizadoras, Ramírez (1977) propuso una nueva clasificación para *Ficus*, teniendo como principal fundamento el género de avispas que poliniza a cada subgénero. Debido a la falta de caracteres morfológicos para separar a los subgéneros y secciones, esta clasificación no fue aceptada.

Antes de su muerte, E. J. H. Corner dejó un gran trabajo inconcluso sobre los *Ficus* de la Flora Malesiana, por lo que C. C. Berg, experto en los *Ficus* de África y América, fue encomendado para terminar la propuesta de este autor. Berg & Corner (2005) es la clasificación infragenérica más actual que se tiene para *Ficus*. Recientemente, Pederneiras et al. (2015) hicieron una revisión de la clasificación, en la cual rescataron algunos nombres propuestos por Rafinesque (1838).

Las relaciones filogenéticas de los subgéneros de *Ficus* han mostrado ser polifiléticas o monofiléticas, dependiendo de las especies seleccionadas y el tipo y número de genes que han sido usados para su inferencia (Cruaud, Rønsted, et al., 2012; Jousselin et al., 2003; Rønsted et al., 2008; Weiblen, 2000). Al usar un marcador nuclear (Espaciador Interno Transcrito, ITS) (Weiblen, 2000), dos (ITS+Espaciador externo transcrito, ETS) (Jousselin et al., 2003) o tres (ITS+ETS+ Gliaceraldehído trifosfato dehidrogenasa, G3pdh) (Rønsted et al., 2008), distintos autores mostraron que los subgéneros propuestos por Corner (1965) no se recuperaban como recíprocamente monofiléticos; no obstante, la mayoría de las secciones sí son monofiléticas. Una tendencia general en todos los estudios es que las secciones *Conosycea* (Miq.) Corner, *Malvanthera* Corner y *Americanae* Miq. se han recuperado como monofiléticas; estas tres secciones pertenecen al subgénero *Spherosuke*, tradicionalmente conocido como *Urostigma* (Gasp.) Miq.

Tabla 2. Historia de la clasificación de *Ficus* L. y los géneros de avispas asociados.

Rafinesque (1838) Subgéneros	Gasparri (1844) Géneros	Miquel (1867) Subgéneros /Secciones	Corner (1965) Subgéneros /Secciones	Berg y Corner (2005) Subgéneros/ Secciones/ Subsecciones	Géneros de Agaonidae
<i>Cottana</i>	<i>Caprificus</i>	<i>Erythrogyne</i>	<i>Ficus</i>	<i>Ficus</i>	
<i>Gonosuke</i>	<i>Covellia</i>	<i>Eusyce</i>	<i>Adenosperma</i>	<i>Ficus</i>	<i>Blastophaga</i>
<i>Kenkramis</i>	<i>Cystogyne</i>	<i>Eriogyce</i>	<i>Ficus</i>	<i>Eriogyce</i>	<i>Valisia</i>
<i>Necalistis</i>	<i>Erythrogyme</i>	<i>Plagiostigma</i>	<i>Kalogyce</i>	<i>Pharmacogyce</i>	
<i>Oluntos</i>	<i>Ficus</i>	<i>Pogonotrophe</i>	<i>Neomorpha</i>	<i>Orogyce</i>	<i>Dolichoris</i>
<i>Perula</i>	<i>Galoglychia</i>	<i>Sycidium</i>	<i>Rhizocladus</i>	<i>Pharmacogyce</i>	<i>Tetrapus</i>
<i>Spherosuke</i>	<i>Macrophtalma</i>	<i>Sycomorus</i>	<i>Sinosycidium</i>	<i>Sycidium (terega)*</i>	<i>Krabidibia</i>
<i>Sukeon</i>	<i>Sycomorus</i>	<i>Trematogyce</i>	<i>Sycidium</i>	<i>Sycidium</i>	
<i>Terega</i>	<i>Tenorea</i>	<i>Trichogyce</i>	<i>Sycocarpus</i>	<i>Palaeomorpha</i>	
<i>Varinga</i>	<i>Urostigma</i>	<i>Pharmacogyce</i>	<i>Pharmacogyce</i>	<i>Sycomorus</i>	<i>Ceratosolen</i>
		<i>Synoecia</i>	<i>Oreogyce</i>	<i>Adenosperma</i>	
		<i>Urostigma</i>	<i>Pharmacogyce</i>	<i>Boscheria</i>	
			<i>Sycomorus</i>	<i>Dammaropsis</i>	
			<i>Urostigma</i>	<i>Hemicardia</i>	
			<i>Americana</i>	<i>Papuasyce</i>	
			<i>Conogyce</i>	<i>Sycomorus</i>	
			<i>Galoglychia</i>	<i>Sycocarpus</i>	
			<i>Leucogyne</i>	<i>Synoecia</i>	<i>Wiebesia</i>
			<i>Malvanthera</i>	<i>Kissogyce</i>	
				<i>(Apioogyce)*</i>	
				<i>Rhizocladus</i>	
			<i>Stilnophyllum</i>	<i>(Pogonotrophe)*</i>	

<i>Urostigma</i>	<i>Urostigma</i> (<i>Spherosuke</i>)*	
	<i>Americana</i>	<i>Pegoscapus</i>
	<i>Galoglychia</i> (<i>Platyphyllae</i>)*	7 géneros [§]
	<i>Urostigma</i> (<i>Cordifoliae</i>)*	
	Subsect. <i>Urostigma</i>	<i>Platyscapa</i>
	Subsect. <i>Conosycea</i>	3 géneros [‡]
	<i>Stilnophyllum</i> Subsect.	<i>Pleistodontes</i>
	<i>Stilnophyllum</i> Subsect.	
	<i>Malvanthera</i> (<i>Urostigma</i>)*	

*Pederneiras et al. (2015) correcciones taxonómicas. §*Agaon*, *Alfonsiella*, *Allotrizon*, *Courtella*, *Elisabethiella*, *Nigeriella*, *Paragaon*. ‡*Eupristina*, *Deilagaon*, *Watersoniella*.

Así mismo, la sección *Pharmacosycea*, exclusiva del Neotrópico, se ha recuperado como el grupo hermano de todos los *Ficus*. Las filogenias inferidas por Weiblen (2000) y Jousselein et al., (2003) mostraron que la mayoría de las secciones del subgénero *Ficus* sensu (Corner, 1965) podían formar un grupo monofilético, no obstante, algunas especies de este grupo aparecen anidadas dentro de distintos clados.

Más tarde, Cruaud, Rønsted, et al. (2012) utilizaron cinco regiones nucleares con las que infirieron las relaciones filogenéticas de las secciones propuestas en la clasificación de Berg & Corner (2005). Con ello, los subgéneros *Sycidium*, *Spherosuke* y *Sycomorus* se recuperaron como monofiléticos, mientras que *Ficus* y *Pharmacosycea* se mantuvieron como polifiléticos; la sección *Pharmacosycea* se mantuvo como el grupo hermano de todos los *Ficus*. Recientemente, Bruun-Lund et al. (2017), infirieron las relaciones filogenéticas de los subgéneros utilizando el plastoma. Como resultado, obtuvieron una filogenia discordante con las filogenias nucleares, y ciertos grupos se recuperaron como polifiléticos, entre ellos las secciones *Americanae* y *Oreosycea* (Miq.) Corner, y la subsección *Frutescentieae* Sata.

Finalmente, Rasplus et al. (2018), usando datos de RADseq, obtuvieron una topología congruente con la clasificación de Berg & Corner (2005), y recuperaron la monofilia de la mayoría de los subgéneros, excepto la del subgénero *Ficus*. Este es el único estudio en el que la sección *Pharmacosycea* no se recuperó como el grupo hermano del resto de los integrantes del género.

Sistemática y taxonomía de los *Ficus* neotropicales

De los seis subgéneros actualmente reconocidos para *Ficus*, únicamente dos se encuentran en el Neotrópico; cada subgénero está representado, a su vez, por una

sección, las cuales son exclusivas del continente americano: el subgénero *Spherosuke*, sección *Americanae* y subgénero *Pharmacosycea*, sección *Pharmacosycea* (Corner, 1965; Berg & Corner, 2005). Berg (1989) estimó 120 especies para la sección *Americanae* y veinte especies para la sección *Pharmacosycea*. En la revisión más reciente (Berg & Corner, 2005) el número de especies asociadas a la sección *Americanae* fue reducida a 100 especies.

Existen diversos caracteres para identificar las especies de *Ficus*. De acuerdo con la revisión hecha por Ibarra-Manríquez & Wendt (1992), las características para delimitar las especies de *Ficus* neotropicales son muy heterogéneas. Entre las características que se han considerado más importantes para delimitar especies de *Ficus* neotropicales se encuentran: i) estrategia de establecimiento de los árboles (germinación en el suelo, sobre algún hospedero, o sobre rocas), ii) forma, tamaño y pubescencia de las hojas, número de venas laterales y ángulo de éstas, y iii) número de brácteas basales del sicono, longitud del pedúnculo, tamaño y color del sicono, así como forma y tamaño del ostiolo. Se ha mencionado que las características de las flores estaminadas y pistiladas no son variables en las especies neotropicales (DeWolf, 1960), por lo que no se han usado para separar especies, aunque esto tampoco ha sido estudiado con profundidad en tiempos recientes.

La falta de homogeneidad en los tratamientos taxonómicos de las especies americanas refleja la complejidad de usar los caracteres arriba mencionados para separar especies. Los tratamientos regionales suelen considerar la variación de las especies a nivel local, lo que genera un incremento, no siempre claramente justificado, en el número de especies descritas. Dentro de la sect. *Americanae*, se ha indicado que existen varias especies que son difíciles de distinguir entre sí, las cuales se engloban dentro de seis complejos de especies (Berg, 1989, 2007): *F. americana*, *F. aurea*, *F. citrifolia*, *F. obtusifolia*, *F. pertusa* y *F. trigonata*, para los

cuales se han descrito especies sin una delimitación clara. Berg (1989) señala el problema de esta forma: “los complejos de especies en la sect. *Americanae* comprenden un número de entidades parcialmente alométricas (formas), que son morfológicamente tan cercanas que su reconocimiento es frecuentemente muy difícil o algunas veces imposible. Además, los polinizadores de dichas formas, dentro de los complejos, pueden ser diferentes, lo que implica un posible aislamiento genético”.

Los trabajos en sistemática filogenética sobre los *Ficus* neotropicales son muy escasos. Algunas especies han sido incluidas dentro de los análisis para resolver las relaciones a nivel de subgénero, al mismo tiempo que se ha puesto a prueba la coespeciación con sus avispas polinizadoras (Cruaud, Rønsted, et al., 2012; Jackson et al., 2008; Machado et al., 2005). Los marcadores de cloroplasto no poseen suficiente variación para distinguir entre especies (Figura 4A). En consecuencia, los marcadores moleculares comúnmente usados en *Ficus* son nucleares, y van de uno a tres marcadores; no obstante, éstos no han sido eficientes para resolver las relaciones entre las especies americanas (Figura 5; Cruaud, Rønsted, et al., 2012; Jackson et al., 2008). De hecho, con base en datos de polimorfismo intraespecífico se ha sugerido que los *Ficus* neotropicales podrían estar sujetos a eventos de hibridación (Jackson et al., 2008; Machado et al., 2005). Esto se ha inferido con base en terminales parafiléticas cuando se han muestreado varios individuos por especie en una comunidad (Jackson et al., 2008). Además de los estudios anteriores, no existe una filogenia robusta para los *Ficus* de la sect. *Americanae*, y hasta donde se conoce, aún no ha habido intentos por resolver el problema de los complejos de especies propuestos por Berg (2007).

Sistemática y taxonomía de la familia Agaonidae (Hymenoptera: Chalcidoidea)

Las avispas que polinizan a los *Ficus* pertenecen a la familia Agaonidae, superfamilia Chalcidoidea (Hymenoptera). La superfamilia de los chalcidos está integrada por avispas extremadamente pequeñas que generalmente miden de uno a cuatro milímetros (Munro et al., 2011). Se estima que pueden existir ca. 500,000 especies, sin embargo, sólo 23,000 han sido descritas (Munro et al., 2011).

La familia Agaonidae ha tenido también una taxonomía muy inconsistente. A las avispas polinizadoras de higos junto con otras avispas parásitas de éstos, se les consideró parte de la subfamilia Agaoninae (Ashmed, 1904; Bouček, 1993), mientras que otros grupos de avispas también parásitas se clasificaron en otras subfamilias, como Sycophaginae (Ashmed, 1904). Posteriormente, diferentes estudios mostraron que dentro de la familia Agaonidae únicamente se encontraban las avispas polinizadoras de higos y que todas ellas formaban un grupo monofilético (Cruaud et al., 2010; Munro et al., 2011; Rasplus et al., 1998). No obstante, la filogenia más reciente de Chalcidoidea (Heraty et al., 2013) recuperó a Sycophaginae como grupo hermano de las Agaonidae *sensu stricto* (avispa polinizadoras de *Ficus*), por lo que Sycophaginae actualmente se clasifica como una subfamilia de Agaonidae *sensu lato* (van Noort & Rasplus, 2019).

Las hembras de Agaonidae *s. s.* se caracterizan por tener un apéndice sosteniendo una lamela transversal, finos dientes, hileras u ondulaciones por debajo de la cabeza (Figura 6A). La cabeza es normalmente más larga que ancha en la parte donde se insertan los ojos compuestos y tienen principalmente tres ocelos (Figura 6C). El rostro está dividido por la mitad con un amplio canal o depresión (Figura 6C), del cual surgen las antenas. El tercer segmento de las antenas termina en un punto apical (Figura 6A). En muchas especies, el mesosterno tiene sacos polínicos o corbículas metasomales (Figura 6A), y la coxa anterior también tiene una

corbícula (corbícula coxal) (Figura 6D). La tibia anterior posee un grupo de dientes dorso-apicales (Figura 6D); la tibia trasera tiene dientes axiales y anti axiales; todos los tarsos son pentámeros. Los machos son ápteros. Sus ojos son pequeños o vestigiales y los ocelos están ausentes (Figura 6B). Las antenas están situadas en surcos en cada lado de una prominencia media, o en un surco en la parte frontal de la cabeza, el número de segmentos es reducido. Las patas tienen tibias acortadas y espinosas; los segmentos de los tarsos son frecuentemente reducidos (Figura 6B). El gáster termina en un tubo con la genitalia, frecuentemente con pequeños *claspers* con uñas (Figura 6E); su color es amarillo (Berg & Wiebes, 1992).

Las características diagnósticas de la familia Agaonidae *s. s.* más reconocidas son dos: la presencia de un apéndice mandibular que sostiene a la lamela ventral (hileras de dientes), y un metasoma telescópico en los machos (Figura 6A) (Cruaud et al., 2010). Sin embargo, Heraty et al. (2013) reconocieron cerca de nueve sinapomorfías excluyendo Sycophaginae. En este contexto, al menos 640 especies han sido descritas para Agaonidae *s. s.* (van Noort & Rasplus, 2019). No obstante, dado que repetidamente se ha encontrado que más de una especie de avispa está asociada con una especie de *Ficus*, se estima que la riqueza de este taxón puede llegar a ser de más de mil especies (Lopez-Vaamonde et al., 2009) o incluso hasta 2300 (van Noort & Rasplus, 2019).

De acuerdo con la clasificación más reciente, propuesta por Cruaud et al. (2010), existen 21 géneros dentro de Agaonidae *s. s.* y frecuentemente un único género se encuentra asociado a una sección o subgénero de *Ficus* (Tabla 2) (Cruaud, Rønsted et al., 2012). Las excepciones son la sección *Galoglichya* (Gasp.) Endl., la cual contiene siete géneros de avispas polinizadoras, y la subsección

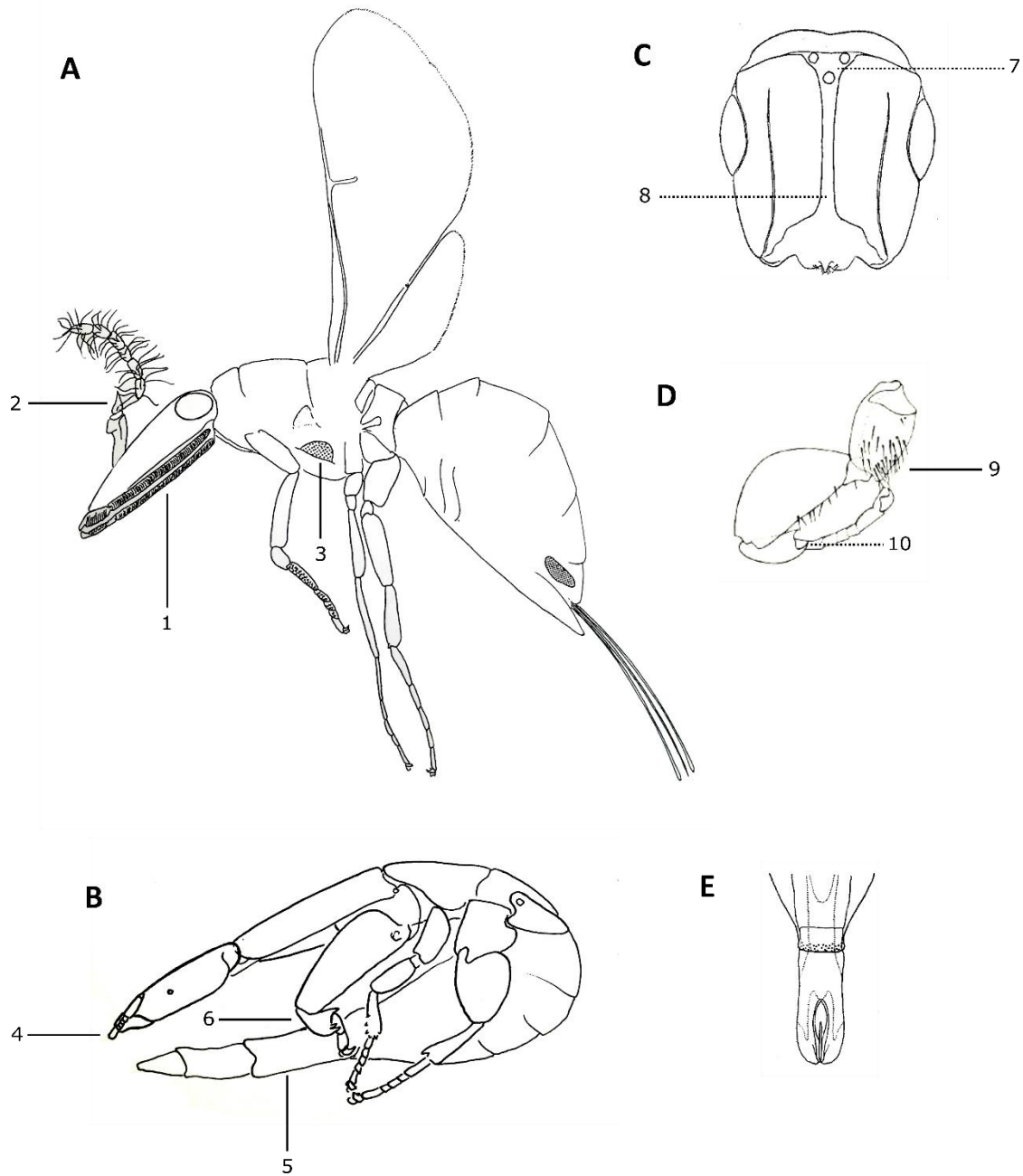


Figura 6. Caracteres diagnósticos de Agaonidae. A) *Courtella michaloudi* Wiebes hembra. 1. Lamela ventral. 2. Tercer segmento antenal. 3. Corbícula del metasoma. B) *Courtella sylviae* Wiebes macho. 4. Antena reducida. 5. Metasoma telescópico. 6. Tibia reducida. C) *Ceratosolen abnormis* Wiebes hembra vista apical de la cabeza. 7. Ocelos. 8. Canal. D) *Deilagaon megarhophalus* pata frontal hembra. 9. Corbícula coxal. 10. Dientes de la tibia. E) *Ceratosolen bianchii* Wiebes gaster macho. (Ilustraciones A y B; Berg & Wiebes, 1992. C y E; Wiebes, 1963. D; (Ramirez, 1978)).

Conosycea, que tiene interacción con tres géneros de éstas. Probablemente por esta relación con diversos géneros de avispa que hay en *Conosycea* y por su demostrada monofilia (Cruaud, Rønsted, et al., 2012), este taxón tenga que ser elevado nuevamente a la categoría de sección. Por otro lado, existe un único género de avispa del cual se desconoce su hospedero: *Paragaon* Joseph (Cruaud et al., 2010).

La monofilia de los géneros de Agaonidae s. s. previamente descritos fue probada por Cruaud et al. (2010) y en la mayoría de los casos ésta se cumple. Los géneros no monofiléticos son *Blastophaga* Gravenhorst, *Dolichoris* Hill y *Wiebesia* Bouček. El género *Liporrhopalum* Waterston fue unido a *Krabidibia* Saunders, y el subgénero *Valisia* Wiebes, del género *Blastophaga*, fue elevado a la categoría de género.

Los análisis filogenéticos moleculares de Agaonidae s. s. habían arrojado, frecuentemente, que *Tetrapus* Mayr era el género hermano de todas las Agaonidae (Cruaud et al., 2010; Herre et al., 1996; Lopez-Vaamonde et al., 2009; Machado et al., 2001); este género está asociado a la sect. *Pharmacosycea* y es exclusivo del continente americano. No obstante, en la última filogenia, en la que se utilizó un mayor número de marcadores moleculares que en los estudios previos (Cruaud et al., 2012b), se encontró que *Tetrapus* estaba anidado dentro de Agaonidae; y *Krabidibia* se recuperó como el género hermano de toda la familia Agaonidae s. s. Particularmente, A. Cruaud y J-Y Rasplus (Support Information I, en Cruaud, Rønsted et al., 2012) discuten este resultado en el contexto de las teorías previamente planteadas sobre el origen de este grupo. De acuerdo con estos autores, la alta tasa mutacional que tiene el marcador molecular más comúnmente usado para inferir relaciones filogenéticas en insectos, el gen que codifica para la *Citocromo Oxidasa I* (*COI*), provocó que se generara un efecto de atracción de ramas largas, debido a la

extensión de un espaciador intergénico de segmentos repetidos de AT. Así, tanto en *Ficus* como en Agaonidae, el grupo hermano de ambos linajes aún no se encuentra completamente resuelto.

Taxonomía y sistemática de las avispas Agaonidae neotropicales

Existen dos géneros exclusivamente neotropicales de avispas Agaonidae polinizadoras. *Pegoscapus* Cameron, es el género que poliniza a las especies del subg. *Spherosuke*, sect. *Americanae*, y *Tetrapus*, como se ha mencionado anteriormente, es el género de avispas que polinizan a las especies del subg. *Pharmacosycea*, sect. *Pharmacosycea* (Ramírez, 1970b; Rasplus & Soldati, 2006). Ambos géneros han mostrado ser monofiléticos (Cruaud, Rønsted et al., 2012). Adicionalmente, se presume de la existencia de un tercer grupo de avispas Agaonidae neotropicales. Ramírez-Benavides (2016), hace referencia a la existencia de un subgénero al que nombra *Hexapus* subg. nov., debido a que los machos de estas avispas tienen tres pares de patas funcionales y no dos, como sucede en *Tetrapus*.

Los principales tratamientos taxonómicos de las especies neotropicales de Agaonidae fueron realizados por Bouček (1993), Grandi (1919, 1934, 1938), Ramírez (1970b) y Wiebes (1983, 1995b, 1995a). *Tetrapus* se ha mantenido sin cambios taxonómicos desde que fue descrito por G. Mayr (1885) y a partir de ahí, únicamente siete especies han sido descritas (van Noort & Rasplus, 2019); esto a pesar de que se reconocen al menos veinte especies de *Ficus* en la sect. *Pharmacosycea* que potencialmente tendrían asociada una o más especies de avispas.

Inicialmente, *Pegoscapus* estaba incluido dentro del género *Blastophaga* subg. *Secundeisenia* Schulz; posteriormente, por el principio de prioridad, el subg. *Secundeisenia* pasó a ser parte del subg. *Pegoscapus* (Bouček, 1993). De acuerdo

con la última filogenia publicada (Cruaud et al., 2010), *Pegoscapus* se anida en un clado no resuelto que comprende a los géneros *Eupristina* Saunders, *Waterstoniella* Grandi y *Deilagaon* Wiebes. Los autores mencionan que las hembras de *Pegoscapus* y *Eupristina* presentan como característica compartida poseer el primer flagelómero dividido, al contrario del resto de las especies africanas (Figura 7) (Cruaud et al., 2010).

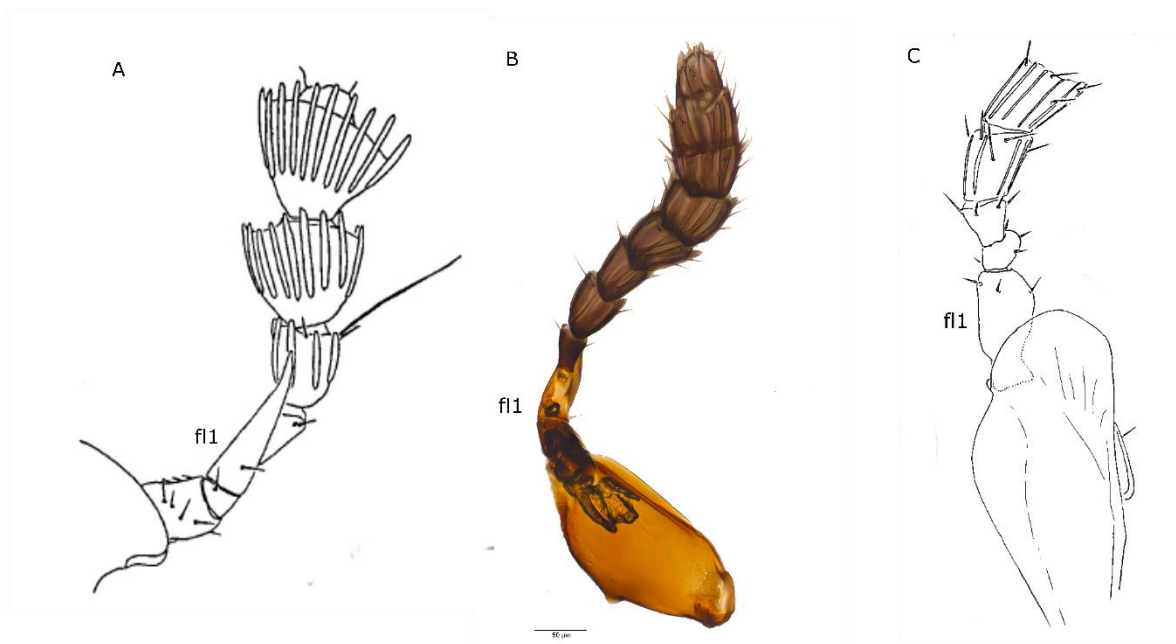


Figura 7. Antenas de los géneros filogenéticamente cercanos *Eupristina*, *Pegoscapus* y *Elisabethiella*. A) *Eupristina cyclostigma* (Wiebes, 1992), B) *Pegoscapus* sp. (fusión de siete micrografías, K. B. Hernández y N. Castro) y C) *Elisabethiella bergi* (Wiebes, 1989). fl1, flagelómero uno.

Las características para distinguir a *Pegoscapus*, normalmente son aquellas que contrastan con *Tetrapus*, ya que comparten la misma distribución. En el primero de estos géneros, la cabeza de las hembras es tan larga como ancha, aunque puede presentar variaciones; sus apéndices mandibulares sostienen lamelas ventrales, y no dientes como en *Tetrapus* (Figura 8). Las antenas de los machos son delgadas y el mesonoto está fusionado con el metanoto, los cuales están

ligeramente unidos con el propodeo (Wiebes, 1995b). Esta última característica también distingue a *Pegoscapus* de *Eupristina* (Cruaud et al., 2010).

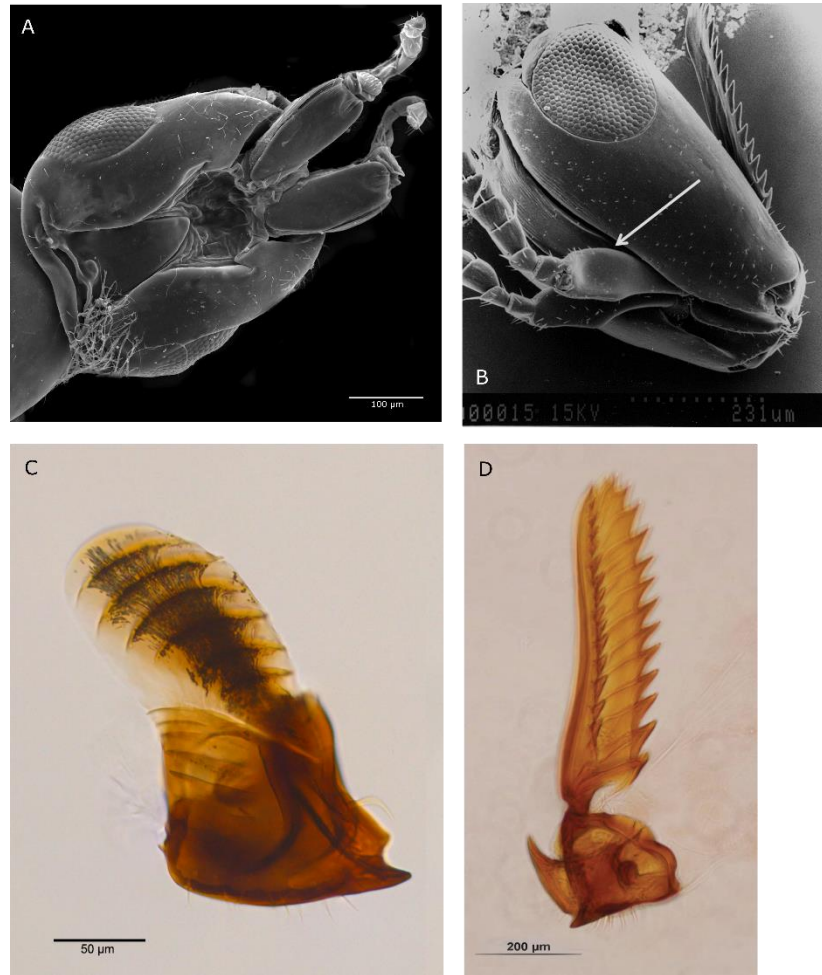


Figura 8. Estructuras diagnósticas para separar las hembras de los géneros de avispas neotropicales. *Pegoscapus* sp., A) cabeza (microscopio electrónico de barrido, Karen B. Hernández) y C) mandíbula, (fusión de seis micrografías, K. Hernández y N. Castro). *Tetrapus* sp. B) cabeza y D) mandíbula (Ramírez, 2016).

Bouček (1993), documentó 45 especies descritas a lo largo del nuevo mundo y la lista más actual señala 47 especies (van Noort & Rasplus, 2019). Esto significa que, a pesar de la diversidad potencial que existe de *Pegoscapus* (puesto que hay

más de 100 especies de *Ficus* de la sect. *Americanae* y dado que puede haber más de una sola especie de avispa por hospedero), la caracterización taxonómica de este grupo, en las últimas cuatro décadas, ha quedado en rezago.

Hasta donde se conoce, sólo en un estudio se han tratado de inferir las relaciones filogenéticas de las especies de *Pegoscapus* con un muestreo relativamente amplio. Su et al. (2008) infirieron relaciones filogenéticas con base en el marcador *COI* para avispas asociadas a las especies de *Ficus* distribuidos en México. El resultado más destacado de este trabajo es que más de una especie de avispa está asociada con una especie de hospedero. No obstante, los nodos más internos de la filogenia no fueron resueltos (Su et al., 2018) y la identidad de los *Ficus* tampoco puede ser precisada dada la complejidad taxonómica que aún prevalece en la sect. *Americanae*, por lo que no se pueden inferir relaciones certeras con estos datos ni el grado de especificidad hacia los hospederos.

El complejo *Ficus aurea* y sus polinizadores del género *Pegoscapus*

Berg (2007) nombró el complejo *Ficus aurea* con base en una especie descrita como *F. aurea* Nutt., la cual es polimórfica y engloba 14 sinonimias. De acuerdo con Berg (2015), *F. aurea* es extremadamente variable en la forma y las dimensiones de las hojas, así como en el tamaño de los receptáculos y de las brácteas basales. Se puede apreciar el intervalo de características morfológicas que muestra con base en la descripción: hojas oblongas a elípticas, con la base aguda a redondeada, versus individuos con hojas cordiformes a elípticas, con la base cordada a redondeada; hojas pequeñas (hasta c. 10 cm) vs. grandes (más de 10 cm); higos 0.6-0.8 cm vs. 1-1.2 cm; siconos sésiles vs. pedunculados (sólo en la parte norte de Mesoamérica). Los siconos grandes generalmente tienen brácteas basales grandes, en tanto que en los pequeños éstas van de pequeñas a grandes.

Teniendo en cuenta los extremos en la variación, Berg (2007) reconoció cuatro entidades taxonómicamente informales. La forma "*aurea*", con hojas oblongas a elípticas, de hasta 10 cm de largo, con la base aguda a redondeada y siconos 0.6-0.8 cm de diámetro, sésiles o pedunculados. La forma "*tuerckheimii*", con hojas oblongas a elípticas, de más de 10 cm de largo, con la base aguda a redondeada y siconos de 1-1.2 cm de diámetro, sésiles. La forma "*isophlebia*", con hojas cordiformes a ovadas, la base cordada a redondeada y siconos de ca. 1 cm de diámetro, sésiles. Finalmente, la forma "*cookii*", con hojas cordiformes a ovadas, la base cordada a redondeada y con siconos de ca. 1 cm de diámetro, pedunculados. Ninguna de las formas puede ser relacionada a cierto hábitat o elevación. Ibarra-Manríquez et al. (2012) reconocieron la propuesta de Berg (2007), sin embargo, quedó abierta la duda sobre el número de entidades que conformaban realmente *F. aurea*. Estos autores ilustraron dos tipos de variantes que lograron distinguir (Figuras 9 y 10), además de reconocer a *F. rzedowskiana* como una especie válida (Figura 11), la cual también fue incluida dentro del complejo por Berg (2007, 2015).

Por otro lado, se han documentado distintas especies de avispas para algunas de las especies de *Ficus* que fueron sinonimizadas dentro de *F. aurea* (Berg, 2007; Ibarra-Manríquez et al. 2012). Estas avispas son: *P. mexicanus* Ashmead (*F. aurea* Nutt.), *P. urbanae* Ramirez (*F. isophlebia* Standl.), *P. jimenezii* Grandi (*F. jimenezii* Standl.) y *P. carlosi* Ramírez y *P. mariae* Ramírez (*F. tuerckheimii* Standl.). Las especies de este grupo que presentan más similitud entre sí son *P. mexicanus* y *P. jimenezii*. Wiebes (1983) señaló que ambas especies tienen exclusivamente un diente apical alargado en la mandíbula de la hembra. No obstante, se ha encontrado recientemente que algunas otras avispas de *Pegoscapus*, polinizadoras de especies no relacionadas al complejo *F. aurea*, también poseen esta característica (Nadia Castro, com. pers.). La característica que separa a *P.*

mexicanus y *P. jimenezii* es el número de setas que tienen en la maxila (Wiebes, 1983). Por su lado, *P. carlosi* y *P. mariae* tienen en común la ausencia de la corbícula coxal, carácter que está presente en el resto de las especies del género. Estas especies también difieren en los colores del cuerpo (Ramírez, 1970a), siendo *P. mariae* de color predominantemente amarillo, mientras que *P. carlosii*, es de color negro. En *P. urbanae*, se señala que la característica más distintiva es la presencia de setas planas y robustas en algunos de los segmentos distales de las antenas (Wiebes, 1995b).

Finalmente, Vázquez-Quintana (2019), con base en el análisis Multi-rate Poisson tree del gen *COI*, determinó 9 linajes de avispa de higo asociados a los hospederos del complejo *F. aurea*, delimitados con el método. Sus resultados indican que existen más especies de avispa asociadas al complejo de las que se conocían previamente, las cuales difieren en sus características morfológicas con respecto a las especies previamente descritas para los hospederos del complejo *F. aurea*.

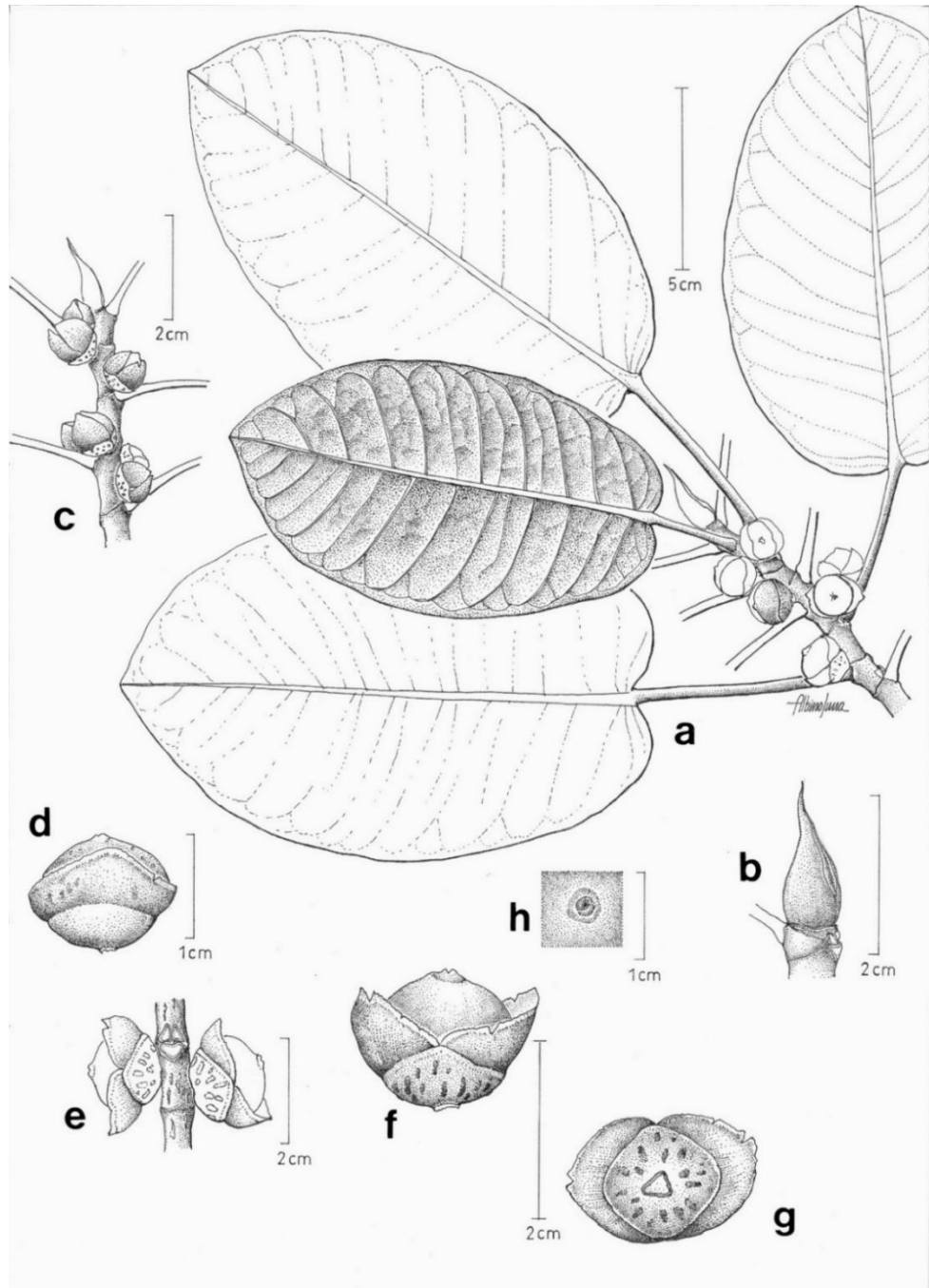


Figura 9. Ilustración asociada a *Ficus aurea* en Ibarra-Manríquez et al. (2012).

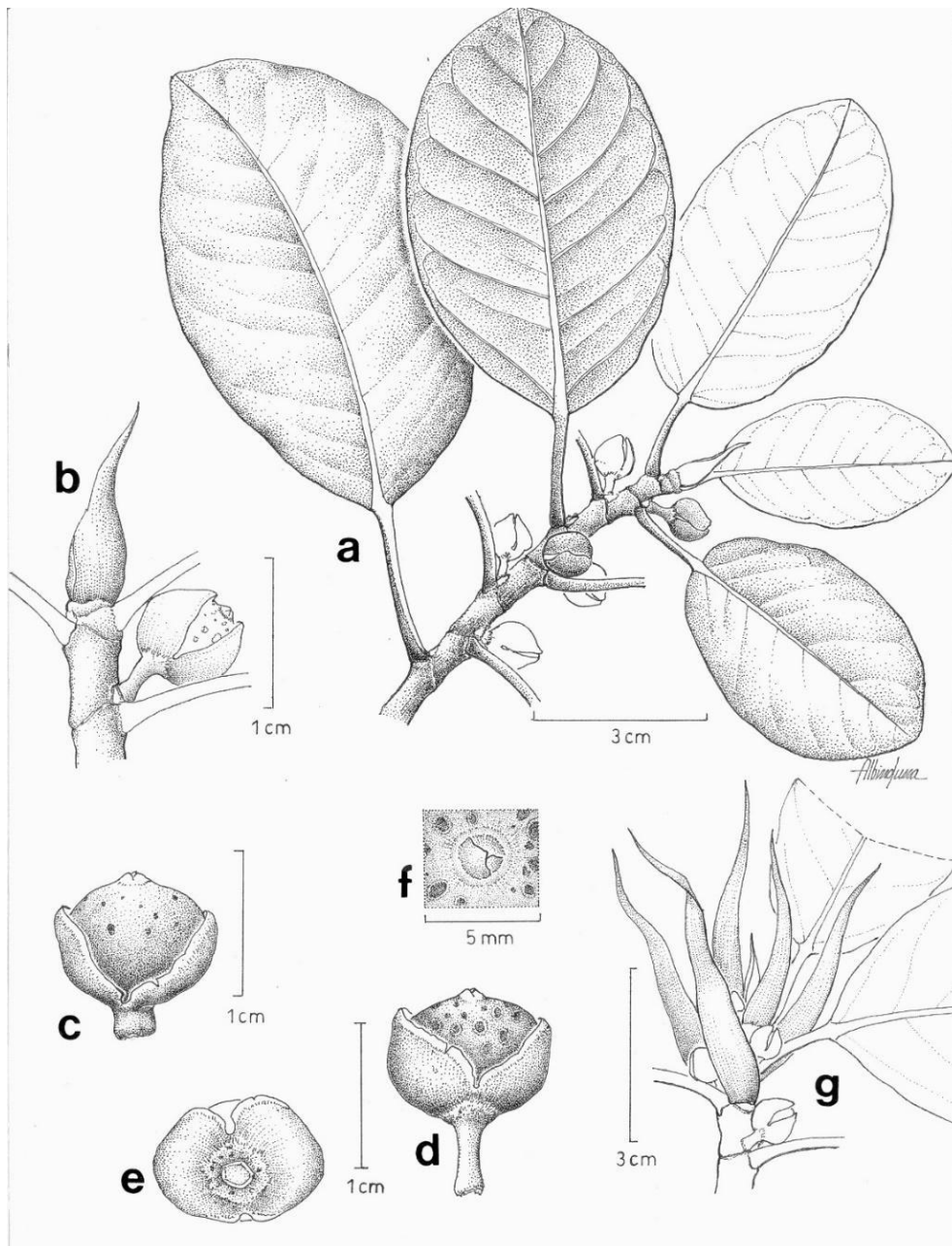


Figura 10. Segunda ilustración asociada a *Ficus aurea* en Ibarra-Manríquez et al. (2012).

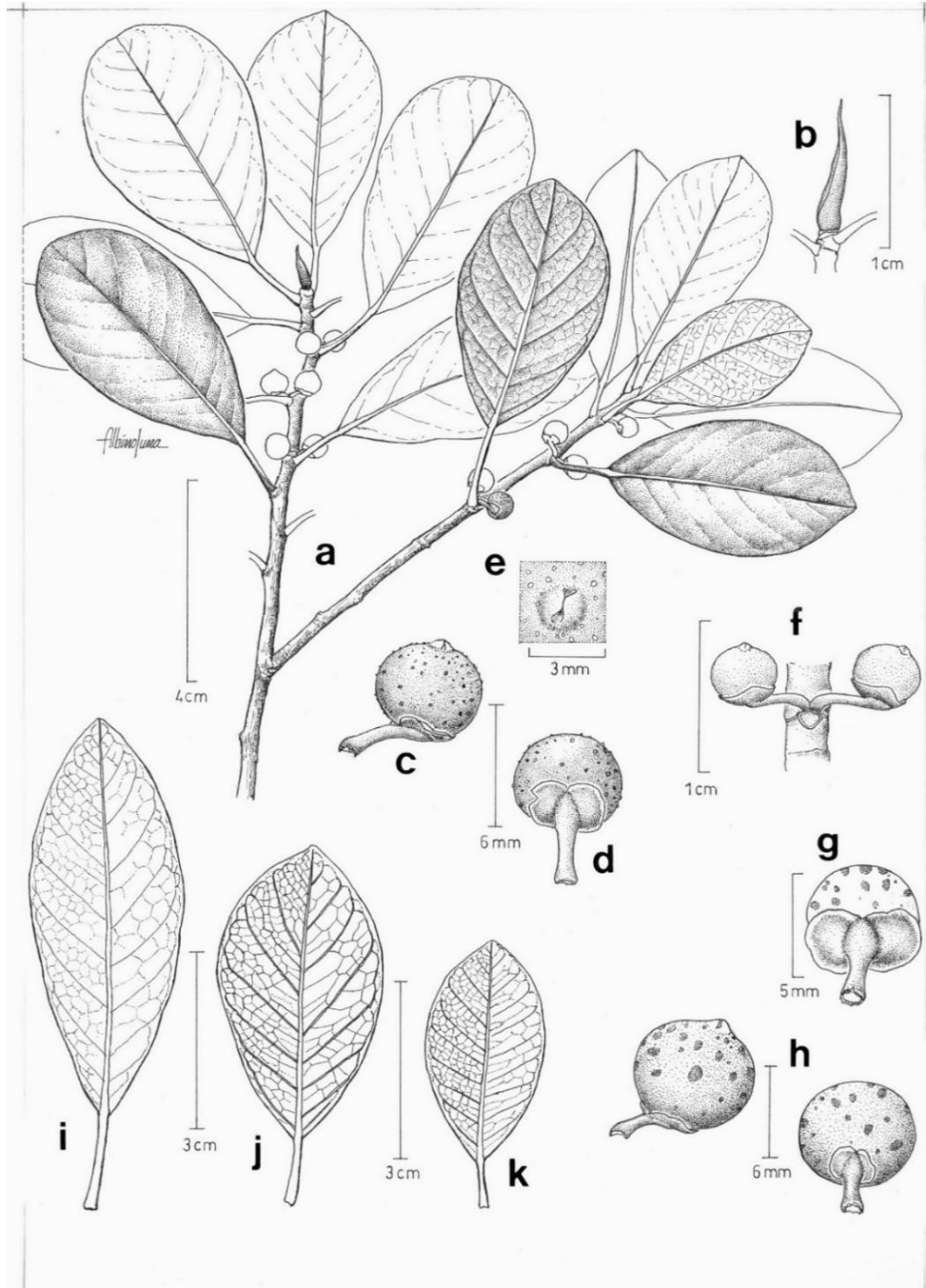


Figura 11. Ilustración asociada a *F. rzedowskiana* en Ibarra-Manríquez et al. (2012).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existe un gran vacío en estudios sistemáticos para especies de *Ficus* neotropicales. Una posible explicación de este vacío podría ser que las especies de la sección *Americanae* son difíciles de distinguir, a causa de la alta variación morfológica que presentan. Esta situación es opuesta a la que se observa en la sección *Pharmacosyceae*, en la cual las especies muestran gran similitud en sus caracteres diagnósticos (Berg, 1989); ambas situaciones complican el trabajo de su reconocimiento. Por otra parte, debido a que generalmente los estudios florísticos y tratamientos taxonómicos son regionales o por país, se toma en cuenta únicamente la variación local y no a través de la distribución de las especies, lo que ha generado conflictos, y a veces incrementando artificialmente el número de especies. Adicionalmente, la obtención de datos moleculares tradicionales no ha brindado suficiente resolución para inferir relaciones filogenéticas al interior del complejo *F. aurea*. Por otro lado, las especies de avispa tampoco han sido objeto de estudio de la sistemática moderna. La falta de estudios sistemáticos y de delimitación de especies en ambos grupos ocasiona que no sea posible proponer y probar hipótesis sobre los patrones que han moldeado la evolución y diversificación de estos linajes.

OBJETIVO GENERAL

Resolver los problemas taxonómicos y sistemáticos asociados al complejo *Ficus aurea* e inferir relaciones coevolutivas con sus polinizadores del género *Pegoscapus*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Evaluar la variación morfométrica de siconos y hojas del complejo *Ficus aurea* para encontrar caracteres que apoyen la delimitación de especies.

- 2) Elaborar una propuesta taxonómica basada en los resultados de análisis morfométricos.
- 3) Analizar las relaciones filogenéticas del complejo *Ficus aurea* con base en un muestreo de poblaciones a lo largo de su distribución.
- 4) Analizar las relaciones filogenéticas de las avispas polinizadoras de los higos del género *Pegoscapus* asociados al complejo *F. aurea*.
- 5) Analizar las relaciones coevolutivas del complejo *F. aurea* y sus avispas polinizadoras *Pegoscapus*.

REFERENCIAS

- Allendorf, F. W., Hohenlohe, P. A., & Luikart, G. (2010). Genomics and the future of conservation genetics. *Nature Reviews Genetics*, *11*(10), 697–709.
- APG IV. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, *181*(2), 1–20.
- Ashmed, W. H. (1904). Classification of the Chalcid flies or the superfamily Chalcidoidea, with descriptions of new species in the Carnegie museum, collected in South America by Herbert H. Smith. *Memoirs of the Carnegie Museum*, *1*, 225–551.
- Avise, J C, Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A., & Saunders, N. C. (1987). Intraspecific Phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *18*(1), 489–522.
- Avise, John C. (2008). Phylogeography: Retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, *36*(1), 3–15.

- Baird, N. A., Etter, P. D., Atwood, T. S., Currey, M. C., Shiver, A. L., Lewis, Z. A., Selker, E. U., Cresko, W. A., & Johnson, E. A. (2008). Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS ONE*, *3*(10), e3376.
- Baker, H. G., & Hurd, P. D. (1968). Intrafloral Ecology. *Annual Review of Entomology*, *13*(1), 385–314.
- Baudet, C., Donati, B., Sinimeri, B., Crescenzi, P., Gautier, C., Matias, C., & Sagot, M.-F. (2015). Cophylogeny Reconstruction via an Approximate Bayesian Computation. *Syst. Biol.*, *64*(3), 416–431.
- Baum, D. A., & Shaw, K. L. (1995). Genealogical perspectives on the species problem. En P. C. Hoch & A. G. Stephenson (Eds.), *Experimental and Molecular Approaches to Plant Biosystematics* (pp. 289–303). Missouri Botanical Garden Press.
- Bejerano, G., Pheasant, M., Makunin, I., Stephen, S., Kent, W. J., Mattick, J. S., & Haussler, D. (2004). Ultraconserved elements in the human genome. *Science*, *304*(5675), 1321–1325.
- Berg, C. C. (1989). Classification and distribution of *Ficus*. *Experientia*, *45*(7), 605–611.
- Berg, C. C. (1990). Differentiation of flowers and inflorescences of Urticales in relation to their protection against breeding insects and to pollination. *Sommerfeltia*, *11*, 13–34.
- Berg, C. C. (2007). Proposals for treating four species complexes in *Ficus* subgenus *Urostigma* section *Americanae* (Moraceae). *Blumea - Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants*, *52*(2), 295–312.
- Berg, C. C. (2015). Moraceae. En G. Davidse, M. Sousa Sánchez, S. Knapp, & F. Chiang Cabrera (Eds.), *Flora Mesoamericana* (Vol. 2, Issue 2, pp. 1–91). Missouri Botanical Garden Press.

- Berg, C. C., & Corner, E. J. H. (2005). Moraceae (*Ficus*). *Flora Malesiana, Ser. 1, 17* (2)(2), 1–702.
- Berg, C. C., Corner, E. J. H., & Jarrett, F. (2006). Moraceae genera other than *Ficus*. En P. C. van Welzen (Ed.), *Flora Malesiana, ser. 1* (Vol. 17, Issue 1, pp. 1–52).
- Berg, C. C., & Wiebes, J. T. (1992). *African fig trees and fig wasps*. Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen.
- Borges, R. M. (2015). How to be a fig wasp parasite on the fig-fig wasp mutualism. *Current Opinion in Insect Science, 8*, 34–40.
- Bouček, Z. (1993). The genera of chalcidoid wasps from ficus fruit in the new world. *Journal of Natural History, 27*(1), 173–217.
- Bruun-Lund, S., Clement, W. L., Kjellberg, F., & Rønsted, N. (2017). First plastid phylogenomic study reveals potential cyto-nuclear discordance in the evolutionary history of *Ficus* L. (Moraceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution, 109*, 93–104.
- Bryant, D., Bouckaert, R., Felsenstein, J., Rosenberg, N. A., & Roychoudhury, A. (2012). Inferring species trees directly from biallelic genetic markers: Bypassing gene trees in a full coalescent analysis. *Molecular Biology and Evolution, 29*(8), 1917–1932.
- Carstens, B. C., Pelletier, T. A., Reid, N. M., & Satler, J. D. (2013). How to fail at species delimitation. *Molecular Ecology, 22*(17), 4369–4383.
- Charleston, M. A. (1998). Jungles: A new solution to the host/parasite phylogeny reconciliation problem. *Mathematical Biosciences, 149*(2), 191–223.
- Chifman, J., & Kubatko, L. (2014). Quartet inference from SNP data under the coalescent model. *Bioinformatics, 30*(23), 3317–3324.
- Choi, S. C. (2016). Methods for delimiting species via population genetics and phylogenetics using genotype data. *Genes & Genomics, 38*(10), 905–915.

- Clement, W. L., & Weiblen, G. D. (2009). Morphological evolution in the mulberry family (Moraceae). *Systematic Botany*, *34*(3), 530–552.
- Collinson, M. E. (1989). The fossil history of the Moraceae, Urticaceae (including Cecropiaceae), and Cannabaceae. In P. Crane & S. Blackmore (Eds.), *Evolution, systematics, and fossil history of the Hamamelidae 2* (pp. 319–339). Oxford: Clarendon Press.
- Cook, J. M., & Rasplus, J. Y. (2003). Mutualists with attitude: Coevolving fig wasps and figs. *Trends in Ecology and Evolution*, *18*(5), 241–248.
- Corner, E. J. H. (1965). Check-list of *Ficus* in Asia and Australasia with keys to identification. *The Gardens' Bulletin Singapore*, *21*(1), 163–186.
- Cracraft, J. (1983). Species concepts and speciation analysis. *Current Ornithology*, *1*, 159–187.
- Cronquist. (1978). Once again, what is a species? En L. v. Knutson (Ed.), *Biosystematics in Agriculture* (pp. 3–20).
- Cruaud, A., Cook, J., Da-Rong, Y., Genson, G., Jarbour-Zahab, R., Kjellberg, F., Pereira, R. A. S., Ronsted, N., Santos-Mattos, O., Savolainen, V., Ubaidillah, R., van Noort, S., Yang-Qion, P., & Rasplus, J.-Y. (2012). Fig-fig wasp mutualism: the fall of the strict cospeciation paradigm? En S. Patiny (Ed.), *Evolution of Plant-Pollinator Relationships* (pp. 68–102). Cambridge University Press.
- Cruaud, A., Jabbour-Zahab, R., Genson, G., Cruaud, C., Couloux, A., Kjellberg, F., van Noort, S., & Rasplus, J.-Y. (2010). Laying the foundations for a new classification of Agaonidae (Hymenoptera: Chalcidoidea), a multilocus phylogenetic approach. *Cladistics*, *26*(4), 359–387.
- Cruaud, A., & Rasplus, J.-Y. (2016). Testing cospeciation through large-scale cophylogenetic studies. *Current Opinion in Insect Science*, *18*, 53–59.

- Cruaud, A., Ronsted, N., Chantarasuwan, B., Chou, L. S., Clement, W. L., Couloux, A., Cousins, B., Genson, G., Harrison, R. D., Hanson, P. E., Hossaert-Mckey, M., Jabbour-Zahab, R., Jousselin, E., Kerdelhué, C., Kjellberg, F., Lopez-Vaamonde, C., Peebles, J., Peng, Y. Q., Santinelo Pereira, R. A., ... Savolainen, V. (2012). An extreme case of plant-insect codiversification: figs and fig-pollinating wasps. *Systematic Biology*, *61*(0), 1029–1047.
- Cutter, A. D. (2013). Molecular Phylogenetics and Evolution Integrating phylogenetics , phylogeography and population genetics through genomes and evolutionary theory. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *69*(3), 1172–1185.
- Darwin, C. (1859). *On the origin of species by means of natural selection, or, the preservation of favoured races in the struggle for life*. J. Murray.
- Datwyler, S. L., & Weiblen, G. D. (2004). On the origin of the fig : Phylogenetic *Ndh F* sequences. *American Journal of Botany*, *91*(5), 767–777.
- Dayrat, B. (2005). Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, *85*(3), 407–415.
- de Araújo, L. M., Valentin-Silva, A., Fernandez, G. W., & Vieira, M. F. (2017). From anthesis to diaspore dispersal: reproductive mechanisms of rare herbaceous Moraceae species endemic to Brazil. *Darwiniana*, *5*(1), 83–92.
- de Queiroz, K. (2005). A unified concept of species and its consequences for the future of taxonomy. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, *56*(1), 196–215.
- DeSalle, R., Egan, M. G., & Siddall, M. (2005). The unholy trinity: Taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *360*(1462), 1905–1916.
- DeWolf, G. P. (1960). Moraceae. In R. E. Woodson & R. W. Schery (Eds.), *Flora of Panama* (Vol. 47, pp. 146–165). Annals of the Missouri Botanical Garden.

- Dodsworth, S. (2015). Genome skimming for next-generation biodiversity analysis. *Trends in Plant Science*, *20*(9), 525–527.
- Donoghue, M. J. (1985). A critique of the biological species concept and recommendations for a phylogenetic alternative. *Bryologist*, *88*, 172–181.
- Doyon, J. P., Scornavacca, C., Gorbunov, K. Y., Szölloši, G. J., Ranwez, V., & Berry, V. (2010). An efficient algorithm for gene/species trees parsimonious reconciliation with losses, duplications and transfers. *Lecture Notes in Computer Science (Including Subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)*, *6398 LNBI*, 93–108.
- Eernisse, D. J., & Kluge, A. G. (1993). Taxonomic congruence versus total Evidence, and amniote Phylogeny inferred from fossils, molecules, and morphology. *Molecular Biolo*, *10*(6), 1170–1195.
- Ehrlich, P. R., & Raven, P. H. (1964). Butterflies and plants: a study in coevolution. *Evolution*, *18*(4), 586–608.
- Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. A., Kawamoto, K., Buckler, E. S., & Mitchell, S. E. (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE*, *6*(5), 1–10.
- Faircloth, B. C., McCormack, J. E., Crawford, N. G., Harvey, M. G., Brumfield, R. T., & Glenn, T. C. (2012). Ultraconserved Elements anchor thousands of genetic markers spanning multiple evolutionary timescales. *Systematic Biology*, *61*(5), 717–726.
- Fujita, M. K., Burbrink, F. T., Mcguire, J. A., Leache, A. D., & Moritz, C. (2012). Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution*, *27*(9), 480-488.
- Galil, J., & Eisikowitch, D. (1968). On the Pollination Ecology of *Ficus Sycomorus* in East Africa. *Ecology*, *49*(2), 259–269.

- Galil, J., & Eisikowitch, D. (1969). Further studies on the pollination ecology of *Ficus sycomorus* L. (Hymenoptera, Chalcidoidea, Agaonidae). *Tijdschrift Voor Entomologie*, *112*(1), 1–13.
- Gasparri, G. (1844). *Nova genera quae super nonnullis Fici speciebus struebat*. Ex Typographia Francisci del Vecchio.
- Gentry, A. H. (1988). Changes in plant community diversity and floristic composition on environmental and geographical gradients. En F. E. Putz & H. A. Money (Eds.), *The Biology of Vines* (pp. 1–49). Cambridge University Press.
- Good, D. A., & Wake, D. B. (1992). *Geographic variation and speciation in the Torrent Salamanders of the genus Rhyacotriton (Caudata: Rhyacotritonidae)* (pp. 1–91). Univ Calif Publ Zool.
- Grandi, G. (1919). Contributo alla conoscenza degli Agaonini (Hymenoptera-Chalcididae) dell'America. *Bollettino Del Laboratorio Di Zoologia Generale e Agraria Della R. Scuola Superiore d'agricoltura in Portici*, *13*, 15–59.
- Grandi, G. (1934). Nuovi Agaonidi (Hymenoptera-Chalcidoidea) della fauna neotropica. *Bollettino Del Laboratorio Di Entomologia Del R.Istituto Superiore Agrario Di Bologna*, *7*, 186–197.
- Grandi, G. (1938). Nuovi Agaonidi (Hymenoptera-Chalcidoidea) raccolti nel Brasile dal Prof. F. Silvestri. *Bollettino Del Laboratorio Di Entomologia Del R.Istituto Superiore Agrario Di Bologna*, *10*, 44–69.
- Grandi, G. (1959). The problems of “morphological adaptation” in insects. *Smithsonian Miscellaneous Collections*, *137*, 203–250.
- Hausdorf, B. (2011). Progress toward a general species concept. *Evolution*, *65*(4), 923–931.

- Hembry, D. H., & Althoff, D. M. (2016). Diversification and coevolution in brood pollination mutualisms: Windows into the role of biotic interactions in generating biological diversity. *American Journal of Botany*, *103*(10), 1783–1792.
- Heraty, J. M., Burks, R. A., Cruaud, A., Gibson, G. A. P., Liljeblad, J., Munro, J., Rasplus, J. Y., Delvare, G., Janšta, P., Gumovsky, A., Huber, J., Woolley, J. B., Krogmann, L., Heydon, S., Polaszek, A., Schmidt, S., Darling, D. C., Gates, M. W., Mottern, J., ... Yoder, M. (2013). A phylogenetic analysis of the megadiverse Chalcidoidea (Hymenoptera). *Cladistics*, *29*(5), 466–542.
- Herre, E. A., Machado, C. A., Bermingham, E., Nason, J. D., Windsor, D. M., McCafferty, S. S., van Houten, W., & Bachmann, K. (1996). Molecular phylogenies of figs and their pollinator wasps. *Journal of Biogeography*, *23*(4), 521–530.
- Hodges, E., Xuan, Z., Balija, V., Kramer, M., Molla, M. N., Smith, S. W., Middle, C. M., Rodesch, M. J., Albert, T. J., Hannon, G. J., & McCombie, W. R. (2007). Genome-wide in situ exon capture for selective resequencing. *Nature Genetics*, *39*(12), 1522–1527.
- Ibarra-Manríquez, G., Cornejo-Tenorio, G., González-Castañeda, N., & Piedra-Malagón, E. M. (2012). El género *Ficus* L. (Moraceae) en México. *Botanical Sciences*, *90*(4), 389–452.
- Ibarra-Manríquez, G., & Wendt, T. L. (1992). El género *Ficus*, subgénero *Pharmacosycea* (Moraceae) en Veracruz, México. *Boletín de La Sociedad Botánica de México*, *52*, 3–29.
- Jackson, A. P., Machado, C. A., Robbins, N., & Herre, E. A. (2008). Multi-locus phylogenetic analysis of neotropical figs does not support co-speciation with the pollinators : The importance of systematic scale in fig/wasp cophylogenetic studies. *Symbiosis*, *45*, 1–16.

- Jombart, T., Devillard, S., & Balloux, F. (2010). Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics*, *11*(1), 94.
- Jousselin, E., Rasplus, J., & Kjellberg, F. (2003). Convergence and Coevolution in a Mutualism: Evidence from a Molecular Phylogeny of Ficus. *Evolution*, *57*(6), 1255–1269.
- Jousselin, E., van Noort, S., Berry, V., Rasplus, J. Y., Rønsted, N., Erasmus, J. C., & Greeff, J. M. (2008). One fig to bind them all: Host conservatism in a fig wasp community unraveled by cospeciation analyses among pollinating and nonpollinating fig wasps. *Evolution*, *62*, 1777–1797.
- Judd, W., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., & Donoghue, M. J. (2016). *Plant systematics: a phylogenetic approach* (4^o ed). Sinauer Associates.
- Legendre, P., Desdevises, Y., & Bazin, E. (2002). A statistical test for host-parasite coevolution. *Systematic Biology*, *51*(2), 217–234.
- Lopez-Vaamonde, C., Wikström, N., Kjer, K. M., Weiblen, G. D., Rasplus, J. Y., Machado, C. A., & Cook, J. M. (2009). Molecular dating and biogeography of fig-pollinating wasps. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *52*(3), 715–726.
- Machado, C. A., Jousselin, E., Kjellberg, F., Compton, S. G., & Herre, E. a. (2001). Phylogenetic relationships, historical biogeography and character evolution of fig-pollinating wasps. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, *268*(July 2000), 685–694.
- Machado, C. A., Robbins, N., Gilbert, M. T. P., & Herre, E. A. (2005). Critical review of host specificity and its coevolutionary implications in the fig/fig-wasp mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102* Suppl, 6558–6565.

- Magallon, S., Sandra, G., & Luna, L. S. (2015). A metacalibrated time-tree documents the early rise of flowering plant phylogenetic diversity. *New Phytologist* 207, 437–453.
- Mayr, E. (1942). *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press.
- Mayr, E. (2000). The biological species concept. In Q. D. Wheeler & R. Meier (Eds.), *Species Concepts and Phylogenetic Theory: A Debate* (pp. 17–29). Columbia University Press.
- Mayr, G. (1885). Feigeninsecten. *Verhandlungen Zoologisch-Botanischen Gesellschaft Wien*, 35, 147–250.
- McCormack, J. E., Hird, S. M., Zellmer, A. J., Carstens, B. C., & Brumfield, R. T. (2013). Applications of next-generation sequencing to phylogeography and phylogenetics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66(2), 526–538.
- Miquel, F. A. Guil. (1867). Artocarpeae. *Annales Musei Botanici*, 3, 214–235.
- Mirarab, S., Reaz, R., Bayzid, M. S., Zimmermann, T., Swenson, M. S., & Warnow, T. (2014). ASTRAL: genome-scale coalescent-based species tree estimation. *Bioinformatics*, 30, 541–548.
- Molloy, E. K., & Warnow, T. (2018). To Include or Not to Include: The Impact of Gene Filtering on Species Tree Estimation Methods. *Systematic Biology*, 67(2), 285–303.
- Munro, J. B., Heraty, J. M., Burks, R. A., Hawks, D., Mottern, J., Cruaud, A., Rasplus, J.-Y., & Jansta, P. (2011). A Molecular Phylogeny of the Chalcidoidea (Hymenoptera). *PLoS ONE*, 6(11), e27023.
- O'Meara, B. C. (2010). New heuristic methods for joint species delimitation and species tree inference. *Systematic Biology*, 59(1), 59–73.
- Page, R. D. M. (1990). Component Analysis: a Valiant Failure? *Cladistics*, 6(2), 119–136.

- Page, R. D. M. (1993). Parasites, phylogeny and cospeciation. *International Journal of Parasitology*, 23(4), 499–506.
- Page, R. D. M. (1994). Parallel phylogenies: reconstructing the history of host-parasite assemblages. *Cladistics*, 10, 155–173.
- Page, R. D. M., & Charleston, M. A. (1998). Trees within trees: Phylogeny and historical associations. *Trends in Ecology and Evolution*, 13(9), 356–359.
- Pante, E., Schoelinck, C., & Puillandre, A. N. (2015). From integrative taxonomy to species description: one step beyond. *Syst. Biol*, 64(1), 152–160.
- Piatscheck, F. (2019). Past, present and future: Geographic and temporal variation in a fig–fig wasp mutualism. Iowa State University. Tesis doctoral. 219 p.
- Piedra-Malagón, E. M., Hernández-Ramos, B., Mirón-Monterrosas, A., Cornejo-Tenorio, G., Navarrete-Segueda, A., & Ibarra-Manríquez, G. (2019). Syconium development in *Ficus petiolaris* (sect. *Americanae*, Moraceae) and the relationship with pollinator and parasitic wasps. *Botany*, 97(3), 190–203.
- Poinar, G. O. (1993). Insects in Amber. *Annual Review of Entomology*, 38(1), 145–159.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). *Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data*. <http://www.stats.ox.ac.uk/pritch/home.html>.
- Pyron, R. A., Hsieh, F. W., Lemmon, A. R., Emily, M., & Hendry, C. R. (2016). Integrating phylogenomic and morphological data to assess candidate species-delimitation models in brown and red-bellied snakes (*Storeria*). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 937–949.
- Rafinesque, C. S. (1838). *Sylva Telluriana*. Printed for the author and publisher.
- Ramírez, W. (1970a). Host Specificity of Fig Wasps. *Evolution*, 24(4), 680–691.
- Ramírez, W. (1970b). Taxonomic and biological studies of neotropical fig wasps (Hymenoptera: Agaonidae). *The University of Kansas Science Bulletin*, 49(1), 1–44.

- Ramírez, W. (1974). Coevolution of Ficus and Agaonidae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 61(3), 770–780.
- Ramírez, W. (1977). A New Classification of Ficus. *Annals of the Entomological Society of America*, 64(2), 296–310.
- Ramírez, W. (1978). Evolution of mechanisms to carry pollen in Agaonidae (Hymenoptera Chalcidoidea). *Tijdschrift Voor Entomologie*, 121(August), 279–293. <http://biostor.org/reference/49890>
- Ramírez-Benavides, W. (2016). A living fossil Tetrapus fig wasp (Hymenoptera: Agaoninae) developing in extant Neotropical fig species (Moraceae: Ficus, section Pharmacosycea). In *Rev. Biol. Trop. (Int. J. Trop. Biol. ISSN (Vol. 64, Issue 4)*.
- Rasplus, J.-Y., & Soldati, L. (2006). Familia Agaonidae. *Introducción a Los Hymenoptera de La Región Neotropical, January 2007*, 671–686.
- Rasplus, J.-Y., Kerdelhué, C., le Clainche, I., & Mondor, G. (1998). Molecular phylogeny of fig wasps Agaonidae are not monophyletic. *Comptes Rendus de l'Academie Des Sciences - Serie III*, 321(6), 517–527.
- Rasplus, J.-Y., Rodriguez, L. J., Tollon-Cordet, C., & Cruaud, A. (2018). Revisiting the phylogeny of Ficus (Moraceae): when next generation Sequencing corroborates past generation botanists. *BioRxiv*, 1–13.
- Ridley, M. (1996). *Evolution* (Second). Blackwell Science Inc.
- Rønsted, N., Weiblen, G. D., Clement, W. L., Zerega, N. J. C., & Savolainen, V. (2008). Reconstructing the phylogeny of figs (*Ficus*, Moraceae) to reveal the history of the fig pollination mutualism. *Plant Biology*, 45, 45–55.
- Rønsted, N., Weiblen, G. D., Cook, J. M., Salamin, N., Machado, C. a, & Savolainen, V. (2005). 60 Million Years of Co-Divergence in the Fig-Wasp Symbiosis.

Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society, 272(September), 2593–2599.

- Rønsted, N., Weiblen, G. D., Savolainen, V., & Cook, J. M. (2008). Phylogeny, biogeography, and ecology of *Ficus* section *Malvanthera* (Moraceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48, 12–22.
- Rosenberg, N. A., & Nordborg, M. (2002). Genealogical Trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. *Nature Reviews Genetics*, 3(5), 380–390.
- Satler, J. D., Herre, E. A., Jandér, K. C., Eaton, D. A. R., Machado, C. A., Heath, T. A., & Nason, J. D. (2019). Inferring processes of coevolutionary diversification in a community of Panamanian strangler figs and associated pollinating wasps*. *Evolution*, 73(11), 2295–2311.
- Shanahan, M., So, S., Compton, S. G., & Corlett, R. (2001). Fig-eating by vertebrate frugivores: a global review. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 76, 529–572.
- Sites, J. W., & Marshall, J. C. (2003). Delimiting species: A Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(9), 462–470.
- Solís-Lemus, C., Yang, M., & Ané, C. (2016). Inconsistency of Species Tree Methods under Gene Flow. *Systematic Biology*, 65(5), 843–851.
- Su, Z.-H., Iino, H., Nakamura, K., Serrato, A., & Oyama, K. (2008). Breakdown of the one-to-one rule in Mexican fig-wasp associations inferred by molecular phylogenetic analysis. *Symbiosis*, 45, 73–81.
- Thompson, J. N. (2005). Coevolution: the geographic mosaic of coevolutionary arms races. *Current Biology*, 15(24), R992–R994.
- Thorogood, C., Dalton, N., & Simon Hiscock, A. I. (2018). The reproductive biology of two poorly known relatives of the fig (*Ficus*) and insights into the evolution of the fig syconium. *Nordic Journal of Botany*, 36(4), njb-01832.

- Valdecasas, A. G., Williams, D., & Wheeler, Q. D. (2008). 'Integrative taxonomy' then and now: a response to Dayrat (2005). *Biological Journal of the Linnean Society*, *93*(1), 211–216.
- van der Vecht, J. (1956). Vijgen en vijgenwespen. *Entomologische Berichten*, *16*(6), 99–103.
- van Noort, S. & Compton, S. G. (1996). Convergent evolution of Agaonine and Sycoecine (Agaonidae, Chalcidoidea) head shape in response to the constraints of host fig morphology. *Journal of Biogeography*, *23*(4), 415–424.
- van Noort, S., & Rasplus, J.-Y. (2019). *Figweb: figs and fig wasps of the world*.
<https://www.figweb.org>
- van Valen, L. (1976). Ecological species, multispecies, and oaks. *Taxon*, *25*, 233–239.
- Vázquez-Quintana, P. (2019). Relaciones filogenéticas y patrones de diversificación de las avispas polinizadoras del complejo *Ficus aurea*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Weiblen, G. D. (2000). Phylogenetic relationships of functionally dioecious *Ficus* (Moraceae) based on ribosomal DNA sequences and morphology. *American Journal of Botany*, *87*(9), 1342–1357.
- Wiebes, J. T. (1963). Taxonomy and host preferences of Indo-Australian fig wasp of the genus *Ceratosolen* (Agaonidae). *Tijdschrift Voor Entomologie*, *106*(1), 1–111.
- Wiebes, J. T. (1979). Co-Evolution of figs and their insect pollinators. *Annual Review of Ecology and Systematics*, *10*(1), 1–12.
- Wiebes, J. T. (1983). Records and descriptions of *Pegoscapus* Cameron (Hymenoptera Chalcidoidea, Agaonidae). *Proceedings C*, *86*(2), 243–253.
- Wiebes, J. T. (1989). Agaonidae (Hymenoptera Chalcidoidea) and *Ficus* (Moraceae): fig wasps and their figs, III (*Elisabethiella*). *Proceedings C*, *92*(1), 117–136.

- Wiebes, J. T. (1992). Agaonidae (Hymenoptera Chalcidoidea) and *Ficus* (Moraceae): fig wasps and their figs, VIII (*Eupristina* s.l.). *Proceedings Koninkl Nederland Akademie van Wetenschappen Series C.*, *95*(1), 109–125.
- Wiebes, J. T. (1995a). Agaonidae (Hymenoptera) and *Ficus* (Moraceae): fig wasps and their figs, xv (Meso-American Pegoscapus). *Proc. Kon. Ned. Akad. v. Wetensch.*, *98*(2), 167–183.
- Wiebes, J. T. (1995b). *The New World Agaoninae (pollinators of figs)*. Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen.
- Wu, C. I. (2001). The genic view of the process of speciation. *Journal of Evolutionary Biology*, *14*, 851–865.
- Yang, Z., & Rannala, B. (2014). Unguided Species Delimitation Using DNA Sequence Data from Multiple Loci. *Molecular Biology and Evolution*, *31*(12), 3125–3135.
- Yang, Ziheng, & Rannala, B. (2010). Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(20), 9264–9269.
- Zerega, N., Mound, L., & Weiblen, G. (2004). Pollination in the New Guinea endemic *Antiaropsis decipiens* (Moraceae) is mediated by a new species of thrips, *Thrips antiaropsidis* sp. nov. (Thysanoptera: Thripidae). *International Journal of Plant Sciences*, *165*(6), 1017–1026.
- Zhang, C., Rabiee, M., Sayyari, E., & Mirarab, S. (2018). ASTRAL-III: Polynomial time species tree reconstruction from partially resolved gene trees. *BMC Bioinformatics*, *19*(6), 15–30.

CAPÍTULO II



Porte y fisonomía de los árboles en el complejo *F. aurea*. Superior izquierda: Cayo Largo, Florida, EUA. Inferior izquierda: Selva Lacandona, Chiapas, México. Guillermo Ibarra Manríquez dirigiéndose hacia el árbol. Superior derecha: Parque Nacional Cañón del Sumidero, Chiapas, México: G. I-M. en la base del árbol. Inferior derecha: "Árbol guardián" Comala, Jalisco, México; Ana Mirón Monterrosas junto a los contrafuertes. Fotos: Karen B. Hernández

Research Article

Unraveling the extreme morphological variation in the neotropical *Ficus aurea* complex (subg. *Spherosuke*, sect. *Americanae*, Moraceae)

Karen Beatriz Hernández-Esquivel¹, Eva María Piedra-Malagón¹ , Guadalupe Comejo-Tenorio¹, Luis Mendoza-Cuenca² , Antonio González-Rodríguez¹ , Eduardo Ruiz-Sánchez³ , and Guillermo Ibarra-Manríquez^{1*} 

¹Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Universidad Nacional Autónoma de México, Antigua Carretera a Pátzcuaro 8701, Colonia Ex Hacienda de San José de La Huerta Morelia C.P. 58190, México

²Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Francisco J. Múgica, Colonia Felicitas del Río Morelia C.P. 58030, México

³Departamento de Botánica y Zoología, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad de Guadalajara, Camino Ing. Ramón Padilla Sánchez 2100, Nextipac Zapopan, Jalisco C.P. 45200, México

*Author for correspondence. E-mail: gbarra@iies.unam.mx; Tel.: 52 01 443 3222730; Fax: 52 01 443 3222719.

Received 4 December 2018; Accepted 22 December 2019; Article first published online 2 January 2020

Abstract *Ficus* (Moraceae) is one of the most diverse genera of tree species in the world. The subgenus *Spherosuke*, section *Americanae*, comprises several species complexes because its diagnostic structures are extremely variable. Currently, neither there is a phylogenetic hypothesis that can help solve the delimitation problems within these complexes nor has an integrative taxonomic approach been developed. In the present study, morphometric methods were applied to solve the taxonomic problems in the *Ficus aurea* complex. Morphometric variation of syconia and leaves was analyzed to find differences between four previously recognized forms (fo. *aurea*, fo. *cookii*, fo. *isophlebia*, and fo. *tuerckheimii*). Syconium characters were analyzed using traditional morphometrics, while leaf shape was evaluated with geometric morphometrics, encompassing 20 populations along two-thirds of the distribution range of the complex. Data sets from syconia and leaves were tested for possible associations with geographic and rainfall variables. There are significant differences between the four forms in syconium characters and leaf shape. Geography and rainfall variables show significant covariation related to the morphometric variation of syconia but not to leaf shape. Consequently, we propose that the four forms should be repositioned into the specific rank. Besides, *F. tecolutensis* is also recognized as a separated species from form *aurea* considering Principal Component Analysis, field observations, and herbarium specimens. An identification key, descriptions, as well as taxonomic comments of the species are provided.

Key words: geometric morphometrics, integrative taxonomy, leaf shape, plant populations, syconium.

1 Introduction

Ficus L. (Moraceae) and *Eucalyptus* L'Hér. (Myrtaceae) with more than 700 species (Berg, 1989; Berg & Corner, 2005; Grattapaglia & Kirst, 2008) are among the genera with the largest number of tree species in the world. The characters that have been considered diagnostic to identify *Ficus* species are diverse (Berg & Corner, 2005; Ezedin & Weiblen, 2019). In particular, to differentiate Neotropical *Ficus* species, the following characters are traditionally used: (i) establishment strategy (germination over host trees, rocks, or soil); (ii) shape, size, indumentum of the leaves, as well as angle and number of their lateral veins, (iii) petiole and stipule length, (iv) peduncle length, number of basal bracts, form, size, and color of the receptacle, as well as shape and size of the ostiole (Ibarra-Manríquez et al., 2012). Neotropical *Ficus* species belong to the subg. *Pharmacosycea* (Miq.) Miq. sect.

Pharmacosycea (Miq.) Griseb. (ca. 31 spp.) and subg. *Spherosuke* Raf. sect. *Americanae* (Miq.) Corner (ca. 120 spp.) (Berg, 1989; Berg & Villavicencio, 2004; Pederneiras et al., 2017). Recently, Pederneiras et al. (2015) indicated that subg. *Spherosuke* is a name that has priority over subg. *Urostigma*.

The taxonomy of *Ficus* in the Neotropics has been complicated to address, and at present, a consensus does not exist, particularly for the species belonging to the sect. *Americanae*. In fact, taxonomic complexes have been proposed in this section (Berg & Villavicencio, 2004; Berg, 1989, 2007). One of these complexes is related to *Ficus aurea* Nutt. Its distribution comprises The United States of America (Florida state), Mexico, Central America, The Greater Antilles, and The Bahamas (Ibarra-Manríquez et al., 2012). This species complex was recognized by Berg (2007) as a single species in which at least 16 specific epithets were included (Table 1),

and which four forms were proposed: *fo. aurea*, *fo. cookii*, *fo. isophlebia*, and *fo. tuerckheimii*. Brief descriptions of leaves and syconia for each form were provided, but characters overlap between them, especially in herbarium specimens. Furthermore, Berg was unable to detect any clear relation between these forms and ecological or geographical variables.

Previously, some of the species synonymized into the *F. aurea* complex were recognized as valid in a variable number of regional treatments (Table 1). For example, Burger (1977), Todzia (2001), and González (2007) recognized *F. isophlebia* Standl., *F. jimenezii* Standl., and *F. tuerckheimii* Standl. as different species from Central America. Recently, Ibarra-Manríquez et al. (2012) agreed with the proposal of Berg (2007) on the treatment for *Ficus* of Mexico: *F. aurea* represents a single species. However, in the same study, those authors also suggested that there could be at least one more species within *F. aurea*, for which more taxonomical work needed to be done. Besides, they recognized *F. rzedowskiana* Carvajal & Cuevas-Figueroa as valid, while Berg (2015) included it within the *F. aurea* complex.

In addition to the problems mentioned before, low internal nodes support or paraphyletic individuals characterize the phylogenies of the sect. *Americanae* (Jackson et al., 2008; Cruaud et al., 2012). However, in the phylogeny presented by Cruaud et al. (2012), there are slight indications that *F. aurea* consists of more than one species, since *F. aurea* and *F. tuerckheimii* fall into different branches. Consequently, an alternative to solve the taxonomic controversies of the complexes proposed by Berg (1989, 2007) is to analyze them under an integrative taxonomy approach in which not only qualitative

morphological evidence from diagnostic characters is provided, as it has been done in the past, but where quantitative analyses coupled with biogeographical, ecological, and genetic data are included (Dayrat, 2005). Morphometric analyses can be part of an integrative taxonomy approach as they allow quantifying variation in plant structures (Zelditch et al., 2004). These methods have been used in different studies to solve taxonomical controversies in distinct angiosperm groups (e.g., González-Rodríguez & Oyama, 2005; Castello & Galetto, 2013; Fragoso-Martínez et al., 2015; Piedra-Malagón et al., 2016).

When morphological variation of plant structures such as leaves responds to environmental or geographical changes, it can be a case of phenotypic plasticity (Schlichting, 1986) not necessarily reflecting the presence of different species. For example, it has been observed that leaf size from some species of the sect. *Americanae* responds to changes in water availability, depending on whether they are epiphytic or not (Holbrook & Putz, 1996). Likewise, it has been demonstrated that elevational gradients have an effect on the differentiation of foliar traits in a wide range of plant groups (Velázquez-Rosas & Meave, 2002). In *F. petiolaris* Kunth, a species endemic to Mexico, which also displays a complicated taxonomy, variation in leaves was analyzed through traditional morphometrics and correlated with environmental and geographical variables; it was found that populations respond to changes in latitude, longitude, and annual rainfall (Piedra-Malagón et al., 2011). The species recognized in Costa Rica as *F. isophlebia*, *F. jimenezii*, and *F. tuerckheimii* coexist parapatrically in areas that differ in elevation and rainfall, and they have been considered as one species (DeWolf, 1960; Berg, 2007). However, Burger (1974) pointed out that this differentiation in habitat is not due to phenotypic

Table 1 List of species comprised by the *Ficus aurea* complex (Berg, 2007), citing the locality and country of the holotype

Species	Country of type locality	Floristic studies	
		Recognized	Synonymized
<i>F. aurea</i> Nutt. 1846	United States of America (Florida state)	5, 6, 9, 10, 11, 12	
<i>F. cabusana</i> Standl. & Steyer. 1940	Guatemala (San Marcos department)	2	9, 11, 12
<i>F. calyculata</i> Mill. 1768	Mexico (probably Veracruz state; Type not found)	10*	
<i>F. ciliolosa</i> Link. 1822	Unknown		9, 12
<i>F. cookii</i> Standl. 1917	Mexico (Chiapas state)	1, 2, 10	9, 11, 12
<i>F. dimidiata</i> Griseb. 1859	Jamaica (Manchester parish)		5, 6, 9, 11
<i>F. isophlebia</i> Standl. 1917	Panama (Chiriquí province)	1, 4, 7, 8	3, 9, 11, 12
<i>F. jimenezii</i> Standl. 1917	Costa Rica (San José province)	1, 2, 4, 7, 8	3, 9, 10, 11, 12
<i>F. laterisyce</i> W.C. Burger 1973	Costa Rica (Cartago province)	4, 7,	9, 11, 12
<i>F. lundellii</i> Standl. 1935	Guatemala (Petén department)	2, 10	9, 11, 12
<i>F. mayana</i> Lundell 1975	Guatemala (Petén department)		9, 10, 11, 12
<i>F. rigidula</i> Lundell 1975	Mexico (Chiapas state)	10	9, 11, 12
<i>F. rzedowskiana</i> Carvajal & Cuevas-Figueroa 2003 (2005)	Mexico (Querétaro state)	10, 11	12
<i>F. tecolutensis</i> (Liebm.) Miq. 1867	Mexico (Veracruz state)	1, 10	9, 11, 12
<i>F. tuerckheimii</i> Standl. 1917	Costa Rica (San José province)	1, 2, 3, 4, 7, 8, 10	9, 11, 12
<i>F. warczewiczii</i> (Miq.) Miq. 1867	Guatemala (Unknown)		9, 11, 12

For each species, it is indicated if they are recognized or are considered as synonym. ¹Standley (1917); ²Standley & Steyermark (1946); ³DeWolf (1960); ⁴Burger (1977); ⁵Bisse (1981); ⁶Liogier (1996); ⁷González (2007); ⁸Todzia (2001); ⁹Berg & Villavicencio (2004); ¹⁰Carvajal (2012); ¹¹Ibarra-Manríquez et al. (2012); ¹²Berg (2015); *Doubtful name in the references 1 and 12 because the description is incomplete, and the holotype has never been located.

plasticity of one species because individuals from *F. tuerckheimii* cultivated in the habitat of *F. jimenezii* do not interbreed and do not share pollinating fig-wasps. Until now, there are no studies evaluating if variation in the morphology of syconia can be associated with climatic factors.

With these precedents, the aims of this study were to: (i) analyze the morphometric variation displayed within the *F. aurea* complex; (ii) elucidate if this complex represents a single polymorphic species or if it can be separated into different taxonomical entities; and (iii) contribute to a taxonomical solution comprising the variation along the entire distribution of the complex. The following hypotheses were proposed: (i) if *F. aurea* represents a single polymorphic species, the forms proposed by Berg (2007) will not be differentiated into discrete units by analyzing variation in syconia and leaves with morphometric methods; and (ii) if these forms do not differentiate morphologically, morphometric data of syconia and leaves will be correlated with geographic and/or rainfall variables, which will explain morphological variation as a result of phenotypic plasticity. This is the first time that: i) characters defining the *F. aurea* complex are evaluated under a multivariate context and ii) geometric morphometrics is used to solve taxonomic problems under an integrative taxonomy approach in *Ficus*.

2 Material and Methods

2.1 Taxonomic sampling

Seventeen localities were visited throughout the distribution range of the *Ficus aurea* complex (ACAY, Acayucán; CIEL,

Cielo; COAT, Coatepec; COMA, Comala; CRGR, Grecia; CRSJ, San José; FLOR, Florida; HUEY, Hueytamalco; LACA, Lacandona; MANT, Manantlán; NEBI, Neblinas; OCOZ, Ocozocoautla; ORIZ, Orizaba; REDO, Dominican Republic, Sumidero Canyon; TRIU, The Triunfo Biosphere Reserve; TUX, The Tuxtlas Biosphere Reserve); in the last locality (TUX), populations from three recognizable sympatric morphotypes were sampled (TUXJ, TUXR, and TUXT), which resulted in 20 populations being sampled (Fig. 1; Table 2), covering a representative area of the total geographic range of the complex. Each population was assigned to the most similar form proposed by Berg (2007) (*fo. aurea*, *fo. cookii*, *fo. isophlebia*, and *fo. tuerckheimii*).

Between six and ten individuals per population were sampled (Table 2), depending on abundance and accessibility to the canopy. From each tree, between five and ten leaves were collected from different branches; those which were mature, without signs of damage and that represented the widest variation in size and shape were selected. Leaves were pressed and dried in a plant oven. Likewise, up to ten syconia were collected per tree and preserved in 70% alcohol. Sizes were measured in the C phase (intermediate) of syconia development because this is the phase with a longer duration; as a consequence, it is the most probable to observe in the field (Bronstein & Patel, 1992; Piedra-Malagón et al., 2019). However, phenological variation and asynchrony that populations displayed while this study was conducted did not allow sampling of an equal number of individuals per population (Table 2). Herbarium specimens were collected for each population; one duplicate was deposited at MEXU

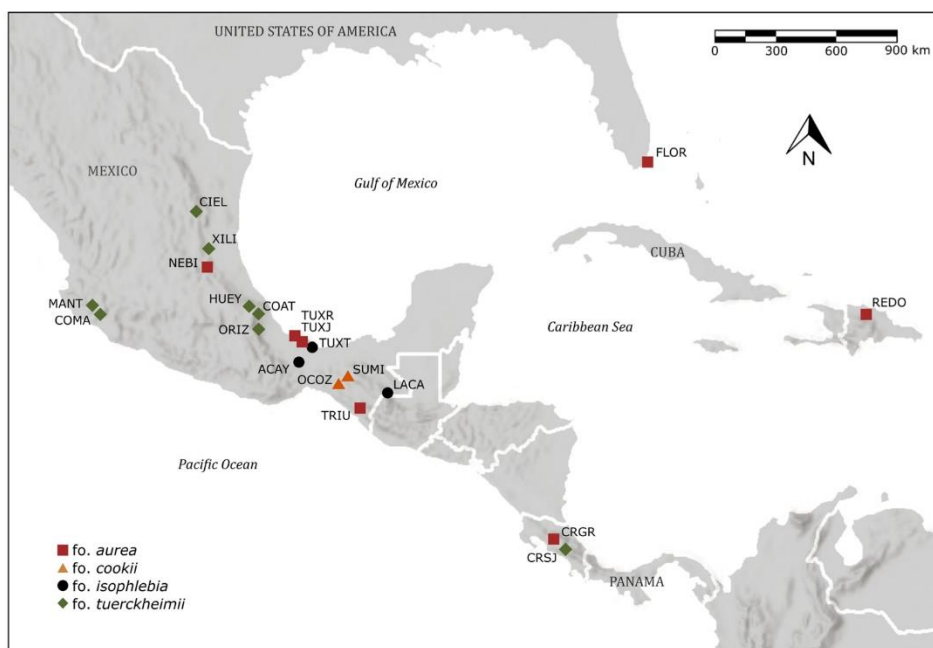


Fig. 1. *Ficus aurea* complex population collection sites. ACAY, Acayucán; CIEL, Cielo; COAT, Coatepec; COMA, Comala; CRGR, Grecia; CRSJ, San José; FLOR, Florida; HUEY, Hueytamalco; LACA, Lacandona; MANT, Manantlán; NEBI, Neblinas; OCOZ, Ocozocoautla; ORIZ, Orizaba; REDO, Dominican Republic, Sumidero Canyon; TRIU, The Triunfo Biosphere Reserve; TUX (J, R, T), The Tuxtlas Biosphere Reserve. Base map taken from ArcGIS Online (<https://www.arcgis.com/home/index.html>).

Table 2 Collection sites and sampling information of 20 populations of the *Ficus aurea* complex

Population	Individuals/Leaves	Individuals/Syconia	Latitude	Longitude	Elevation (m a.s.l.)	Locality	Voucher
<i>fo. aurea</i>							
CRGR	10/103	1/10	10.094994	−84.29404	1104.3	Costa Rica, Alajuela, Grecia,	I-7160
FLOR	7/73	–	25.675647	−80.27352	1.1	USA, Florida, Coral Gables	J-2015-FTG-66
NEBI	10/108	3/30	21.299222	−99.06767	809.4	Mexico, Querétaro, Neblinas	I-7080
REDO	10/111	2/20	19.763603	−70.5179	71	Dominican Republic, Puerto Plata, Sosúa	H-341
TRIU	6/53	–	15.600713	−92.84568	785.8	Mexico, Chiapas, Triunfo BR	I-7047
TUXJ	10/97	–	18.591745	−95.08546	190	Mexico, Veracruz, Tuxtlas BR	H-348
TUXR	6/64	5/46	18.560574	−95.05913	18	Mexico, Veracruz, Tuxtlas BR	H-347
<i>fo. cookii</i>							
OCOZ	10/112	3/24	16.734085	−93.44687	774.1	Mexico, Chiapas, Ocozocoautla	H-349
SUMI	10/100	2/20	16.80737	−93.10271	1015.6	Mexico, Chiapas, Sumidero Canyon	H-346
<i>fo. isophlebia</i>							
ACAY	10/98	1/9	17.68896	−95.07904	49.2	Mexico, Veracruz, Acayucán	H-345
LACA	9/88	1/10	16.25403	−90.84402	188.8	Mexico, Chiapas, Lacandona	I-7005
TUXT	14/140	14/121	18.555363	−95.06099	164.9	Mexico, Veracruz, Tuxtlas BR	H-288
<i>fo. tuerckheimii</i>							
CIEL	10/102	3/30	23.050605	−99.17678	699	Mexico, Tamaulipas, Cielo BR	H-298
COAT	10/94	7/24	19.465715	−95.95287	1186	Mexico, Veracruz, Coatepec	H-295
COMA	9/90	2/14	19.474333	−103.6839	1283.2	Mexico, Colima, Comala	H-325
CRSJ	9/85	1/4	9.856139	−84.17272	1544.3	Costa Rica, San José, San José	I-7162
HUEY	6/60	–	19.973167	−97.29586	713.3	Mexico, Puebla, Hueytamalco	I-6949
MANT	10/10	5/46	19.688091	−104.3952	1676.4	Mexico, Jalisco, Manantlán	H-318
ORIZ	10/115	1/10	18.83473	−97.14183	1451.8	Mexico, Veracruz, Orizaba	H-351
XILI	9/96	8/46	21.395365	−98.99345	578.7	Mexico, San Luis Potosí, Xilitla	H-308
	185/1889	58/464					

Abbreviations: BR, biosphere reserve; H, Karen B. Hernández-Esquivel; I, Guillermo Ibarra-Manríquez; J, Brett Jestrow.

National Herbarium of the Universidad Nacional Autónoma de México (duplicates of these voucher specimens will be deposited in other herbaria). The specimens collected in Florida were deposited at the Fairchild Herbarium (FTG) from the Fairchild Tropical Botanic Garden, Coral Gables.

2.2 Traditional morphometry of syconia

Between four and ten syconia were analyzed for 58 individuals belonging to 16 populations (Table 2). Eleven quantitative characters were measured: bract angle (BA), base length (BL), ostiole-to-base length (OBL), peduncle width (PW), ostiole length (OL), ostiole width (OW), ostiole-length/ostiole-width ratio (OL/OW), syconium length (SL), syconium width (SW), syconium-length/syconium-width ratio (SL/SW), and wall width (WW). From the characters listed, syconium length and/or width are commonly utilized in the identification keys, and ostiole length and width are rarely

presented in descriptions. The selection of the rest of the characters was based on a priori observations of their variability. Base length (BL) is defined here as the length of the structure that holds the receptacle, whether it is pedunculated or not (Fig. 2). Measurements were taken with the software OLYMPUS cellSens® synchronized with a stereoscopic microscope OLYMPUS SZX10® and a camera OLYMPUS SC100®. Only OW was measured with a digital vernier from the apical view of the syconia. Examples of measurements from syconia in different forms are shown in the Fig. 2.

To analyze data, measurements of syconia were averaged by individual. A principal components analysis (PCA) on a correlation matrix was performed to visualize the general variation of the four forms of the complex. Later, canonical variate analysis (CVA) was executed. This analysis orders the means while considering the variance and covariance among

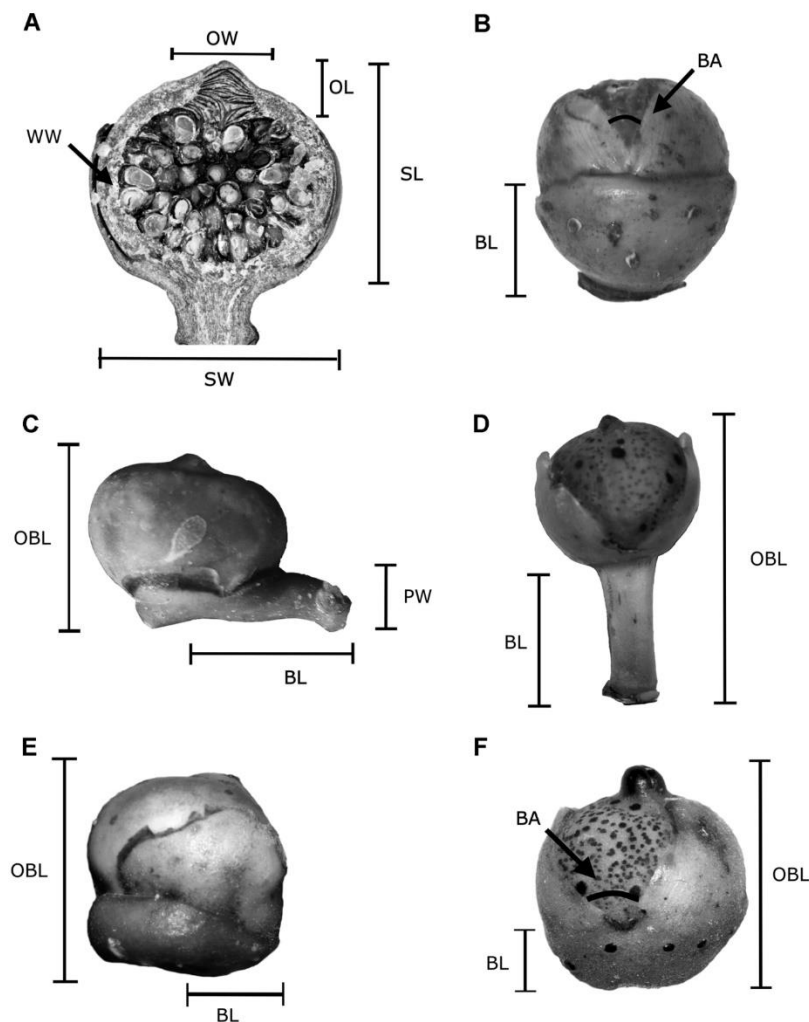


Fig. 2. Characters measured in the syconia of the *Ficus aurea* complex. **A**, Longitudinal section exhibiting internal measurements. **B–F**, Examples of the syconium morphological variation. BA, bract angle; BL, base length; OBL, ostiole to base length; OL, ostiole length; OW, ostiole width; PW, peduncle width; SL, syconium length; SW, syconium width; WW, wall width.

the characters within and between the groups given (Everitt, 1978). To test for statistical significance among forms, a non-parametric multivariate analysis of variance was performed (NP-MANOVA) from Euclidean distances, with 10 000 permutations. All the analyses were performed in PAST 3.19 software (Hammer et al., 2001).

2.3 Geometric morphometrics of leaves

Leaves were digitalized by the adaxial side using a normal scanner, placing a ruler as a reference on each image. Two landmarks (apex and base) and 22 semilandmarks were registered along the leaf contour with the software TpsDig 2.37 (Rohlf, 2016); two additional marks were situated on the reference ruler to set the scale. Semilandmarks have to be points along the curve that are comparable among all the leaves measured (Zelditch et al., 2004). To accomplish this, fan-shaped guidelines with equal angular spacing on images were generated to digitize the 22 semilandmarks using the apex and base of each leaf as reference. The software MakeFan6 within the Integrated Morphometrics Package (IMP, <http://www.canisius.edu/~sheets/morphsoft.html>) was used for this procedure. A Procrustes superimposition analysis was performed with the CoordGen8 software from the IMP series; this analysis calculates the leaf shape variation without the effect of size. Because semilandmarks do not have the same degrees of freedom compared with true landmarks (Zelditch, 2014), an adjustment was run with the SemiLand6 extension from IMP to minimize the bending energy of the curves (Bookstein, 1991). A data matrix with the shape variables (Procrustes coordinates plus centroid size (CS)) was obtained to perform further analyses.

Before proceeding with the morphometric analysis, it was corroborated if there was an effect of size on shape (allometry) within populations (Viscosi & Cardini, 2011). For each population, a multivariate regression was performed with shape as the dependent variable and the natural logarithm of the CS as the independent variable (Viscosi & Cardini, 2011). Results from these regressions showed that in most of the populations, R^2 was less than 0.01, and only in half of them, the slope was significant (Table S1). Due to low allometric values in all the populations, and because multivariate analysis with the residuals regression displayed similar results to the Procrustes coordinates data set, it was decided to present the analyses using the CS, to keep information related to the size. The data matrix was averaged across all leaves measured per individual of each population. A PCA of the variance-covariance matrix was generated to visualize the global variation of the Procrustes coordinates and CS (hereafter leaf shape) in the four forms. A CVA was run to find differences between and within individuals grouped by form. To test for significant differences, a NP-MANOVA using Mahalanobis distances with 1000 permutations was performed. Averaged tendencies of the leaf shape in selected populations were visualized using the thin-plate spline option in PAST 3.19 (Hammer et al., 2001). For taxonomical purposes, the leaf length and width were obtained from the Procrustes coordinates using the TMorphGen6 software from the IMP series.

2.4 Integration of morphometric data

To explore the degree in which syconium characters and leaf shape are integrated in morphological units, which represent the four forms of the *F. aurea* complex, a two-block partial least squares (PLS) analysis with 1000 permutations was performed (Zelditch et al., 2004). In this case, individuals of 16 populations that had matching data for both syconia and leaves, were used. The PLS analysis consists of an integration analysis that treats a set of variables in the two blocks as symmetric; coefficients indicate which variable in one block is more relevant to explain the covariation with the other block (Zelditch et al., 2004).

2.5 Relationships between morphometric and abiotic variables

A two-block PLS analysis with 1000 permutations was performed to detect if syconium characters (first block) were correlated with the geographic variables latitude, longitude, and elevation (second block). Likewise, a second PLS was performed between leaf shape and geographic variables. Two PLS analyses for both data sets, leaf shape, and syconium characters were generated to test if the morphological variation is influenced by environmental variables. Bioclimatic variables from WorldClim Global Climate Data version 1.4 (<http://www.worldclim.org/version1>) were downloaded, with a resolution of 30 s for the 20 populations. Only rainfall variables were selected because it has been demonstrated that these variables affect the morphological variation in *Ficus* spp. (Burger, 1974; Holbrook & Putz, 1996). An initial PCA to detect which rainfall variables contribute to explain the greatest percentage of variance between localities was done; those variables contributing in a minimum quantity were discarded. As a result, variables BIO12 (annual precipitation), BIO16 (precipitation of the wettest quarter), BIO18 (precipitation of the warmest quarter), and BIO19 (precipitation of the coldest quarter) were chosen to perform further analyses. With these variables, a new PCA (Table 3) was performed, and the resulting values were used to construct a PLS with leaf shape and one with syconium characters. One thousand permutations were used in this analysis.

To determine the vegetation types in which the *F. aurea* complex is present, bioclimatic variables BIO1 (mean annual temperature in °C) and BIO12 (annual precipitation) were obtained from the geographic locations of herbarium specimens previously collected in sites that we did not visit and complemented with populations sampled for this study. With these data, the vegetation types were designated based on the classification scheme for Central America from Holdridge (1996). These vegetation types are included as part of the species description.

3 Results

3.1 Traditional morphometry of syconia

The first PCA axis explained 54.4% of the variation in the syconium characters, while the second axis explained 17.7%. The first component separates, with a slight overlap, the forms *aurea* and *isophlebia* from *tuerckheimii* and *cooki*, from negative to positive. Characters SL, SW, WW, and OW showed

Table 3 Loadings of the principal components analysis performed for five rainfall variables in 20 sampling populations for leaves and 16 for syconia

Dataset	Principal component			
	1	2	3	4
Leaves				
Variance	94.9%	3.11%	1.54%	0.42%
BIO12	0.890	-0.196	-0.023	-0.408
BIO16	0.378	0.386	-0.511	0.667
BIO18	0.205	0.610	0.756	0.110
BIO19	0.145	-0.662	0.406	0.612
Syconia				
Variance	97.2%	1.68%	0.80%	0.24%
BIO12	0.889	-0.239	0.082	-0.380
BIO16	0.369	0.258	-0.702	0.550
BIO18	0.205	0.867	0.452	0.032
BIO19	0.172	-0.351	0.543	0.742

Note: Numbers in bold indicate the variables that had the highest loadings on each principal component.

Variables: BIO12 (annual precipitation), BIO16 (precipitation of wettest quarter), BIO18 (precipitation of warmest quarter), and BIO19 (precipitation of coldest quarter).

the strongest load (Table S2). They separate positively populations belonging to the *fo. tuerckheimii* from the rest of the forms, meaning that syconia with the largest sizes and the greatest variation are present in most of the populations of this form (Figs. 3A, 4). Following, from largest to smallest syconia, are *fo. cookii*, *fo. isophlebia* and *fo. aurea*. Concerning the PC2, characters OL, OL/OW, and PW separate *fo. cookii* and *fo. isophlebia* from *fo. aurea* and *fo. tuerckheimii*. Thus, the first two forms display larger ostioles and wider peduncles than the last two forms (Fig. 4).

The CVA results are consistent with the PCA, since the first and second axis explained 59.4% and 26.4% of the variation in the syconium characters, respectively. As in PCA, SL, and SW are the variables defining the first canonical variate (Fig. 3B), while OBL and PW are orthogonal variables. In the CVA plot (Fig. 3B), *fo. aurea*, *fo. isophlebia* and *fo. tuerckheimii* are separated, while *fo. cookii* is slightly overlapped with the last two forms. However, the classification matrix from the CVA (Table 4) showed that 98% of the individuals can be classified into the correct form, while in the permutation test, 86% of them could be classified correctly (Table 4). In addition, the NP-MANOVA indicated that the four forms are significantly different based on syconia characters ($F = 34.8$, $P < 0.001$, Table 4).

3.2 Geometric morphometrics of leaves

The PCA performed from Procrustes coordinates of the average leaf shape of the individuals showed that the percentage of foliar variation explained by the first component is greater than 99%, while the second principal component explained less than 0.001%. In Fig. 5A, leaf shape from *fo. isophlebia* individuals presents a wide variation on the PC1 and overlaps with individuals classified into the *fo. aurea* and *fo. tuerckheimii*, while leaf shape from the *fo. cookii* is completely separated from all the forms. The *fo. aurea* appears divided into three subgroups of populations. The first is comprised by CRGR,

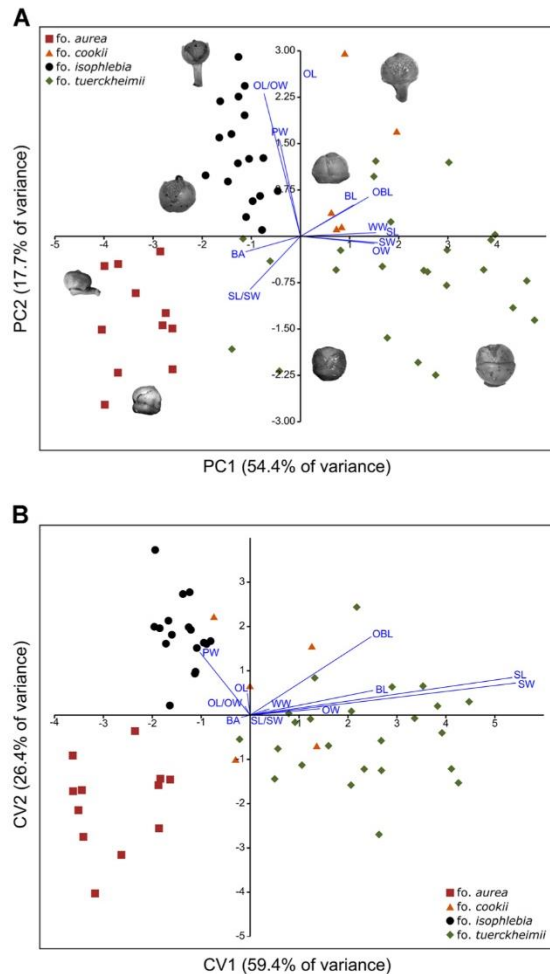


Fig. 3. Multivariate analysis of 11 morphological traits from the *Ficus aurea* complex syconia in 54 individuals and 16 populations. **A**, First two axis of the principal components analysis (PCA). **B**, First two axis of the canonical variate analysis (CVA). Each point represents an individual. BA, bract angle; BL, base length; OBL, ostiole to base length; OL, ostiole length; OW, ostiole width; OW/OL, ostiole width/ostiole length ratio; PW, peduncle width; SL, syconium length; SW, syconium width; SL/SW, syconium width/syconium length ratio; WW, wall width.

FLOR, TRIU, and TUXJ populations (those which are overlapped with *fo. isophlebia* individuals, Fig. 5A); the second includes NEBI and TUXR populations (superior left quadrant, Fig. 5A); and the third are individuals from the REDO population (superior right quadrant, Fig. 5A).

In the CVA analysis, the first two axes explained 73.6% and 19.3% of the variation in leaf shape, respectively. In the CVA plot (Fig. 5B), it can be observed that populations assigned to the four forms are separated without overlap. The classification matrix of CVA (Table 5) indicated that all individuals can be correctly classified. With the permutation



Fig. 4. Variation of leaf shape and syconium morphology in the four forms associated to the *Ficus aurea* complex. **A–I**, fo. *aurea* (including *F. aurea* and *F. tecolutensis*); **A–C**, leaf and syconia from FLOR population; **D, E**, leaf and syconia from CRGR; **F**, pedunculated syconia from REDO; **G–I**, leaf and syconia from TUXR (*F. tecolutensis*). **J–M**, fo. *cookii* leaf, sessile and pedunculated syconia from OCOZ. **N–S**, fo. *isophlebia*; **N–P**, leaf and different size peduncle syconia from TUXT; **Q–S**, leaf and sessile syconia showing a disc from LACA. **T–AB**, fo. *tuerckheimii*; **T–V**, leaf and syconia from CRSJ; **W–Y**, leaf and syconia of different populations in Mexico; **Z–AB**, leaf and syconia from COMA population. Arrows point out peduncles.

test, 99.46% of the individuals were accurately classified. The NP-MANOVA demonstrated significant differences between forms ($F = 3.79$; $P < 0.001$). The pairwise matrix of the NP-MANOVA (Table 5) also confirmed that all forms have an average leaf shape significantly different from each other.

The average variation of leaf shape is shown in thin-plate splines (Fig. 5B). The fo. *cookii* and *tuerckheimii* are more rounded, while fo. *aurea* and *isophlebia* are elliptic. The deepest variation among the four forms is on the base shape. However, because the correction by semilandmarks softens

the bending of curves, the degree in which average shapes are distinct from each form is not so evident.

3.3 Integration of morphometric data

The first axis of the PLS analysis explained 94.3% of covariation between the two blocks and is significant ($P = 0.01$). In the ordination plot (Fig. 6), the syconium characters are highly variable in the fo. *tuerckheimii*, compared with its averaged leaf shape, while fo. *isophlebia* displays the tightest integration of the characters. The fo. *aurea* occupies an exclusive space in the area (Fig. 6). The two populations that conform fo. *cookii* keep

Table 4 Classification matrix of the canonical variate analysis (CVA) and non-parametric multivariate analysis of variance (NP-MANOVA) significance tests of individual averages of syconia characters in the *Ficus aurea* complex

	<i>fo. aurea</i>	<i>fo. cookii</i>	<i>fo. isophlebia</i>	<i>fo. tuerckheimii</i>	Total
CVA					
<i>fo. aurea</i>	11	0	0	0	11
<i>fo. cookii</i>	0	4	0	1	5
<i>fo. isophlebia</i>	0	0	14	0	14
<i>fo. tuerckheimii</i>	0	0	0	20	20
Total	11	4	14	21	50
Jackknifed					
<i>fo. aurea</i>	10	0	1	0	11
<i>fo. cookii</i>	0	3	0	2	5
<i>fo. isophlebia</i>	0	0	14	0	14
<i>fo. tuerckheimii</i>	0	1	3	16	20
Total	10	4	18	18	50
NP-MANOVA					
<i>fo. aurea</i>	–	0.0002	<0.0001	<0.0001	
<i>fo. cookii</i>	0.0002	–	0.0002	0.0039	
<i>fo. isophlebia</i>	<0.0001	0.0002	–	<0.0001	
<i>fo. tuerckheimii</i>	<0.0001	0.0039	<0.0001	–	

Groups are *fo. aurea*, *fo. cookii*, *fo. isophlebia* and *fo. tuerckheimii*. Rows indicate groups given and columns groups classified. The 98% and 86% of the individuals were correctly classified within the CVA and the jackknifed CVA, respectively.

similar patterns in variation of averaged leaf shape and some dispersion in syconium characters.

3.4 Relationships between morphometric and abiotic variables

The first PLS axis of the covariation between syconium characters and geographic variables explained 93.8% of the covariation and was significant ($P = 0.01$). Elevation was the variable that contributed more to the covariation (Table 6). Fig. 7A shows that small syconia are more frequent at lower elevations (*fo. aurea* and *fo. isophlebia*), although *fo. aurea* is not exclusive to lowlands. Larger

syconia can be found at higher elevations as in the *tuerckheimii* form. In the case of the analysis between geographic variables and averaged leaf shape, the result is not significant (Fig. 7B).

The first axis of the two-block PLS analysis performed between syconium characters (first block) and principal components of the rainfall variables (second block) explained 82.5% of the covariation and was significant ($P = 0.04$). The pattern that can be observed in the plot (Fig. 7C) is that syconia with small size, specifically those from *fo. aurea* and *fo. isophlebia*, are more clustered,

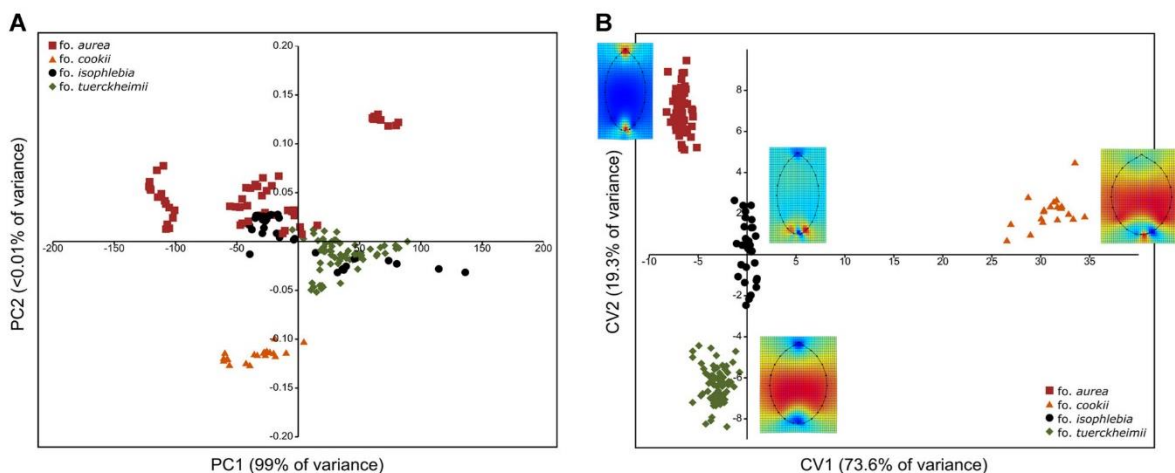
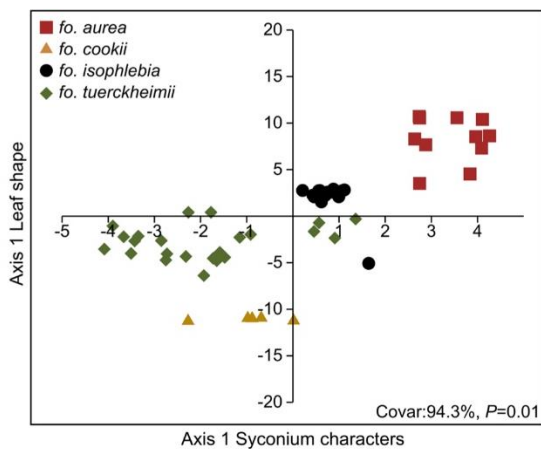


Fig. 5. Multivariate analysis of the leaf shape in 185 individuals from 20 populations of the four distinct morphotypes of the *Ficus aurea* complex. **A**, First two principal components of the leaf shape variation. **B**, Plot of the first two axis of the canonical variate analysis (CVA) and thin-plate splines of averaged leaf shape in representative populations. Expanded forms are indicated by warm colors, while contracted forms are indicated by cold colors.

Table 5 Classification matrix of the canonical variate analysis (CVA) and non-parametric multivariate analysis of variance (NP-MANOVA) significances of the averaged leaf shape in individuals of the *Ficus aurea* complex

	<i>fo. aurea</i>	<i>fo. cookii</i>	<i>fo. isophlebia</i>	<i>fo. tuerckheimii</i>	Total
CVA					
<i>fo. aurea</i>	59	0	0	0	59
<i>fo. cookii</i>	0	20	0	0	20
<i>fo. isophlebia</i>	0	0	33	0	33
<i>fo. tuerckheimii</i>	0	0	0	73	73
Total	59	20	33	73	185
Jackknifed					
<i>fo. aurea</i>	59	0	0	0	59
<i>fo. cookii</i>	0	20	0	0	20
<i>fo. isophlebia</i>	0	0	32	1	33
<i>fo. tuerckheimii</i>	0	0	0	73	73
Total	59	20	32	74	185
NP-MANOVA					
<i>fo. aurea</i>	–	<0.0001	<0.0001	<0.0001	
<i>fo. cookii</i>	<0.0001	–	0.0190	<0.0001	
<i>fo. isophlebia</i>	<0.0001	0.0190	–	<0.0001	
<i>fo. tuerckheimii</i>	<0.0001	<0.0001	<0.0001	–	

Groups were given as *fo. aurea*, *fo. cookii*, *fo. isophlebia*, and *fo. tuerckheimii*. Rows indicate groups given and columns groups classified. The 100% and 99.46% of the individuals were classified correctly in the CVA and jackknifed CVA, respectively.

**Fig. 6.** First axis of the two-block PLS analysis of leaf shape and syconium character sizes in individuals of 16 populations of the *Ficus aurea* complex. PLS, partial least squares.

indicating that they occur often in sites with similar rainfall regimes. In contrast, most individuals of the *fo. tuerckheimii* are clustered apart from *aurea* and *isophlebia* forms. Finally, the first PLS axis of the analysis for leaf shape (first block) and principal components of rainfall variables (second block) was not significant (Fig. 7D).

4 Discussion

4.1 Syconium characters and leaf shape morphometry

Both PCA and CVA analyses of the morphometric data of syconia and leaves demonstrate that it is possible to split the

Table 6 Loadings from the first axis of the first block (abiotic variables) of the two-block partial least squares (PLS) performed to explore the covariance with morphometric variables of leaves and syconia

Variables	Axis 1 PLS	
	Syconium size	Leaf shape
Geography		
Elevation	−0.8696	−0.4130
Latitude	−0.3202	−0.5378
Long	0.3808	0.7350
Rainfall		
Principal component 1	0.6709	−0.7497
Principal component 2	0.2875	0.6390
Principal component 3	−0.3394	−0.1593
Principal component 4	0.5933	0.0656

Ficus aurea complex into specific taxa, previously called forms by Berg (2007). Adding characters for the analysis of syconia that were observed in the field for this study and that have not been previously used in this group, as base and peduncle length, bract angles or wall width, greatly increased the resolution to separate the taxa. In this study, PCA and CVA analyses for syconium characters showed similar grouping patterns but the axes are explained by different variables (Fig. 3).

In the multivariate analyses for leaf shape, the PCA and CVA gave different results. In the PCA (Fig. 5A), leaf shape overlaps among species, and intraspecific variance is wide in most of the cases. However, in the CVA (Fig. 5B) average leaf shape is clearly differentiated among all taxa, even though a wide range of leaf shapes can be found within individuals. The results of the PLS to test for the

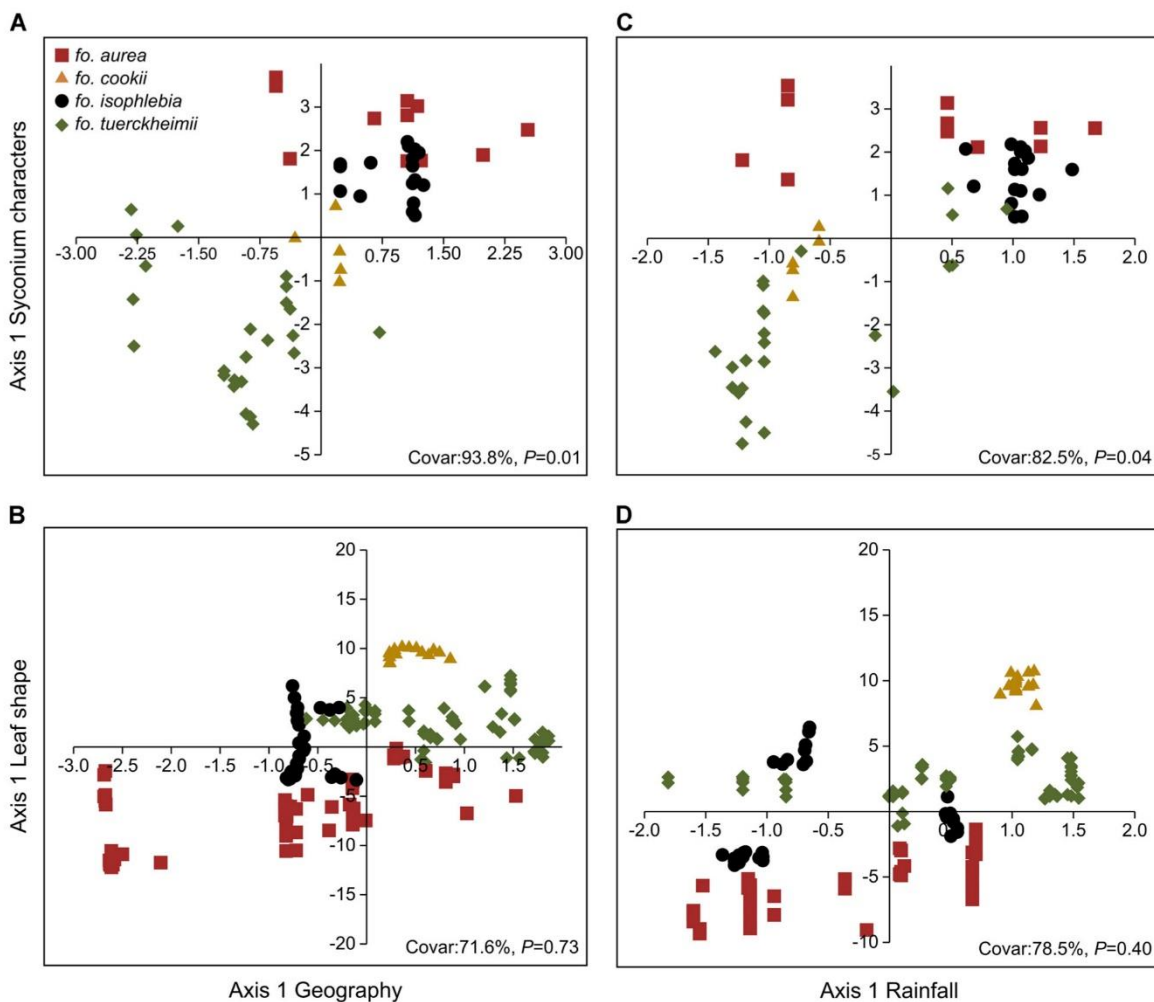


Fig. 7. First axis of the two-block PLS to analyze the covariance of morphometric and abiotic variables. **A**, PLS of geography and measurements of syconium. **B**, PLS of geography and leaf shape. **C**, PLS of four principal components of rainfall variables and syconium characters size. **D**, PLS of four principal components of rainfall and leaf shape. PLS, partial least squares

integration of morphological variables support that a set of syconium traits significantly covary with leaf morphology, providing further support to elevate the forms into the specific rank.

In this study, an attempt to fit the morphological variation of the *F. aurea* complex populations into the four forms proposed by Berg (2007) resulted in the differentiation of four groups. Nevertheless, during the explorations, it was noticed that morphological variation within the proposed *fo. aurea* was contrasting. In fact, we collected two populations in sympatry defined as *fo. aurea* because of their differences (TUXJ and TUXR, Fig. 1). Overall, syconia of the *fo. aurea* group together, but the PCA for leaf shape (Fig. 5A) revealed that TUXR was closer to the allopatric population NEBI than to TUXJ (Fig. 1). Considering that allometry is not influencing data (Table S1) and the centroid size in the analysis is giving information, TUXR and NEBI populations are different in leaf size and shape from the

rest of *F. aurea*. In addition, herbarium specimens, bract angles, bract sizes, and qualitative and quantitative traits differ (see taxonomical treatment section). Thus, NEBI and TUXR can be associated with the type specimen of the previously described *F. tecolutensis* (Standley, 1917), as well as with the species that Carvajal (2007) and Ibarra-Manríquez et al. (2012) described as *F. rzedowskiana*. Consequently, *F. tecolutensis* is recognized here as a valid species separated from *F. aurea*.

4.2 Relationships between abiotic variables and morphometry

Geographic and rainfall variables are significantly related to the morphometric variation of syconia but not to leaf shape variation (Table 3; Fig. 7). The pattern shown in the graphs (Figs. 7A, 7C) indicate a similar rainfall regime in the localities where *F. aurea* and *F. isophlebia* occur, while populations from *F. cookii* and *F. tuerckheimii* occur in distinct conditions.

Ficus cookii is found in a restricted habitat belonging to the Central Depression of Chiapas (Mexico), which is a center of plant diversity and endemism (Sosa et al., 2018). Regarding *F. tuerckheimii*, this species reaches the highest elevations and values of mean annual precipitation that can be found in the *F. aurea* complex. The morphology of its syconia can overlap with that of *F. cookii* and *F. isophlebia* individuals (Fig. 3) but given their geographical distribution and our observations in the field, a contact zone between these three species is unlikely. These results are similar with the findings of Ezedin & Weiblen (2019) in Papua New Guinea, where they found that the lowland and highland forms of *Ficus dammaropsis* (Warb.) Diels are different species, based on morphology, habitat, and pollinators data.

Leaf shape did not show significant association with geographic and rainfall variables. The present study was focused on analyzing broad patterns of morphological variation, but it seems that phenotypic plasticity is best detected at the micro scale level. For example, it has been demonstrated that leaf area changes according to water availability in individuals of the same *Ficus* species (Holbrook & Putz, 1996). Other studies have shown that leaf traits respond to different light conditions in tropical trees (e.g., Rozendaal et al., 2006). It is probable that individual phenotypic plasticity has contributed to the misunderstanding of differences in the species belonging to the *F. aurea* complex; given that herbarium specimens show only a part of the variation and in the absence of well-preserved reproductive structures, identifications are prone to error.

The processes of speciation and ecological divergence are highly linked (Rissler & Apodaca, 2007). The use of morphology or genetics in combination with ecological differentiation has strengthened the delimitation of species from different taxonomical groups (Raxworthy et al., 2007; Rissler & Apodaca, 2007; Gurgel-Gonçalves et al., 2011; Beheregaray et al. 2017). In the present work, significant differences in morphometric variation of syconia and leaves, together with the association of the first structure with geographic and rainfall variables, point towards a possible ecological divergence of two of the species delimited here (*F. cookii* and *F. tuerckheimii*).

The new taxonomic treatment of the species is presented in the next section. It includes metrics generated from the morphometric analyses, which were corroborated using herbarium specimens. Additional characters that were not accounted by morphometry as leaf petiole or leaf bud size were added. The specimens revised are cited in Appendix I.

4.3 Taxonomic treatment

Species in the *Ficus aurea* complex are characterized by possessing two basal bracts covering one to two thirds of the syconium at the intermediate phases of maturity (phases B–C). The species in this complex also display a structure called base that holds the receptacle and attaches it to the branch. The base can be compressed, patelliform or cup-shaped, and sometimes it enlarges so that it forms a peduncle. This structure is highly variable and, consequently, sessile, and pedunculate syconia are found sometimes in the same branch. The measurements

of syconia of these descriptions include fresh and dry conditions.

Key to the species of the *Ficus aurea* complex

- 1a. Lithophytic trees; leaf lamina almost as long as wide; endemic species to the ecoregion of the Chiapas Central Depression..... ***F. cookii***
- 1b. Strangler trees; leaf lamina 1.5–2.6 times longer than wide; species no restricted to the ecoregion of the Chiapas Central Depression..... 2
- 2a. Sessile syconia (cupuliform basal area); ostiole umbilicated; leaf petiole 2.8–9.5 cm long..... ***F. tuerckheimii***
- 2b. Sessile (patelliform or lingulate-like basal area) and/or pedunculate syconia; ostiole conical or prominent; leaf petiole up to 7 cm long..... 3
- 3a. Syconia attached centrally or slightly eccentrically to the branch, 1.1–1.2 times wider than long; basal bracts apex lobed; ostiole with 3 overlapping external bracts, slit Y-shaped; secondary veins always perceptible ***F. isophlebia***
- 3b. Syconia attached eccentrically to the branch, 1.3–1.4 times wider than long; basal bracts apex rounded; ostiole with 2 external bracts opened by a lineal slit; secondary veins from perceptible to almost imperceptible 4
- 4a. Leaf lamina 1.5–1.9 times longer than wide; leaf petiole 0.7–3.7 cm long; syconium basal bracts 5–12 mm width, opening angle 65°–130°; syconium wall 0.3–1 mm width ***F. aurea***
- 4b. Leaf lamina 2.0–2.3 times longer than wide; leaf petiole 0.5–1.5 cm long; syconium basal bracts 2.7–3.7 mm width, opening angle 110°–160°; syconium wall 0.2–0.4 mm width ***F. tecolutensis***

Species descriptions

Ficus aurea Nutt. N. Amer. Sylv. 2(4): pl. 43. 1846, *nom. cons.* Type: United States of America, Florida, Blodgett s.n. (holotype BM!). *F. aurea* var. *latifolia* Nutt. N. Amer. Sylv. 2(4): 1849. Type: United States of America, Florida. Key West. Blodgett s. n. (holotype BM, not located; isotype NY!). *F. jimenezii* Standl. Contr. U. S. Natl. Herb. 20: 14. 1917. Type: Costa Rica, San José, A. Tonduz & O. Jiménez 17536 (holotype US!). *F. laterisyce* W.C. Burger, Phytologia 26(6): 426. 1973. Type: Costa Rica, Cartago, R. W. Lent 2972 (holotype F!; isotypes CR, MEXU!, US!).

Hemiepiphytic or strangler trees, 7–25 (–35) m tall. Latex white, sometimes turning brown or pink. Terminal leaf bud 5–15 (–20) mm long, 2–4 mm wide, glabrous. Terminal stipules (15–) 46–55 mm long, 4–7 mm wide, deciduous. Leaves alternate; lamina (2.5–) 4–25 cm long, 2.7–13 cm wide, 1.5–1.9 times longer than wide, elliptic, narrowly elliptic, obovate or broadly obovate, chartaceous to coriaceous, base cuneate, obtuse, but in continental specimens is cuneate-attenuate, apex acute, obtuse, sometimes apiculate or mucronate, adaxial and abaxial surface glabrous, the former glaucous; secondary veins perceptible to almost imperceptible in both surfaces; petiole 0.7–3.7 cm long, slightly plane, glabrous. Syconia

sessile or pedunculate, eccentrically attached to the branch; receptacles 3.8–6.6 mm long, 5–9.5 mm in diameter, obloid, 1.3–1.4 times wider than long, green with light green or dark brown macules (phases B–C), matte red at maturity (phase E) in fresh, lingulate-like basal area 1.5–3 mm long, 0.3–0.8 mm wide; peduncle when present 2.7–4.4 mm long, 1.1–2.7 mm wide, glabrous; basal bracts 3–6 mm long, 5–12 mm wide, with an opening angle of 65–130° between them, covering one to two thirds of the receptacle, apex rounded, green, puberulent; ostiole 0.3–1 mm long, 1.2–2.8 mm wide, slightly prominent, 2 overlapping external bracts opened by a lineal slit, sometimes surrounded by an annular thickening; syconium wall 0.3–1 mm thick.

Distribution and ecology: This species is distributed in Florida and The Greater Antilles commonly in tropical lowland dry forests, or rarely subtropical premontane moist forests from 0 to 120 m a.s.l. Besides, from Mexico to Panama, it is found in tropical lowland wet forests, tropical lowland moist forests, subtropical premontane wet forests, subtropical premontane moist forests, subtropical premontane dry forests, warm temperate lower montane moist forests, and warm temperate lower montane wet forests, at 0–1500 (–2200) m a.s.l. Locally, the individuals are scarce. It remains in secondary forests, scattered on wide areas, or as isolated individuals in pastures for cattle and rarely planted as hedge.

Ficus cookii Standl. Contr. U. S. Natl. Herb. 20(1): 15. 1917. Type: Mexico. Chiapas, O. F. Cook 73 (holotype US!). *F. rigidula* Lundell, *Wrightia* 5(6): 159. 1975. Type: Mexico, Chiapas, D. E. Breedlove 9568 (holotype LL!).

Lithophytic trees, 6–22 m tall. Latex white. Terminal leaf bud 20–30 mm long, 6–15 mm wide, pubescent to glabrescent. Terminal stipules 25–30 mm long, 6–15 mm wide, deciduous. Leaves alternate; lamina 3.2–16.3 cm long, 3.5–14.5 cm wide, almost as long as wide, elliptic, broadly elliptic or orbicular, chartaceous, base obtuse, rounded or cordate, apex obtuse, rounded or obcordate, adaxial, and abaxial surface slightly pubescent or glabrous, secondary veins evident in the abaxial surface; petiole 1–7 (–9) cm long, terete, pubescent. Syconia sessile or pedunculated, centrally attached to the branch; receptacles 3.8–13 mm long, 9–13.5 mm in diameter, spheroid to obloid, 1–2 times wider than long, green with abundant light green macules (phases B–C) or striated red (phase E) in fresh, cupuliform basal area 3.8–7.3 mm long, 0.5–1 mm wide; peduncle when present 3–21 mm long, 3–7 (–8.7) mm wide, pubescent or puberulent; basal bracts 7–9 mm long, 10–14 mm wide, with an opening angle of 45–105° between them, covering two thirds of the receptacle, apex acute or rounded, pubescent or puberulent; ostiole 0.3–1.5 mm long, 2.3–3 mm wide, umbilicated or conical, with four external bracts mostly displaying a slit X-shaped, surrounded by an annular thickening; syconium wall 0.5–1 mm thick.

Distribution and ecology: This species is distributed in tropical premontane dry forests, rarely in warm temperate lower montane moist forests, from the ecoregion of the Central Depression of Chiapas, Mexico, which is extended slightly into Guatemala, between 550 and 1400 (–1850) m a.s.l. *Ficus cookii* is frequent along this area.

Ficus isophlebia Standl. Contr. U. S. Natl. Herb. 20:14. 1917. Type: Panama, Chiriquí, H. Pittier 2821 (holotype US!).

Strangler trees, 5–35 m tall. Latex white. Terminal leaf bud 6–18 mm long, 2–6 mm wide, glabrous. Terminal stipules 28–70 mm long, 5–15 mm wide, deciduous or sometimes persistent. Leaves alternate; lamina 5.4–26.5 cm long, 2.8–13.2 cm wide, 1.9 times longer than wide, obovate, elliptic or broadly elliptic, chartaceous, base obtuse to subcordate or rounded, slightly cuneate, apex acute or obtuse, adaxial and abaxial surface glabrous, secondary veins evident in the abaxial surface; petiole 0.8–7 cm long, terete, glabrous. Syconia sessile or pedunculated, centrally or slightly eccentrically attached to the branch; receptacles 3.3–10.4 mm long, 4–12 mm in diameter, spheroid to obloid, 1.15–1.2 times wider than long, green with red or black macules (phases B–C) or light red with yellow dots (phases D–E) in fresh, patelliform basal area 1–4 mm long, 0.3–1 mm wide; peduncle 2.5–9.7 mm long, 1.3–3.8 mm thick, glabrous; basal bracts 4–10 mm long, 6–12 mm wide, with an opening angle of 45–160° between them, covering two thirds of the receptacle, apex lobed, green or gray, puberulent toward apex; ostiole 0.1–1.7 mm long, 1–3.3 mm wide, protuberant or conical, with 3 external bracts forming a slit Y-shaped; syconium wall 0.3–1 mm thick.

Distribution and ecology: This species is distributed mainly in tropical lowland moist forests, rarely at subtropical premontane moist forests, at 10–900 m a.s.l., from Mexico to Panama; frequently found in Nicaragua and Panama in tropical lowland dry forests and subtropical premontane dry forests. While this species has been widely used as a live hedge in Mexico and can be found abundantly, at present, its presence in Costa Rica is very scarce due to deforestation.

In northernmost forests of Mexico, this species often displays pedunculated and sessile syconia in the branches, and their leaves are predominantly obovate with cuneate base; while from Chiapas to Panama, syconia are always sessile, a condition also noticed by Todzia (2001), sometimes slightly attached on a side (<45°), and leaves are frequently broadly elliptic with subcordate base.

Ficus tecolutensis (Liebm.) Miq. Ann. Mus. Bot. Lugduno-Batavum 3: 299. 1867. *Urostigma tecolutense* Liebm. Kongelige Kongel. Danske Vidensk. Selsk. Skr., Naturvidensk. Math. Afd., ser. 5, 2: 324. 1851. Type: Mexico, Veracruz, F. M. Liebmann 14335 (holotype C!; isotypes B!, GH, not located, K!). *Ficus rzedowskiana* Carvajal & Cuevas-Figueroa, Ibugana. Boletín del Instituto de Botánica, Universidad de Guadalajara 11(2): 37–40, f. 1. 2003 [2005]. Type: México, Querétaro, E. Pérez & E. Carranza 2935 (holotype IBUG!; isotype CAS!, CIIDIR!, IEB!, MEXU!, NY!, QMEX!, TEX!, XAL!).

Strangler trees, 4–40 m tall. Latex pink. Terminal leaf bud 6.5–13 mm long, 2–3.5 mm wide, glabrous. Terminal stipules 28–70 mm long, 5–15 mm wide, deciduous. Leaves alternate; lamina 3.5–11.8 cm long, 1.5–5.7 cm wide, 2.0–2.3 times longer than wide, elliptic, narrowly elliptic or obovate, chartaceous, base attenuate or obtuse, apex rounded to slightly acuminate, sometimes apiculate, adaxial, and abaxial surface glabrous; secondary veins

almost imperceptible in the abaxial surface; petiole 0.5–1.8 cm long, terete, glabrous. Syconia pedunculate, rarely sessile, eccentrically attached to the branch; receptacles 3–6 mm long, 3.7–7.5 mm in diameter, obloid, 1.25–1.4 times wider than long, green with black macules (phases B–C) or light red (phase E) in fresh, lingulate-like basal area 0.7–2.9 mm long, 0.3–0.4 mm wide; peduncle 2–7 mm long, 1.3–2.6 mm thick, glabrous; basal bracts 1.5–2.7 mm long, 2.7–3.7 mm wide, with an opening angle of 110–160° between them, covering less to one third of the receptacle, apex acute or rounded, puberulent or glabrous; ostiole 0.3–1.8 mm long, 0.9–2.3 mm wide, slightly prominent, 2 overlapping external bracts opened by a lineal slit, sometimes surrounded by an annular thickening, puberulent; syconium wall 0.2–0.4 mm thick.

Distribution and ecology: This species is scarce and is found in lowland moist forests close to the sea level, as well as warm temperate lower montane moist forests, up to 1100 m a.s.l. It has been registered occasionally from subtropical premontane dry forests.

Ficus tuerckheimii Standl. Contr. U. S. Natl. Herb. 20(1): 13. 1917. Type: Costa Rica, Provincia Alajuela, H. Pittier 16149 (holotype US!; isotypes B!, NY!).

Strangler trees, 10–45 m tall. Latex white. Terminal leaf bud 10–18 mm long, 3–5 mm wide, glabrous or pubescent. Terminal stipules 10–72 mm long, 4–13 mm wide, deciduous. Leaves alternate; lamina (3.5–) 6.5–25 cm long, (2–) 4.5–15 cm wide, 1.6–1.7 times longer than wide, elliptic to wide elliptic, oblong or ovate, chartaceous, base cuneate, obtuse, cordate or truncate, apex acute, obtuse or rounded, adaxial and abaxial surface glabrous, the tip of the secondary veins not evident in the abaxial surface; petiole 2.8–9.5 cm long, terete, glabrous. Syconia sessile, receptacle 5.5–17 mm long, 6.7–19 mm in diameter, spheroid to obloid, 1.14–1.2 times wider than long, green, with white macules (phases B–C) or red (phases D–E) in fresh, cupulliform basal area sometimes lignified, 1.5–12 mm long, 0.5–2 mm wide; basal bracts 5–15 mm long, 7–20 mm wide, with an opening angle of 35–130° between them, covering from two thirds up to the top of the receptacle, apex rounded, green or brown, puberulent; ostiole up to 17 mm long, 1.7–6 mm wide, umbilicate, with 3 external bracts valvate, sometimes with a triangular aperture between them; syconium wall 0.4–18 mm thick.

Distribution and ecology: This species is distributed mainly in warm temperate lower montane moist forests and warm temperate lower montane wet forests; rarely present in warm temperate lower montane dry forests and subtropical premontane dry forests on its northernmost latitude in Mexico, or in the subtropical premontane moist forests and cool temperate montane rain forests in Central America. Its elevational range oscillates between 350 and 1980 m a.s.l. The species is found at its lowest elevational range at the northernmost latitude, and at its highest elevation at southern latitudes, but it does not increase or decrease gradually in elevation at the middle of this range.

Most of the characteristics observed in this study for *F. tuerckheimii* were described previously (Standley, 1917; Burger, 1977; Todzia, 2001; González, 2007). However, one of the most distinctive traits found in all populations is the

thickened cupulliform base in the syconia (Figs. 4U, 4X), which was never highlighted in previous descriptions, except in the illustration presented in Burger (1977). This structure in this species has only been described as disc-shaped but this can lead to confusion with the structure observed in *F. isophlebia*. The variation in the syconium size of *F. tuerckheimii* is wide between populations. This could be explained because of its large elevational range; this factor can influence morphology, as it has been demonstrated in leaf traits for species growing along elevational gradients in cloud forests (Velázquez-Rosas and Meave, 2002), a vegetation type where *F. tuerckheimii* is commonly found. Further studies need to be done to test this hypothesis.

5 Conclusions

Morphometric data of syconia and leaves demonstrate that it is possible to split the *Ficus aurea* complex into specific taxa, previously called forms by Berg (2007). Here, we expand the descriptions of the four previously recognized species *F. aurea*, *F. cookii*, *F. isophlebia*, and *F. tuerckheimii*. Also, we recognize *F. tecolutensis* as a valid species. Application of geometric and traditional morphometric methods on the *F. aurea* complex was very useful to find significant differences in diagnostic characters between the forms proposed by Berg (2007) and provided support to separate them into five different species. This proposal is also asserted with the critical revision of the type material and specimens from 25 herbaria. In this study, principles of integrative taxonomy were followed: delimitating species as a priority instead of the creation of new names and the use of other evidence beyond morphology. We remark the importance of fieldwork in taxonomically driven studies, because there are characteristics that cannot be observed in herbarium specimens and that could confirm quantitative results.

Finally, variation within each of the species of the *F. aurea* complex is still complicated. The taxonomic delimitation of some type specimens included in this complex is not resolved (e.g., *F. cabusana*, *F. lundellii*, and *F. mayana*) and herbarium specimens identified under those names are rare. To face this problem, population studies of these variants are imperative, especially in localities that were not possible to analyze in the present work, for example, Guatemala or Nicaragua. It is expected in the future that more information like anatomy, phytochemicals and the application of genomic tools could be added to give support to the species delimited here and resolve their phylogenetic relationships.

Acknowledgements

This study is part of the doctoral research of Karen Beatriz Hernández-Esquivel and is a requisite to obtain her degree. The first author also thanks Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología for the support of the graduate studies and the PhD scholarship she received (No. 413983). Eva Piedra-Malagón thanks the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA, UNAM) for the postdoctoral fellowship she received during her collaboration in this study. We thank the people who helped in field work, particularly Isaac Mesén, Maynor Carranza, Pablo Sánchez, and

Teodoro Clase. Also, thanks to Andrew Reeve, Mayra Flores Tolentino, Ricardo Gaytán, and Yuley Encarnación for multiple technical support. We acknowledge the support received from curators and team from herbaria revised: CR, CH, CHAP, CHAPA, CICY, CIIDIR, ECOSUR, F, FCME, FTG, HEM, HUAP, HEM, IBUG, IEB, INIF, JBSD, LL, MEXU, MO, NY, SLP, UAT, US, and XAL. We thank the three anonymous reviewers who provided comments that helped to improve this manuscript. Thanks to Laboratorio de ecología y genética molecular from ENES Morelia, UNAM, for the use of microscope. This research was funded by the Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) of UNAM (number IN208217), as a part of the project “Filogeografía comparada del complejo taxonómico *Ficus aurea* (Moraceae) y sus avispas polinizadoras del género *Pegoscapus* (Agaonidae).”

Conflict of interest

We acknowledge that all the authors have contributed equally to the manuscript and all agree with the content of this manuscript. We have no conflicts of interest to disclose.

References

- Beheregaray LB, Pfeiffer LV, Attard CRM, Sandoval-Castillo J, Domingos FMCB, Faulks LK, Gillian DM, Unmack PJ. 2017. Molecular phylogenetics and evolution genome-wide data delimits multiple climate-determined species ranges in a wide-spread Australian fish, the golden perch (*Macquaria ambigua*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 111: 65–75.
- Berg CC. 1989. Classification and distribution of *Ficus*. *Experientia* 45: 605–611.
- Berg CC. 2007. Proposals for treating four species complexes in *Ficus* subgenus *Urostigma* section *Americanae* (Moraceae). *Blumea—Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants* 52: 295–312.
- Berg CC, Corner EJJ. 2005. Moraceae: Ficeae. *Flora Malesiana* 17: 1–70.
- Berg CC. 2015. Moraceae. In: Sousa SM, Knapp SS, Chiang F, Ulloa UC, Barrie FR eds. *Flora Mesoamericana. Sauraraceae a Zygophyllaceae*. 2: 90–116.
- Berg CC, Villavicencio X. 2004. Taxonomic studies on *Ficus* (Moraceae) in the West Indies, extra-Amazonian Brazil and Bolivia. *Illicifolia* 5: 1–173.
- Bisse J. 1981. *Árboles de Cuba*. La Habana: Editorial Científico-Técnica.
- Bookstein F. 1991. *Morphometric tools for landmark data: Geometry and biology*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Bronstein JL, Patel A. 1992. Causes and consequences of within-tree phenological patterns in the Florida strangling fig, *Ficus aurea* (Moraceae). *American Journal of Botany* 79: 41–48.
- Burger WC. 1974. Ecological differentiation in some congeneric species of Costa Rican flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 61: 297–306.
- Burger WC. 1977. Moraceae. In: Burger WC, Lutey JL, Wilbur RL eds. *Flora Costaricensis*. Chicago: Field Museum of Natural History. 94–215.
- Carvajal S. 2012. Sistema para la familia Moraceae en México. *Ibugana* 3: 3–103.
- Carvajal S. 2007. Moraceae. In: Rzedowski R, Calderón de Rzedowski G eds. *Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes*. Michoacán: Instituto de Ecología A. C. 147: 1–57.
- Castello LV, Galetto L. 2013. How many taxa can be recognized within the complex *Tillandsia capillaris* (Bromeliaceae, Tillandsioideae)? Analysis of the available classifications using a multivariate approach. *PhytoKeys* 39: 25–39.
- Craud A, Rønsted N, Chantarasuwan B, Chou LS, Clement WL, Couloux A, Cousins B, Genson G, Harrison RD, Hanson PE, Hossaert-Mckey M, Jabbour-Zahab R, Jousset E, Kerdelhué C, Kjellberg F, Lopez-Vaamonde C, Peebles J, Peng YQ, Santinelo P, Rodrigo A, Schramm T, Ubaidillah R, Van Noort S, Weiblen GD, Yang DR, Yodpinyanee A, Libeskind-Hadas R, Cook JM, Rasplus JY, Savolainen V. 2012. An extreme case of plant-insect codiversification: Figs and fig-pollinating wasps. *Systematic Biology* 61: 1029–1047.
- Dayrat B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 407–415.
- DeWolf GP. 1960. *Ficus*. In: Woodson RE, Schery RW eds. *Flora of Panama*. Missouri: Annals of the Missouri Botanical Garden. 146–165.
- Everitt B. 1978. *Graphical techniques for multivariate data*. New York: North-Holland.
- Ezedin Z, Weiblen GD. 2019. Additions and changes to *Ficus* (Moraceae) in New Guinea with comments on the world's largest fig. *Gardens' Bulletin Singapore* 71: 197–216.
- Fragoso-Martínez I, Martínez-Gordillo M, de Luna E. 2015. *Salvia semiscaposa* (Lamiaceae) a new species from Nanchititla, Mexico. *Phytotaxa* 219: 58–68.
- González J. 2007. Moraceae. In: Hammel BE, Grayum C, Herrera C, Zamora N eds. *Manual de plantas de Costa Rica*. St. Louis: Missouri Botanical Garden Press. 6: 635–675.
- González-Rodríguez A, Oyama K. 2005. Leaf morphometric variation in *Quercus affinis* and *Q. laurina* (Fagaceae), two hybridizing Mexican red oaks. *Botanical Journal of the Linnean Society* 147: 427–435.
- Grattapaglia D, Kirst M. 2008. *Eucalyptus* applied genomics: From gene sequences to breeding tools. *New Phytologist* 179: 911–929.
- Gurgel-Gonçalves R, Ferreira JBC, Rosa AF, Bar ME, Galvão C. 2011. Geometric morphometrics and ecological niche modelling for delimitation of near-sibling triatomine species. *Medical and Veterinary Entomology* 25: 84–93.
- Hammer Ø, Harper D, Ryan P. 2001. Paleontological statistics software: Package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4: 1–9.
- Holbrook NM, Putz FE. 1996. From epiphyte to tree: Differences in leaf structure and leaf water relations associated with the transition in growth form in eight species of hemiepiphytes. *Plant, Cell and Environment* 19: 631–642.
- Holdridge LR. 1996. *Ecología basada en zonas de vida*. San José, Costa Rica: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 4: 216. (reimpresión)
- Ibarra-Manríquez G, Cornejo-Tenorio G, González-Castañeda N, Piedra-Malagón E. 2012. El género *Ficus* L. (Moraceae) en México. *Botanical Sciences* 90: 389–452.
- Jackson AP, Machado CA, Robbins N, Herre EA. 2008. Multi-locus phylogenetic analysis of Neotropical figs does not support co-speciation with the pollinators: The importance of systematic scale in fig/wasp cophylogenetic studies. *Symbiosis* 45: 1–16.
- Liojier AH. 1996. *La flora de La Española*. VIII. Santo Domingo: Editora Taller C. por A.

- Pedemeiras LC, Carauta JPP, Romaniuc-Neto S, de Mansano VF. 2015. An overview of the infrageneric nomenclature of *Ficus* (Moraceae). *Taxon* 64: 589–594.
- Pedemeiras LC, de Mansano VF, Romaniuc-Neto S. 2017. Taxonomic synopsis of the *Ficus* sect. *Pharmacosycea* (Moraceae) from Colombia. *Phytotaxa* 313: 001–022.
- Piedra-Malagón EM, Albarrán-Lara AL, Rull J, Piñero D, Sosa V. 2016. Using multiple sources of characters to delimit species in the genus *Crataegus* (Rosaceae): The case of the *Crataegus rosei* complex. *Systematics and Biodiversity* 14: 244–260.
- Piedra-Malagón EM, Hernández-Ramos B, Mirón-Monterrosas A, Cornejo-Tenorio G, Navarrete-Segueda A, Ibarra-Manríquez G. 2019. Syconium development in *Ficus petiolaris* (*Ficus*, sect. *Americanae*, Moraceae) and the relationship with pollinator and parasitic wasps. *Botany* 97: 190–203.
- Piedra-Malagón EM, Sosa V, Ibarra-Manríquez G. 2011. Clinal variation and species boundaries in the *Ficus petiolaris* complex (Moraceae). *Systematic Botany* 36: 80–87.
- Raxworthy CJ, Ingram CM, Rabibisoa N, Pearson RG. 2007. Applications of ecological niche modeling for species delimitation: A review and empirical evaluation using day geckos (*Phelsuma*) from Madagascar. *Systematic Biology* 56: 907–923.
- Rissler LJ, Apodaca JJ. 2007. Adding more ecology into species delimitation: Ecological niche models and phylogeography help define cryptic species in the black salamander (*Aneides flavipunctatus*). *Systematic Biology* 56: 924–942.
- Rohlf F. 2016. tpsDIG. Version 2.26 [online]. Available from life.bio.sunysb.edu/morph/ [accessed 17 September 2018].
- Rozendaal DMA, Hurtado VH, Poorter L. 2006. Plasticity in leaf traits of 38 tropical tree species in response to light; relationships with light demand and adult stature. *Functional Ecology* 20: 207–216.
- Schlichting CD. 1986. The evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 17: 667–693.
- Sosa V, De-Nova JA, Vásquez-Cruz M. 2018. Evolutionary history of the flora of Mexico: Dry forests cradles and museums of endemism. *Journal of Systematics and Evolution* 56: 523–536.
- Standley PC. 1917. The Mexican and Central American species of *Ficus*. *Contributions from the United States National Herbarium* 20: 1–37.
- Standley PC, Steyermark JA. 1946. Moraceae. In: Standley PC, Steyermark JA eds. *Flora of Guatemala*. Fieldiana: Botany. 24: 10–58.
- Thiers B. 2019. [continuously updated]. Index herbariorum: A global directory of public herbaria and associated staff. *New York Botanical Garden's virtual herbarium* [online]. Available from <http://sweetgum.nybg.org/ih/> [accessed 13 May 2019].
- Todzia CA. 2001. *Ficus* (Moraceae). In: Stevens WD, Ulloa C, Pool A, Montiel OM eds. *Flora de Nicaragua*. St. Louis: Missouri Botanical Garden Press. 1520–1533.
- Velázquez-Rosas N, Meave JA. 2002. Elevational variation of leaf traits in montane rain forest tree species at La Chinantla, southern México. *Biotropica* 34: 534–546.
- Viscosi V, Cardini A. 2011. Leaf morphology, taxonomy and geometric morphometrics: A simplified protocol for beginners. *PLoS One* 6: e25630.
- Zelditch ML, Swiderski DL, Sheets HD, Fink WL. 2004. *Geometric morphometrics for biologists: A primer*. Amsterdam: Elsevier/Academic Press. 59: 457.

Supplementary Material

The following supplementary material is available online for this article at <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jse.12564/supinfo>:

Table S1. Regression results testing the effect of size onto shape (allometry).

Table S2. Loadings of the first two principal components of the syconium characters PCA. In bold are highlighted the variables that most contributed to explain the variation.

Appendix I. Additional specimens examined to the five species of *Ficus* recognized in the present study. Herbarium acronyms are based on Index Herbariorum (Thiers, 2019).

F. aurea

BRITISH OVERSEAS TERRITORIES. Cayman Islands: North Side, Jackson, Little Cayman, W. Kings LC-87 (MO). **COSTA RICA. Alajuela:** Garita, camino secundario entre El Coyoil y La Garita, cerca del antiguo Bosque Encantado, A. Estrada 4369 (CR); San Isidro, Grecia, G. Ibarra 1760 (MEXU); Upala, el pueblo y sus alrededores, San José, G. Herrera 1791 (CR). **Cartago:** pasture beside Río Pejibaye, between Río Taus & Quebrada Azul, W. Lent 2537 (MO). **Guanacaste:** Cantón de Tilarán. La Chiripa, 16 km NW of Monteverde on road from Sta. Elena to Tilarán, W. Haber 11526 (CR); Liberia, Cañas Dulces, Buena Vista, vertiente oeste de Volcán Rincón de la Vieja, Propiedad de Hotel Borinquen, A. Estrada 5021 (CR). **Heredia:** Campus de Universidad Nacional, Heredia, M.C. Wiemann 112486 (CR); **Puntarenas:** Nicoya Peninsula, mangrooves at Río Curú mouth, A. C. Sanders 17822 (CR); Península de Nicoya, Cerro Frío, E. Alfaro 4394 (CR). **CUBA. La Habana:** La Habana, Jibacoa, área de Campismo, P. Acevedo-Rodríguez 6506 (FTG). **Matanzas:** cerca de Bacunayagua, F. Casas 10720 (MO). **Pinar del Río:** Península de Guanahacabibes, camino Cabo Corriente, playa Las Canas, municipio Sandino, J. Vélez 152 (JBSD). **Santa Clara:** Vicinity of Soledad, R. A. Howard 5416 (JBSD); Trinidad Mountains. San Blas-Buenos Aires, R. A. Howard 5180 (JBSD). **DOMINICAN REPUBLIC. Azúa:** Sierra Martín García, poblado de Barrero, R. García 1668 (JBSD). **La Estrelleta:** Valle de San Juan, aprox. 1 km al sur del poblado de Elías Piña, en la subida y carretera a Zobacón y Hondo Valle, T. Zanoni 32955 (JBSD). **Puerto Plata:** La Unión, E of new Puerto Plata International Airport, M. Mejía 7322 (JBSD); Carretera el Choco, Sosúa, K. B. Hernández 342 (MEXU, JBSD). **Santiago:** Paraje El Remolino, márgenes del río Ámina, municipio San José de Las Matas, distrito municipal Inoa, T. Clase 6872 (JBSD). **Santo Domingo:** 3 km al E de Boca Chica, A. H. Liogier 26080 (JBSD). **GUATEMALA. Guatemala:** Along streets of Guatemala City, W. E. Harmon 2285 (MO). **EL SALVADOR. Ahuachapán:** El Mariposario, El Corozo, M. Renderos 754 (MO); San Benito, río Mashtapula, al E del Caobón, E. Sandoval 1125 (MO). **La Libertad:** laderas de la laguna, municipio Antiguo Cuscatlán, R. Cruz 207 (MO). **San Miguel:** La Florida coffee farm, Ciudad Barrios, A. K. Monro 3414 (MO). **San Salvador:** Km. 10 carretera a Santo Tomás, Orilla de un cafetal, D. Vargas 3070 (MO). **Santa Ana:** Miramundo, P. N. Montecristo, San José Ingenio, V. M. Martínez 1033 (MO); Calle polvosa al Volcán de Santa Ana, R. Villacorta 277 (MO). **THE BAHAMAS. Bimini:** edge of coppice on north side of airstrip, D. S. Correl 42214

(FTG). **Exuma:** Hummingbird Cay, Nickerson 2722 (MO); Mosstown, J. Eldridge s. n. (MO); Northwest of George Town, in rocky coppice, D. S. Correll 46883 (FTG). **Long Island:** Mangroove Bush Road to the east coast, S. R. Hill 1974 (FTG). **Moore's Island Abaco:** North of Woods Cay, E. Freid 58 (FTG). **North Andros:** Between Nicholls Town and Morgans Bluff, on rock outcrop along shore road, D. S. Correll 44021 (FTG). **North Eleuthera:** Near Preachers Cave, rocky talus below cliffs, D. S. Correll 41180 (FTG). **JAMAICA. Cornwall:** 2–3 miles north by road of Burnt Hill crossroads, Parish of Trelawny, H. A. Hespeneide 1288 (MO); Vicinity of Burnt Hill, Parish of Trelawny, R. F. Thorne 48089 (MO). **Middlesex:** Horse Cave, beside southeast end of Salt Island Lagoon, Parish St. Catherine, G. R. Proctor 28788 (MO). **MEXICO. Chiapas:** Ejido Emiliano Zapata, 6 km al SO del municipio de Ocozocoautla, H. Hernández 3123 (CH); Estación de Biología Chajul, camino a vereda Miranda, municipio Ocosingo, G. Ibarra 4006 (MEXU); Cascada Mesbiljaz, municipio Oxchuc, A. Méndez 8515 (CICY, MEXU, MO); Camino El Arenal, Reserva de la Biósfera El Triunfo, G. Ibarra 7047 (MEXU). **Nayarit:** El Cora, 12 km al E, camino a Palapita, municipio Xalisco, G. Flores 3083 (MO). **Oaxaca:** Arroyo Azul (Agua Azul), \pm 5.5 km en línea recta al NNE de Aserradero Río Escondido. Col. Cuauhtémoc, municipio Matías Romero, T. Wendt 5262 (MEXU, MO, SLPM); Xadani, 16 km N, camino a la constancia, en el Portillo, municipio San Miguel del Puerto, S. Salas 2732 (CHAPA, MEXU). **Tabasco:** Teapa, 3 km E along road to Jalapa, municipio Teapa, T. B. Croat 40113 (MO). **Veracruz:** 3 km NW of Vega de Alatorre, along hwy. 180 Mex., municipio Vega de Alatorre, M. Nee 29154 (F); Camino a la Laguna Escondida, San Andrés Tuxtla, K. B. Hernández 291 (MEXU); Colonia La Palma, municipio Catemaco, G. Martínez 2295 (F, MO, XAL). **NICARAGUA. Chontales:** Vicinity of Finca San Pedro de Oluma, on NE flanks of Cerro Oluma, 4 km N of Cuapa, M. Nee 28336 (MO). **Estelí:** Reserva Natural Mirafior, a lo largo de la poza del canal, municipio de Estelí, I. Coronado 51 (MO); El Zacatón (Plan Helado), P. Moreno 17474 (MO). **Isla Ometepe:** in Lago Nicaragua Volcan Maderas, north slope, Finca Argentina, D. Neill 3232 (MO). **PANAMA: Panama:** Cerro Campana, $\frac{3}{4}$ of the way to the summit from Pan American Highway, J. D. Dwyer 4710 (MO). **UNITED STATES OF AMERICA. Florida:** Broward County, 7320 Sheridan Street, 1.3 mi. W of Florida Turnpike, ca. 4 mi. SE of Cooper City, B. Hansen 10571 (FTG); Collier County, Marco Island, S of Rte 92, H. Loconte 952 (FTG); Dade County, edge of Snapper Creek Hammock along Old Cutler Road, where it crosses Snapper Creek, D. S. Correll 42279 (FTG); Martin County, in coppice along creek in Jonathan Dickinson State Park, near picnic area, D. S. Correll 49901 (FTG); Monroe County, Key Largo, N Pakhomoff 2 (FTG); Vicinity of new Coral, Springs High School, Sample Rd., Coral Springs, Broward County, S. R. Hill 2678 (FTG).

F. cookii

GUATEMALA. Huehuetenango: Nentón, cerros camino a la aldea Chacá, municipio de Huehuetenango, J. Jiménez 564 (MEXU). **MEXICO. Chiapas:** Km 11 de la carretera San Cristóbal-Tuxtla Gutiérrez, municipio Chiapa de Corzo, G. Ibarra 5739 (IEB, MEXU); Angostura-Comitán, tramo Venustiano Carranza, cerca Laja Tendida, municipio Venustiano Carranza, M. E. López 625 (HEM); Cañada de la

cascada El Chorreadero, km 25 de la carretera Tuxtla Gutiérrez-San Cristóbal de las Casas, municipio Chiapa de Corzo, E. Cabrera 3842 (CICY, MO); Cerro Las Plumas, municipio San Fernando, R. Martínez 722 (HEM); Colonia El Carmen, sistema montañoso ubicado al E de la entrada por la zona militar, municipio Berriozábal, M. A. Domínguez 509 (HEM); Colonia El Palmarcito, 32 km al oeste del municipio, municipio Bochil, M. A. del Barco 214 (HEM); El Aguacero, municipio Ocozocoautla, A. Montúfar 45 (CHAP, IBUG); Escuela El Pozo, 200 m al noroeste, municipio San Juan Cancuc, F. Gómez 324 (CH); Laguna Coila, poblado Santa Rita Uninajab, municipio Comitán de Domínguez, E. Martínez 40050 (MEXU); Laguna Colón, 12 km de la carretera frontera Comalapa-Comitán, municipio La Trinitaria, A. Chamé 156 (CH, CHAPA, HEM, MEXU); Nuevo Vergel, 2 km al S del ejido La Nueva, municipio Copainalá, M. Martínez 384 (HEM); Parque Nacional Cañón del Sumidero, mirador La Coyota, municipio Tuxtla Gutiérrez, J. A. Espinosa 133 (HEM); Near Pokolum, paraje of Sibanil Ha', municipio Tenejapa, D. E. Breedlove 7443 (F, INIF); Rancho Buenavista, 800 m al oeste, en el filo del cerro, municipio La Concordia, J. Martínez 913 (HEM, MO); Rancho El Cafetal, municipio Cintalapa, E. Meléndez 130 (HEM, MEXU); Rancho Zoquipak, sobre la orilla río arriba, municipio Chicoasén, J. Martínez 2154 (HEM); San Antonio Zaragoza, aproximadamente 2 km al SE de la comunidad, municipio Soyaló, A. López 813 (HEM); Taquinalhó, 10 km del desvío en carretera hacia El Copal, municipio Bochil, J. A. Espinosa 1050 (MEXU); Torre de electricidad 139, por el ejido CNC, municipio Ocozocoautla, R. Martínez 615 (HEM). **Oaxaca:** Cerro Guiengola, municipio Tehuantepec, E. Matuda 37381 (MEXU); brecha a Lachivixa, 5 km NO de Lachiguirí, municipio Lachiguirí, A. Campos 3619 (MEXU); Matías Romero, municipio Matías Romero, E. Matuda 37380 (MEXU).

F. isophlebia

COSTA RICA. Limón: vicinity of Limón, W. C. Burger 8482 (CR). **GUATEMALA. Alta Verapaz:** Sebol, in potrero bordering Coban Road, E. Contreras 4443 (MO). **HONDURAS. Bay Islands:** "Forest Home", Punta Gorda, W. A. Schipp (MO). **Colón:** along Río Selen 7 mile E Trujillo, J. Saunders (MO). **Yoro:** Intersection of Río Guaimas (Guaimon) and the main highway between El Progreso and Tela, G. Davidse 34383 (MO). **MEXICO. Chiapas:** Carretera Benemérito de las Américas-Crucero Frontera Corozal, Reserva comunal La Cruz, municipio Ocosingo, G. Ibarra 5678 (IEB, MEXU); Comunidad Lacandona de Lacanhá-Chansayab, 130 km al SE de Palenque, municipio Ocosingo, S. Levy 14 (CHAP). **Oaxaca:** Camino al vertedor de la Presa Temascal, 5 km al sur de la Hidroeléctrica, municipio Soyaltepec, L. Cortés 811 (CHAP); Cerro de La Piedra Azul, a 1 km en línea recta al NE (32°) de Nizanda, municipio Asunción Ixtaltepec, J. Meave 2500 (MEXU); Esmeralda, 6.2 km al S, sobre camino al Aserradero La Floresta, municipio Matías Romero, T. Wendt 3563 (IEB, MEXU, MO, SLPM, UAMIZ). **Tabasco:** Ejido Manatiner, municipio Cárdenas, M. A. Pérez s.n. (MEXU, UJAT). **Veracruz:** 2.4 km by rd S of Sihuapan and junction with Hwy Méx 180, along dirt road to Salto de Eyipantla, 4 km (by air) SE of San Andrés Tuxtla, municipio San Andrés Tuxtla, M. Nee 23709 67 (CHAPA, F, NY, XAL); Carretera Acayucan-

Sayula, Sayula de Alemán, K. B. Hernández 345 (MEXU); El Mirador, terracería Las Varillas-Laguna Ostión, municipio Coatzacoalcos, A. Rincón 2841 (CICY, UAT, XAL); Parada San Andrés, Ejido Juan de Alfaro, 2 km al suroeste de Paso de Toro, municipio Medellín, G. Ibarra 3246 (F, MEXU, MO, XAL). **NICARAGUA. Boaco:** N of Cuapa, 7.2 km along W fork toward Camoapa passing E of Cerro Oluma, W. D. Stevens 32261 (MO); Along Hwy. 33 CA. 1.3 km NE of intersection with Hwy 19 (to Camoapa), W. D. Stevens 9355 (MO). **Chontales:** 2 km SE of Tawa, at road crossing Río Tawa, W. D. Stevens 35030 (MO); 2.2 km NW of Río Cuapa bridge below Cuapa, W. D. Stevens 36864 (MO). **Chinandega:** Volcán San Cristóbal, hacienda Las Rojas, 20 km ak NE de ciudad Chinandega, A. Grijalva 3993 (MO). **Granada:** comarca Aguas Agrias, finca Las Plazuelas, alrededor de la Laguna Verde, Reserva Natural Laguna de Mecatepe y río Manares, municipio de Nandaime, I. Coronado G. 6020 (MO); Volcán Mombacho, entre las fincas María Auxiliadora y El Cacao, P. P. Moreno 450 (MO). **Managua:** camino “Las Nubes” y “Pochocuape”, M. Araquistain 3502 (MO); Escuela de Agricultura, km 12 carretera Norte, Araquistain 3746 (MO); Carretera entre Las Conchitas y Masachapa, km 35–40, M. Guzmán 1983 (MO). **Masaya:** near west shore of Laguna de Masaya, D. Neill 3460 (MO). **Matagalpa:** “San Ramón”, 7 km al E de Matagalpa, P. P. Moreno 22933 (MO). **Nueva Segovia:** La Tronquera, P. P. Moreno 19442 (MO). **Rivas:** Isla Ometepe, Volcán Maderas, Mérida, sitio “Las Abejas”, W. Robleto 307 (MO). **PANAMA. Bocas del Toro:** 2 km N Isla Colon, Swan Key, E. L. Tyson 6294 (MO). **Chiriquí:** Vicinity of Puerto Armuelles, R. E. Woodson, jr. 812 (MO). **Coclé:** La loma de El Roble, near Rio Santa Maria, McDaniel 14853 (MO); Near village of Cabuya, G. McPherson 10905 (MO); On bank of rio Teta, K. E. Blum 1868 (MO). **Herrera:** 2 miles west Divisa along Inter American Highway, E. L. Tyson 5158 (MO). **Los Santos:** Area east of Cambutal, near coast, L. R. Holdridge 6224 (MO). **Panama:** Boy scout camp road, canal zone, A. Gentry 5507 (MO); San Carlos, a orillas del río Corona, R. de McPherson s. n. (MO).

F. tecolutensis

GUATEMALA. Sacatepéquez: Alotenango, J. D. Smith 2605 (NY). **HONDURAS. Bay Islands:** Isla Santillana o de Swan, C. Nelson 9700 (MO). **Olancho:** orilla de la quebrada El Zarzal, Valle de Lepaguare, A. Molina R. 13407 (NY). **MEXICO. Chiapas:** Slopes of río Laja, between Ixtapa y Solayo, municipio Ixtapa, D. E. Breedlove 50650 (MEXU, MO); Río Laja, 5 km al N de Ixtapa sobre el camino a Soyalo, municipio Ixtapa, D. E. Breedlove 35082 (ENCB, MEXU, MO, SLP, TEX). **Guerrero:** El Ranchito, 13 km al NE de Paraíso, municipio Atoyac de Álvarez J. C. Soto 10073 (MEXU). **Hidalgo:** 15 km al NO de Jacala, rumbo a Pacula, municipio Jacala, A. Frías 611 (IBUG). **Oaxaca:** parte bajo del Cerro Espino, cerca de Finca Alianza, municipio San Pedro Pochutla, P. Carrillo 3744 (MEXU); Río Culebra, municipio San Juan Ojitlán, J. I. Calzada 14812 (MEXU); vicinity of cafetal Concordia, C. V. Morton 2390 (NY, US). **Puebla:** El Salto, municipio Xicotepec, T. D. Pennington 9448 (INIF, MEXU); Ocomantla, 2 km al S, municipio Zihuateutla, J. L. Contreras 5138 (IEB); Pahuatlán, 3 km al N, carretera a San Pablito, municipio Pahuatlán, P. Tenorio 15724 (MEXU); San Diego, cerca de la carretera a Tuxpan, L. Paray 2089 (MEXU). **Querétaro:** 2 km de Pizquinta, por el río Jalpan, municipio de Jalpan, E. Carranza 1730 (MEXU); 3–4 km río abajo del Puente Conca, Río Santa

María, municipio Arroyo Seco, E. Carranza 1785 (IEB, QMEX, TEX); Neblinas, casa del Sr. Noé Chavero, municipio Landa de Matamoros, G. Ibarra 6100 (IEB, MEXU). **San Luis Potosí:** Cascada de Tamasopo, municipio Tamasopo, M. Cházaro s. n. (IEB); margen izquierdo del río Moctezuma, delegación Barrio de Guadalupe, municipio Tamazunchale, F. J. Rendón 477 (IBUG); Tamazunchale, municipio Tamazunchale, C. L. Lundell 7205 (F, LL, NY, MEXU). **Veracruz:** along hwy. Mex. 180, 3 km NO of Vega de la Torre, municipio Vega de la Torre, M. Nee 29154 (NY); Lote 67, Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas, municipio San Andrés Tuxtla, G. Ibarra 3547 (ENCB, FCME, MO); Malecón de Catemaco, Catemaco, K. B. Hernández 347 (MEXU); terracería La Jabonera-Chintipan, municipio Tlachichilco, A. Rincón 2539 (CICY, MEXU, UAT, XAL); desembocadura del Río Culebras al Río Grande, municipio Yecuatla, C. Gutiérrez 2608 (ECOSUR, IBUG, MEXU).

NICARAGUA. Estelí: Reserva Natural Mirafior, quebrada pequeña, a lo largo de la poza del canal, municipio de Estelí, I. Coronado 51 (MEXU); Reserva Natural Mirafior, Comarca Puertas Azules, al suroeste de la comunidad del mismo nombre, municipio de Estelí, R. M. Rueda 11146 (MO).

F. tuerckheimii

COSTA RICA. Cartago: La Unión, San Rafael, Z.P. La Carpintera, bosque en campo, escuela Istarú (Scouts de Costa Rica), A. Cascante 1617 (CR). **Guanacaste:** Sendero al Volcán Miravalles, represa Cabromico, sector Fortuna de Bagaces, Cantón de Bagaces, U. Chavarría 1468 (MO). Cordillera de Guanacaste, P. N. Rincón de la Vieja, Cantón de Liberia, J. F. Morales 5709 (MO). **Heredia:** Cantón San Rafael, Distrito Ángeles, G. Ibarra 7162 (MEXU). **Puntarenas:** along Río Guacimal, downstream from Monte Verde, Cordillera de Tilarán, M. H. Grayum 5415 (MO); Cordillera de Talamanca, Estación Pittier, P. I. La Amistad, Cantón de Coto Brus, M. Chinchilla 182 (MO); Monteverde community, W. A. Haber 4960 (CR); zona protectora Las Tablas, Río Cotoncito, I. A. Chacón 1795 (MO). **San José:** Acosta, Palmichal, Z.P. Cerros de Escazú, cuenca superior del río Negro, A. Estrada 4586 (CR); San José, Aserri, Tarbaca, Cerros de Escazú, camino entre Tarbaca y Cedral, A. Estrada 4003 (CR); San Ramón de Tres Ríos, J. Serrano s. n. (CR). **GUATEMALA. Quetzaltenango:** Las Mercedes, A. Tonduz 155 (MO). **MEXICO. Chiapas:** Ejido Sierra Morena, municipio Villacorzo, A. Reyes-García 6789 (MEXU); Honduras, near Siltepec, E. Matuda 4388 (MO); near Pozo Turipache and Finca El Suspiro, 13 km north of Berriozábal, municipio Berriozábal, D. E. Breedlove 35315 (CHAP, F, MO). **Colima:** camino a Lagunitas, 5.1 km en línea recta al N de Campo Cuatro, municipio Comala, G. Ibarra 5812 (IEB); La Mesa de la Yerbabuena, Volcán del Fuego o Colima, municipio Comala, M. Cházaro 7277 (CHAP, IBUG, XAL); Rancho El Jabalí, 22 km al NNW of Colima in the SW foothills of the Volcan de Colima, municipio Comala, E. J. Lott 3028 (CIIDIR, F, MO, NY). **Jalisco:** El Puerto Los Mazos, cerca de la antera de microondas, municipio Casimiro Castillo, R. Cuevas 4865 (IBUG). **Michoacán:** Rancho Tehuantepec, municipio Chinicuila, X. Madrigal 3234 (CHAP). **Oaxaca:** Cerro Sabinal, 2 km al SW de cerro Guayabitos, 3 km en línea recta al NNW de Díaz Ordaz, municipio San Miguel Chimalapa, T. Wendt 4665 (CHAP, MO); Las Lobas, Distrito Pochutla, municipio San Miguel del Puerto, J. Pascual 1324 (MEXU). **Puebla:** 7 km por el camino a Camocuautla, municipio Camocuautla, J. L.

Contreras 7102 (HUAP); km 24 on highway from Zacapoaxtla to Cuetzalan, where Rio Apulco crosses highway, municipio Apulco, B. Benz 532 (IBUG); Cuautotola, 1 km al NE, municipio Amixtlán, J. L. Contreras 5195 (CHAP, HUAP, XAL). Carretera a Ayotoxco, junto a base de Combis, municipio Hueytamalco, G. Ibarra (6949). **Querétaro:** 7 km al N de La Parada, municipio Jalpan, R. Fernández 4302 (CHAP); Puerto El Sabino, municipio Landa de Matamoros, G. Cornejo 3413 (IEB, MEXU). **San Luis Potosí:** Camino al castillo de Eduard James, Xilitla, K. B. Hernández 308 (MEXU); La Conchita, 2 km al NE de Xilitla, brecha a Tlamaya, municipio Xilitla, P. Tenorio 2468 (MEXU). **Veracruz:** Aproximadamente 2 km de Coatepec hacia Xalapa, municipio Coatepec, G. Ibarra 6255 (MEXU); Barranca al W de Capulapa, municipio Huatusco, S. Avendaño 573 (CHAP, F); Rancho El Florero, 16 km S de Tlapacoyan, carretera Talapacoyan - Atzalán - Perote, municipio Atzalán,

G. Ibarra 3231 (MEXU, XAL). **Tamaulipas:** km 9 sobre la brecha que va de Rancho del Cielo al poblado de Gómez Farías, municipio de Gómez Farías, A. Valiente 528 (MEXU); Camino a Alta Cima, Reserva de la biósfera El Cielo, Gómez Farías, K. B. Hernández 300 (MEXU). **NICARAGUA. Estelí:** along road to San Juan de Limay, 14 km from Panamerican Highway North, W. D. Stevens 29643 (MO). **Jinotega:** Reserva Natural Cerro Kilambé, comunidad Las Vueltas, municipio de Wiwilí, R. M. Rueda 16426 (MO). **PANAMA. Bocas del Toro:** Cerro colorado mine área, B. Hammel 14913 (MO) **Chiriquí:** 2 mi N. of El Hato del Volcan, T. B. Croat 10653 (MO); a lo largo del camino que va de Bambito a los llanos de lava, M. D. Correa 1403 (MO). East of Boquete along forested slopes and pastures on Cerro Azul near Quebrada Jaramillo, T. B. Croat 26733 (MO); Near cerro Colorado, c. 3.5 miles along road from Chami Camp, G. McPherson 9003 (MO).

CAPÍTULO III



Diversidad de *Ficus* en México. De izquierda a derecha, *Ficus americana*, *Ficus colubrinae*, *Ficus cotinifolia*, *Ficus crassinervia*, *Ficus insipida*, *Ficus turrialbana*, *Ficus membranacea*, *Ficus paraensis*, *Ficus pertusa*. Fotografías: Karen B. Hernández.

Phylogenomics and species delimitation of the *Ficus aurea* complex (sect. *Americanae*) based on RADSeq data

Karen Beatriz Hernández-Esquivel¹, Laure Saune², Astrid Cruaud², Jean-Yves Rasplus², Guillermo Ibarra-Manríquez¹

¹Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Universidad Nacional Autónoma de México. Antigua carretera a Pátzcuaro No. 8701. Col. San José de La Huerta. C. P. 58190. Morelia, Michoacán, México

²CBGP, INRA, CIRAD, IRD, Montpellier SupAgro, Univ Montpellier, Montpellier, France

Abstract

Molecular phylogenetic studies in Neotropical *Ficus* L. species are scarce, and the few attempts to reconstruct well supported phylogenies have failed. The Neotropical figs in the section *Americanae* often form species complexes, and elucidating the processes that have shaped their evolutionary history, is necessary. In the present study, we performed a phylogenetic assessment of the species belonging to the *Ficus aurea* species complex with the use of RAD-Seq data. This species complex is distributed in a wide latitudinal range (from localities of North to Central America and The Greater Antilles) and herbarium specimens are often difficult to separate into different species. Populations were sampled from previously five recognized species in the *F. aurea* complex. A group of congeneric species was incorporated to a phylogenetic analysis to test if species in the complex are more closely related within them than to others. Overall, our results show that species within the *F. aurea* complex form distinct clades with high support, under both concatenated and species trees approaches. The species delimitation test found seven distinct clusters, which agree with subclades found in *F. aurea* and *F. tuerckheimii* species.

Coancestry tests evidenced population structure for *F. aurea*, and shared alleles from a recent origin within the species in the complex.

Introduction

Ficus L. species are one of the most important ecological components in the tropical lowland rainforests around the world (Harrison, 2005). They provide food all year round for a large diversity of animals (Shanahan et al., 2001). Species conservation and continuous ecological studies of them are a priority for maintaining the biodiversity in tropical forest and to find solutions on the negative consequences derived from forest fragmentation (McKey, 1989; Lomáscolo et al., 2010). One of the *Ficus* most interesting attributes is their mutualistic interactions with their pollinating fig wasps. For decades, evolutionary biologists have made efforts to elucidate how this interaction is the result of a coevolutionary history (*e. g.* Rønsted et al., 2005; Cruaud et al., 2012). However, attempts in solving this problem can be questionable because testing for coevolutionary history requires a clear taxonomy and well resolved evolutionary history of the taxa to be evaluated (Cook and Rasplus 2003; Cruaud and Rasplus, 2016), which in many cases is lacking. Thus, one of the first tasks before testing for coevolutionary relationships, should be the clarification of the taxonomical status of figs and wasps, and to solve their phylogenetic relationships to make sure that coevolution is tested between well-defined taxa with a common ancestor (Cruaud and Rasplus, 2016).

Systematic studies in *Ficus* have been largely addressed testing the phylogenetic relationships between subgenera and its sections, and their coevolutionary history with the genera of fig wasps. However, a gap in the taxonomic and systematic knowledge at interspecific level still exists. Such is the case of the two sections of *Ficus* endemic to the Neotropics, section *Americanae* (Miq.) Corner,

subgenus *Spherosuke* Raf., and section *Pharmacosycea* (Miq.) Griseb., subgenus *Pharmacosycea* (Miq.) Miq. These sections hold, presumably, 100 to 120, and 20 to 25 species, respectively (Berg, 1989; Berg and Corner, 2005).

The taxonomy of Neotropical figs has been complicated to address for two reasons: 1) in section *Pharmacosycea*, species display strong interspecific morphological similarity; 2) in section *Americanae*, the complicated morphology is difficult to use to delimitate species, which often form species complexes (Berg, 1989). These complexes in section *Americanae* are integrated by widely distributed taxonomic entities and it is unknown if they belong to the same species or not (Berg, 1989, 2007). Likewise, to date, there are no well-resolved phylogenetic hypotheses among the species in both sections. Traditional molecular markers, such as Internal Transcribed Spacer (ITS), External Transcribed Spacer (ETS) or Topoisomerase I (*Tp*), have not been able to solve evolutionary relationships within species to both sections (Jackson et al., 2008; Cruaud et al., 2012). The absence of node support in community phylogenies of *Ficus* in Panama, together with species recovered as polyphyletic, have led to the conclusion that strong hybridization is taking place among Neotropical figs (Jackson et al., 2008).

In recent years, the use of Next Generation Sequencing data to delimitate species and solve phylogenetic relationships in non-model organisms has become the rule rather than the exception (e. g. Boucher et al., 2016; Nicotra et al., 2016; Pyron et al., 2016). Data derived from reduced representations of the genome, like the Restriction Site Associated DNA data (RADSeq; Baird et al., 2008), have been widely used because of their relative low cost, straightforward protocols, and their potential to be applied at the populations and species level (Dodsworth, 2015). Efforts to provide a phylogenetic framework in *Ficus* with this approach could help address some of the taxonomical problems related to the delimitation of the neotropical

species, and to provide evolutionary insights into the processes that have led to the diversification of this group in this highly diverse region (Ulloa et al., 2017).

The *Ficus aurea* complex is a group in which 14 species, distributed throughout the United States of America (Florida state), Mexico, Central America, and the Caribbean, were lumped to a single species with different polymorphic states (Berg, 2007). In Mexico, some authors recognized this proposal with their respective cautions (Ibarra-Manríquez et al., 2012). However, this classification was never fully incorporated in several other treatments (Todzia, 2001; González, 2007). To address the problem of taxonomical controversies in the section *Americanae* using an integrative taxonomy approach, a recent study used geometric and traditional morphometrics of diagnostic plant structures (leaves and syconia) across entities of the *F. aurea* complex (Hernández-Esquivel et al., 2020). In this work, the authors combined morphometry with ecological data, to assess if the variation along the range of the species complex can be explained by recognizing a widely distributed and phenotypically plastic single species, or rather, reflects variation that can be better understood by recognizing different species (Hernández-Esquivel et al., 2020). With a sampling scheme that included several individuals per population throughout the range of the species complex, Hernández-Esquivel et al. found that leaf shape was split into several entities without being influenced by geographical or climatic data. Likewise, syconium traits were linked with different taxa and associated with elevation and annual average precipitation. With this evidence, the authors recognized five species within the *F. aurea* complex: *F. aurea* Nutt., *F. cookii* Standl., *F. isophlebia* Standl., *F. tecolutensis* (Lieb.) Miq., and *F. tuerckheimii* Standl.

Here, we use a reduced representation genomic approach to study the *Ficus aurea* complex species. First, since there is no phylogenetic hypothesis for the relationships of the species in the section *Americanae*, we tested the phylogenetic

relationships of a pool of species in this section that occur in the northern Neotropics, which exhibit a diverse arrange of morphological traits, and which include the species in the *F. aurea* complex. This allowed us to elucidate the relatedness of morphologically similar species, like the ones in the *F. aurea* complex. Second, we analyzed the phylogenetic relationships within the *F. aurea* complex species using a population sampling approach; we tested the species as delimited by Hernández-Esquivel et al. (2020) and inferred a nearest neighbor haplotype co-ancestry approach to test possible introgression events between the species in the complex.

MATERIALS AND METHODS

Taxonomic sampling

A total of 15 individuals from 13 species in the sect. *Americanae* and the five in the *F. aurea* complex were analyzed to explore interspecific relationships in the sect. *Americanae* of the northerly distributed species in the continent. The two duplicated individuals of two species correspond with *F. pertusa* L., a species also forming a complex, and with *F. crassinervia* Desf. ex Willd. In both species, two morphological variants can be detected within the sampled area (Figure 1, Supplementary Table 1). Two species from the sect. *Pharmacosyceae* were used as outgroups, for a total of 20 species included in this study. To perform phylogenomics and species delimitation tests of the *F. aurea* complex, a total of 73 individuals were analyzed from 21 populations (Figure 1), herbarium specimens collected in each population were deposited in the National Herbarium of Mexico (MEXU), with duplicates to be distributed in other herbaria. One to three leaves per individual were collected in the field, dried in silica gel and stored in hermetic plastic bags. The species assignment to each population of the *F. aurea* complex was based on Hernández-Esquivel et al. (2020).

DNA Extraction and library construction

Around 20 mg of disrupted leaf tissue were used for DNA extraction. The Chemagic DNA Plant kit protocol was used with modifications of the SDS and CTAB buffers for the cell lysis step. Magnetic beads (Perkin Elmer Chemagen CMG-252-A) and the KingFisher Flex™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) automated DNA workstation, were used for the purification step. Detailed information for this protocol is given in Rasplus et al. (2018). The DNA was quantified with a Qubit R 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

The protocol of Baird et al. (2008) and Etter et al. (2011) for RADSeq libraries, with the adaptations of Cruaud et al. (2014) and Rasplus et al. (2018), was followed. Briefly, 250 ng of genomic DNA from every sample was digested using the *Sbf*I-HF restriction enzyme. Ligation consisted in the addition of 1 µl P1 adaptors (100nm) containing the barcodes in sets of 5 and 6 bp. After ligation, pools were made every eight samples. A S220 ultra-sonicator (Covaris, Inc.) was used to shear the ligated DNA and obtain fragments of 300-600 bp (duty cycle 10%, intensity 5, cycles/burst 200, duration 70 s). A gel excision and purification with NucleoSpin Gel and PCR Clean-up columns was performed to isolate the fragments. The subsequent end-repair and 3' A-tailing reactions were purified using AMPure XP beads (Agencourt). After these steps, the P2 adapters were ligated. Two final PCR enrichments of 25 cycles were carried out in nine independent 25 µl reactions using the NEBNext® Ultra II Q5 master mix. The 2*9 reactions were pooled and purified with AMPure beads to conform one library for sequencing. Then, an Agilent Bioanalyzer was used to quantify the libraries. Finally, a 125 nt paired-end sequencing was performed on a HiSeq 2000 at Montpellier GenomiX (MGX), Montpellier, France.



Figure 1. Collection sites of the *F. aurea* species complex and congeners. Red square indicates the Tuxtla Biosphere Reserve collection points (TUXT). Capital letters indicate the populations name of the different species in the complex. *Ficus aurea*: Grecia, Costa Rica (CRGR), Florida (FLOR), Dominican Republic (REDO); Triunfo Biosphere Reserve, Chiapas (TRIU). *Ficus cookii*: Ocozocoautla (OCOZ), Sumidero (SUMI), Chiapas. *Ficus isophlebia*: Acayucan, Veracruz (ACAY); Selva Lacandona, Chiapas (LACA); Nizanda, Oaxaca (NIZA). *Ficus tuerckheimii*: El Cielo, Tamaulipas (CIEL); Coatepec, Veracruz (COAT); Comala, Colima (COMA); San José, Costa Rica (CRSJ); Hueytamalco, Puebla (HUEY); Manantlán, Jalisco (MANT); Neblinas, Querétaro (NEBI); Xilitla, San Luis Potosí (XILI).

Data analysis

Phylogeny of the Ficus aurea complex and congeners. The pearl pipeline RADIS (Cruaud et al., 2016), which relies on Stacks v1.46 (Catchen et al., 2011, 2013), was implemented for demultiplexing data, removing PCR duplicates, building loci, and performing phylogenetic analyses using RAxML (Stamatakis, 2006a; b). The RADIS pipeline aims to process and analyze RADSeq data easy and allows fast phylogenetic analysis.

The data matrix contained a total of 31 accessions representing 20 species: 13 species of the section *Americanae*, the five species in the *F. aurea* complex and two outgroups from the section *Pharmacosyceae*. The demultiplexed and cleaned raw reads were processed to build individual loci with the *ustacks* module. The *ustacks* parameters used were: minimum stack depth $m=3$ (as default), distance (number of different nucleotides) allowed between stacks $M=3$, maximum distance allowed to align secondary reads to the primary stacks $N=4$ (as default $N = M+1$). According to Paris et al. (2017) results, $M=3$ performs well for different biological groups. The construction of catalog of loci was performed with *cstacks* and distance allowed between catalog loci was set to $n=6$, following suggestions to increase this number for deep phylogenetic relationships (Paris et al., 2017).

The *sstacks* module was used to map the individual loci in the catalog. Before running the phylogenetic analyses, the following filters in the catalog of loci were done: 1) samples with a minimum of 100 loci were kept; 2) at least 75% of the individuals that share a unique locus were selected, and 3) loci for which a sample had three or more sequences were removed to discard paralogous copies. A maximum likelihood analysis (ML) was performed with RAxML-HPC (Stamatakis, 2006a; b) for phylogenetic reconstruction. Ultra-fast Bootstrap searches consisted of 100 replicates and the model GTRGAMMA was set.

Phylogenomics within the Ficus aurea complex. In this data set, RADIS was implemented only for the cleaning step. Then, the software Stacks v2 (Rochette et al., 2019) was used for the loci assemblage. The new module gstacks allows the use of reverse reads from paired-end sequencing for de novo RAD locus. In consequence, it generates loci with a length between 400-800 bp (Rochette et al., 2019). The gstacks identify single nucleotide polymorphisms (SNPs), within the meta populations for each locus and then genotype each individual at each identified SNP (Rochette et al., 2019). Then, the ustacks parameters were used as in the dataset above (m3 M3 N4). The cstacks module (distance allowed between catalog loci) was set to $n=4$ following Paris et al. (2017) of $n=M+1$ as a good rule of thumb.

The sstacks module was used to match the catalog against a populations map to determine which progeny contain which parental alleles. The tsv2bam module transpose the data to analyze it by locus, instead of by sample, also it pulls the paired-end reads that are associated with every single-end locus. The gstacks module was run to obtain the final catalog, which contains the consensus sequence for each assembled locus in the data, and the file that contains the genotyping data. Finally, the populations module was run to analyze individual samples to obtain fasta, vcf, SNPs and structure files for subsequent analysis, and to obtain Fst statistics. At this step, the minimum number of populations (species in this case) that a locus must be present to process that locus was set to $p4$; and the minimum percentage of individuals in a species required to process a locus for that species was set to $r0.5$.

A maximum likelihood analysis (ML) was performed with RAxML-VI-HPC (Stamatakis, 2006a; b) in a concatenated data matrix for phylogenetic inference. Only one allele by locus was selected for the analysis and the individuals with more than

50% of missing data were removed. The species *Ficus paraensis* was set as outgroup. Ultra-fast Bootstrap searches consisted of 1000 replicates and the model GTRGAMMA was set.

A species tree was constructed using SVDQuartets (Chifman & Kubatko, 2014) in PAUP* 4.0a168 (Swofford, 2003). This method assumes that every site has its own genealogy under the multispecies coalescent model (Chifman & Kubatko, 2014). The populations vcf output file containing the SNPs data, was converted to nexus format with the Ruby script *convert_vcf_to_nexus.rb* (Matschiner, 2018). Then, the same species, *F. paraensis*, was set as the outgroup; 100 000 random quartets were evaluated under the multispecies coalescent model, as default settings, with 1000 bootstrap replicates. Annotation and edition of the phylogenetic trees was performed in TreeGraph 2.15 (Stöver and Müller, 2010) and FigTree 1.4.2 (Rambaut, 2009).

Species delimitation. A Discriminant Analysis of Principal Components (DAPC; Jombart et al., 2010) was run in the R package 'adegenet' (Jombart, 2008) for species delimitation. This approach has the advantages of not making population genetic assumptions such as Hardy-Weinberg, and that it handles large data sets with low computational cost (Pyron et al., 2016). In this approach, the Bayesian Information Criterion (BIC) is used to detect the appropriate number of groups, and the discriminant analysis to assess the maximum separation among the given groups. For this analysis, the output file containing the allele information in the structure format was used as input. Before running the analysis, individuals with more than 50% of the missing data in the structure output file from the populations module, were removed and populations module from Stacks was run again with the same parameters, which resulted in fewer individuals than in the phylogenetics analyses.

Shared ancestry. The program fineRADstructure was used to infer recent shared ancestry (coalescent ancestry) (Malinsky et al., 2018). The fineRADstructure derives a coancestry matrix as a result of the summary of the nearest neighbor haplotype relationships, finding the closest relatives to each allele (Malinsky et al., 2018). The Stacks2fineRAD.py pipeline was used to convert the haplotypes file derived from the second populations analysis from Stacks, allowing a maximum number of SNPs $n = 10$, and discarding individuals with more than $m=20\%$ of missing data. Then, loci were reordered according to linkage disequilibrium with the sampleLD.R script. The software RADpainter was then used to calculate the coancestry matrix, and the finestructure was run with the clustering algorithm setting 100 000 Markov Chain Monte Carlo replicates and a burning of 1000. A simple tree building algorithm was run with finestructure (Malinsky and Trucchi, 2018); this tree is not intended to reflect the real population history, instead it is illustrative of the population relationships (Malinsky et al., 2018). Finally, to visualize the results, the fineRADstructurePlot.R script was executed. All scripts and pipelines are provided in the same package (<https://cichlid.gurdon.cam.ac.uk/fineRADstructure.html>). All the analyses were performed on the Genotoul Cluster (INRA, France, Toulouse, <http://bioinfo.genotoul.fr/>).

RESULTS

RADSeq data

A total of 2*145 555 150 paired-end raw reads were obtained from the Illumina platform. Phred quality score for the first read was between 28-34 and for the second read was between 16-34. After demultiplexing and clone filtering, a total of 17 682 910 reads were retained. The yield for individual was an average of 138 148 reads. For detailed information of the results per individual, see the Supplementary Table 2.

Phylogenomics of the *Ficus aurea* complex and congeners

The final data matrix consisted of a total length of 117 294 sites distributed in XX RADloci across of 31 accessions representing 20 taxa, bp with 15% of missing data and a proportion of 0.041 parsimony informative sites. The monophyly of the *F. aurea* complex species is highly supported by the concatenated ML analysis (Figure 2). Within the *F. aurea* complex, two well supported clades are shown, the first conformed by *F. aurea s. s.* and the second conformed by the other four species, which relationships are displayed as following: *F. tecolutensis* recovered with strong support as sister to two unsupported clades conformed by *F. isophlebia*, and a clade containing *F. cookii* and *F. tuerckheimii*. The rest of the species in the section *Americanae* used here form a well-supported clade apart, showing that none of these species are the closest relatives to the *F. aurea* complex. The two individuals from *F. crassinervia* utilized for this analysis group together (Figure 1). However, both individuals analyzed from the *F. pertusa* complex are polyphyletic. Finally, *F. petiolaris* was recovered as sister to the rest of the sect. *Americanae* species that were analyzed here.

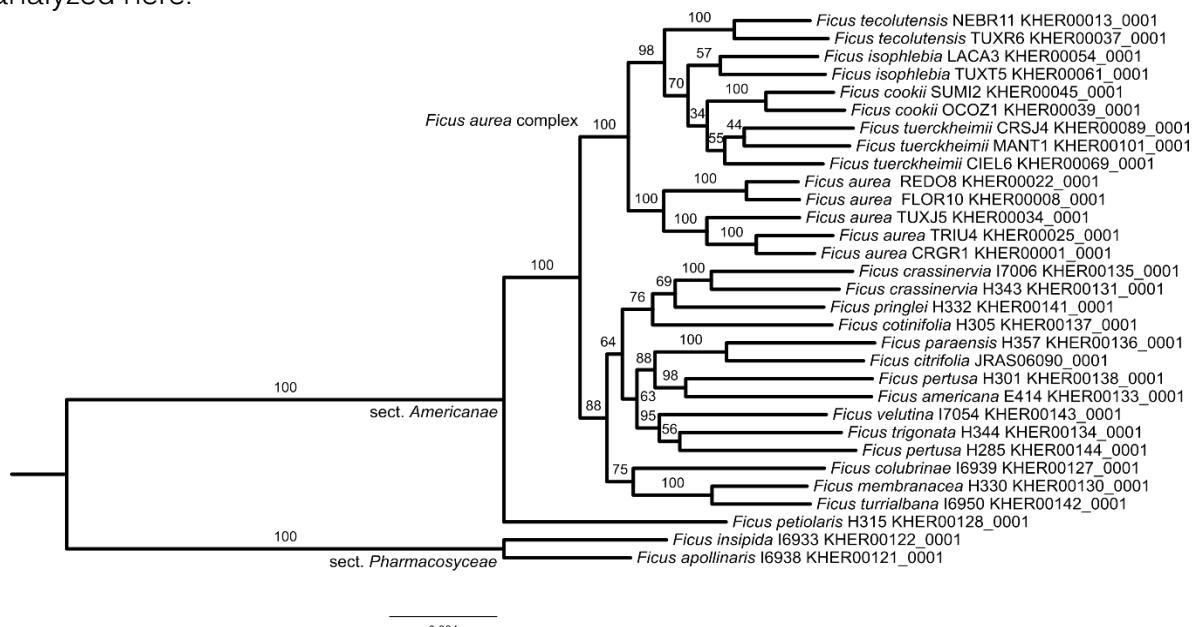


Figure 2. Maximum likelihood tree based on concatenated RADSeq data to test the monophyly of the *Ficus aurea* complex. Bootstrap support is indicated above branches.

Phylogenomics of the *Ficus aurea* complex

The final data matrix consisted of 78 individuals and an alignment length of 856 551 sites distributed in 1570 RADloci (mean length of overlapping loci 545 bp). Detailed statistics of the alignment characteristics per species are in Table 1. All five species in the *F. aurea* species complex are strongly supported as monophyletic. (Figure 3) The species *F. aurea* is highly supported as sister to a clade that contains the other four species, and shows relevant population structure, as populations form strongly supported subclades. *Ficus tecolutensis* is well supported as sister to a clade containing *F. isophlebia*, *F. cookii* and *F. tuerckheimii*, these last two being sister species (Figure 3). The species tree reconstructed with SVDQuartets recovered the same relationships as in the concatenated tree (Figure 4A). Except for the deepest node that splits *F. aurea* from the other four species, the quartet bootstrap support was high.

Species delimitation

A total of 66 individuals and 34,237 sites were analyzed after excluding individuals with more than 50% of missing data. The BIC recovered 7 groups as the optimal number of genetic clusters (Supplementary Figure 1). The DAPC scatterplot shows that none of the groups is overlapping to each other, supporting well differentiated genetic entities (Figure 4B). The species *F. aurea* was split into two groups, one belonging to the populations sampled at Florida and Dominican Republic (Caribbean group, hereafter) (Figure 4B), and the other cluster containing the individuals from the populations of Los Tuxtlas (TUXJ), in Veracruz, The Triunfo Biosphere Reserve, at Chiapas (TRIU) and Costa Rica (CRGR) (continental group, hereafter). As a closest group of the continental group of *F. aurea* is *F. tecolutensis*, although no overlap between both clusters was detected.

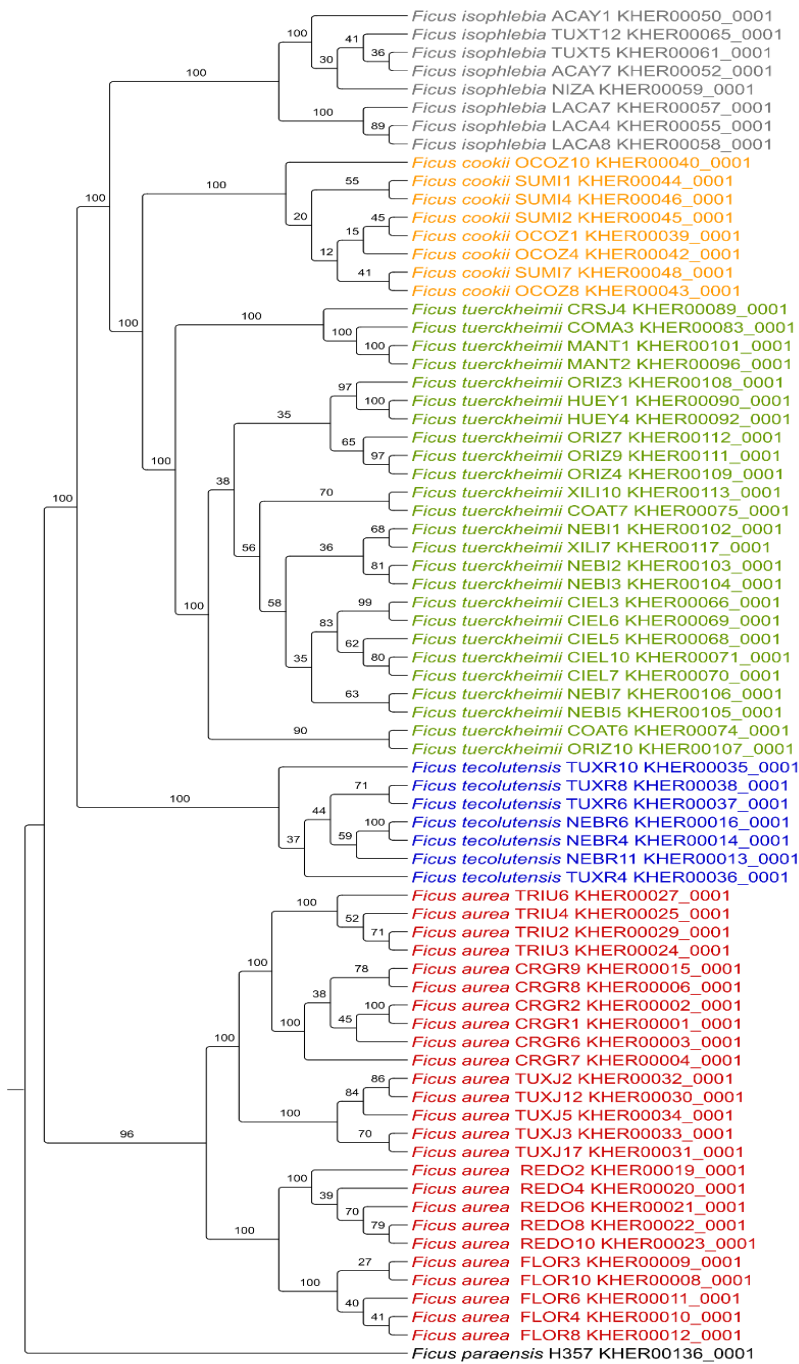


Figure 3. Concatenated tree results from the RaxML analysis for the *Ficus aurea* complex species. Numbers above branches indicate bootstrap support. Colors indicate species as delimited by Hernández-Esquivel et al. (2020).

Table 1. Statistics of the Stacks alignment per species in the *F. aurea* complex. Poly., Polymorphic. Std. Err., standard error. Var., Variance.

Species	N	Total sites	Private sites	Variant Sites	Poly. Sites	Poly. loci %	Var.	Std. Err.
<i>F. aurea</i>	21	791 551	7 731	31 987	14 271	1.80	9.22	0.003
<i>F. tecolutensis</i>	6	781 753	2 295	30257	6 688	0.85	1.02	0.001
<i>F. isophlebia</i>	7	833 504	3 355	33 304	9 228	1.18	0.84	0.001
<i>F. cookii</i>	7	806 172	2 498	30 158	8 105	1.00	0.99	0.001
<i>F. tuerckheimii</i>	22	819 666	4 812	32 074	12 310	1.50	5.72	0.002
<i>Outgroup</i>	1	646 827	1 642	23 213	350	0.05	0	0

A second species whose entire populations are not clustered together was *F. tuerckheimii*, one external group is represented by the individuals sampled in the West of Mexico, Comala (COMA) and Manantlán (MANT) populations, and the largest cluster includes the populations from the Sierra Madre Oriental (COAT, CIEL, HUEY, NEBI, ORIZ, XILI). In the analysis performed here and, in the following, the Costa Rican population of *F. tuerckheimii* was not included in the data set because of its high proportions of missing data, and could not be analyzed. *Ficus cookii* and *F. isophlebia* clusters are the most differentiated species.

Shared co-ancestry

The analysis performed with fineRADstructure consisted of 51 individuals and 139 loci (excluding invariants) kept after filters. The coancestry matrix (Figure 5) shows shared alleles and genetic differentiation among the species in the *F. aurea* complex, and in different gradients. The species *F. aurea* is showing strong population structure, while the populations in *F. tuerckheimii* do not show a structured pattern. The species *F. isophlebia*, *F. cookii* and *F. tuerckheimii* share more alleles between them than with *F. aurea*. The *F. isophlebia* individual from the Lacandona locality is

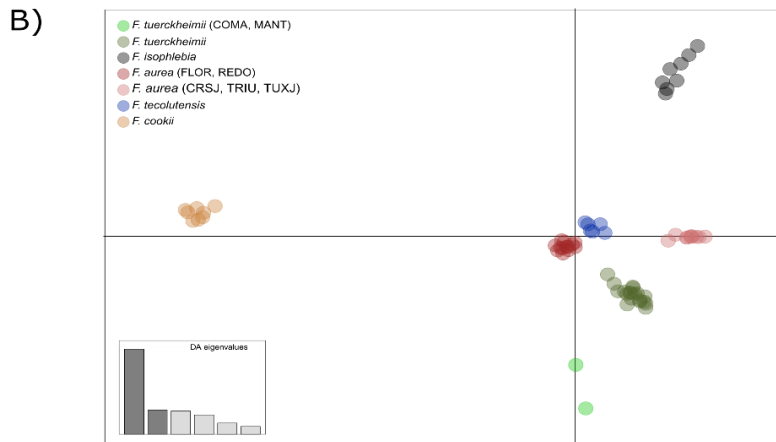
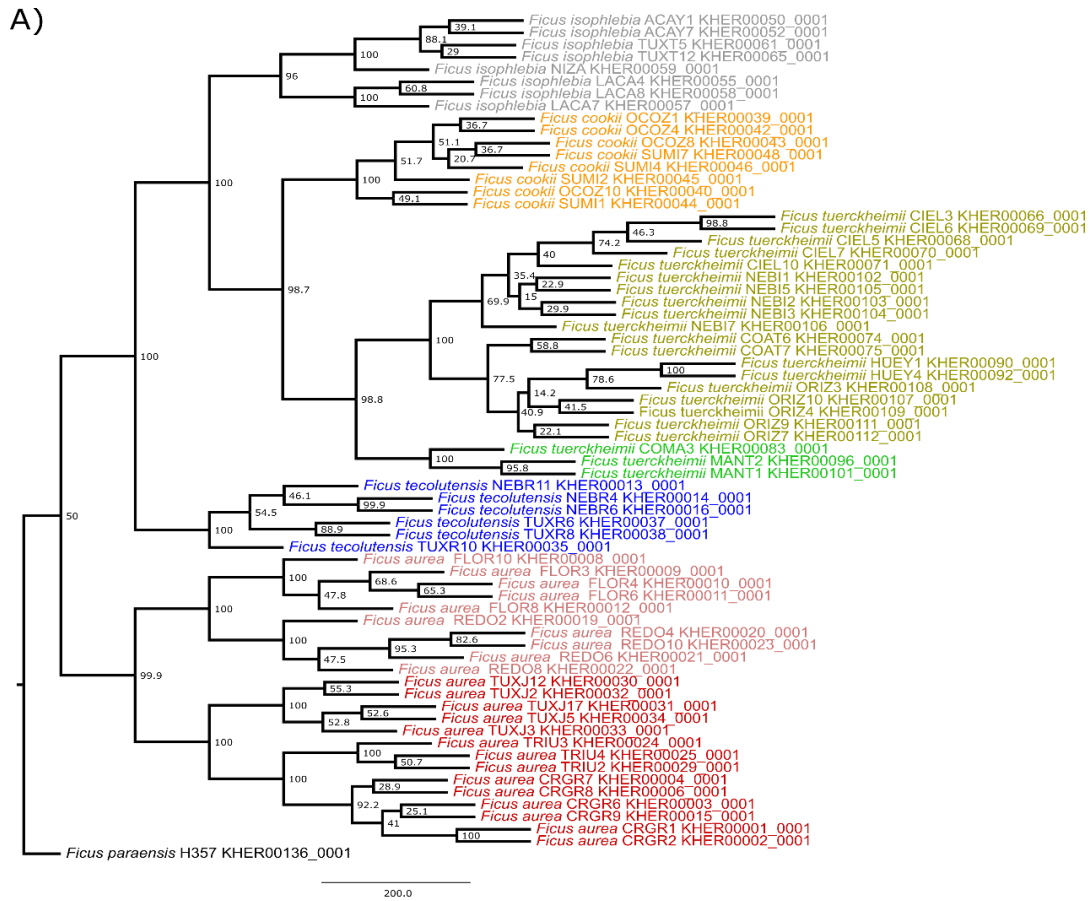


Figure 4. Species tree and species delimitation test of the *Ficus aurea* complex species. A) SVDQuartets species tree, numbers at the nodes indicate bootstrap support. B) Scatterplot with the results of the DAPC, the plot indicates the eigen values contribution. Colors in both figures are according to the clusters recovered by the DAPC analysis.

the only one displaying higher levels of shared alleles coming from *F. tecolutensis* and *F. cookii*. The overall pattern of moderate genetic differentiation among species coincides with the paired Fst values reported from the Populations module analysis (Table 2). The highest differentiation is found between *F. tecolutensis* with *F. isophlebia* and *F. cookii*. The least differentiated pair of species is *F. cookii* with *F. tuerckheimii*.

Table 2. Pairwise comparison of genetic differentiation (Fst), among species in the *Ficus aurea* complex based on 34 237 variant sites.

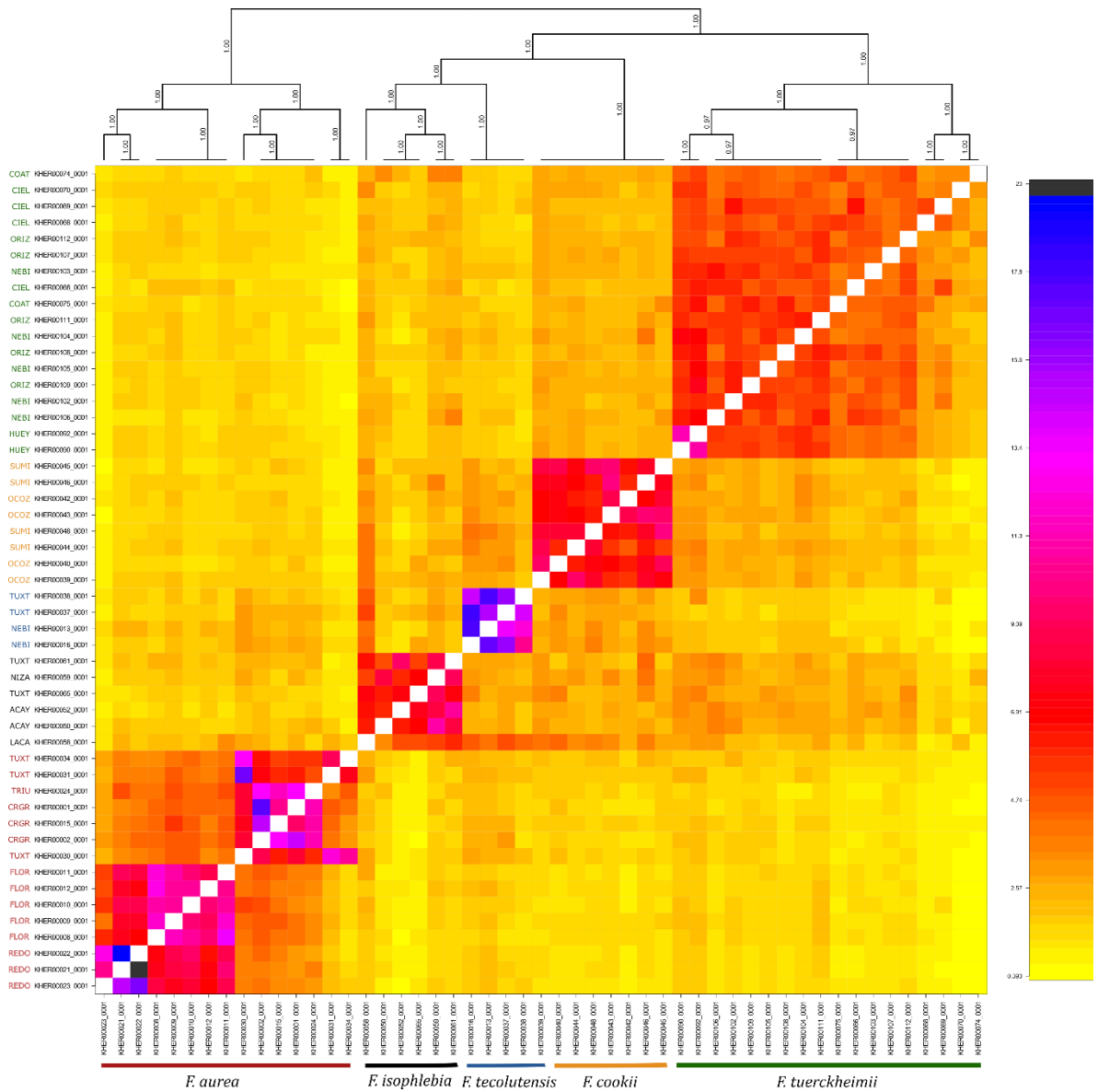
Fst	<i>F. aurea</i>	<i>F. tecolutensis</i>	<i>F. isophlebia</i>	<i>F. cookii</i>	<i>F. tuerckheimii</i>
<i>F. aurea</i>	*	0.142506	0.162513	0.148738	0.158978
<i>F. tecolutensis</i>		*	0.216309	0.203493	0.17281
<i>F. isophlebia</i>			*	0.155049	0.130682
<i>F. cookii</i>				*	0.123556

DISCUSSION

Phylogenomics of the *Ficus aurea* complex and congeners

The conflicting classification of *F. aurea* and related species predated at least six decades, starting with DeWolf (1960) and continued by Berg (1989 and 2007). The morphological similarity, specifically the size of the basal bracts of the syconium (Hernández-Esquivel et al., 2020), was the guide to comprise several species in one: *F. aurea*. In this work, we confirm that the *F. aurea* species complex is a clade composed of five reciprocally monophyletic closely related species, in relation with the set of congeners in the sect. *Americanae* analyzed here. It is still unclear which is the closest group of the *F. aurea* complex, since this phylogeny (Figure 2) includes only a fraction of the total species present in the section (20/100).

When studies in the *Ficus* community of Panama have analyzed phylogenetic relationships using multiple individuals per species and sanger sequencing, most of the species have been recovered as polyphyletic (Jackson et al., 2008). Thus, it has been suggested this as signals of strong hybridization between fig species that are in sympatry and morphologically distinct. Our results from the phylogenetic analysis of the *F. aurea* species complex and their congeners show that, the individuals in this



complex cluster together despite including sympatric congeners (Figure 1), as exemplified by accessions from Los Tuxtlas Reserve (TUXT),

Figure 5. Coancestry matrix of the species in the *Ficus aurea* complex, constructed with fineRADstructure. The strongest similitude is in black, the lowest similitude is in yellow.

where *F. isophlebia*, *F. aurea* and *F. tecolutensis* coexist with *F. americanae*, *F. colubrinae* and *F. pertusa* (Figure 2). These results could be indicative that introgression in fig communities could be the result of different processes depending on the community assemblage, or that hybridization can be less pronounced in morphologically distinct species. Another explanation could be that hybridization can be present at lower levels when genomic data are included, and importantly, that many of the species need taxonomical revisions. For example, the two individuals of *F. pertusa* sampled in our phylogeny, were not recovered as each other closest relatives, as in past phylogenies happened (*e. g.* Jackson et al., 2008). However, it is important to keep in mind that this complex comprises more than 30 synonyms, with a distribution extending from Mexico to Brazil (Berg, 2007). We therefore emphasize that largescale studies are desirable to accurately analyze the taxonomic units within a complex (Hernández-Esquivel et al., 2020).

Another example is the clade containing *F. cotinifolia*, *F. crassinervia* and *F. pringlei*, for the first time, recovered together in a phylogeny, are showing that their relationships agree with their morphological similarities, such as chartaceous leaves, dense pubescence and protruding veins in the abaxial side. These species did not cluster in clades with their sympatric congeners, another indication that hybridization can be lower in distantly related species than thought before.

Improvements to analyze the phylogeny of the sect. *Americanae* are still needed. However, we confirmed *F. petiolaris* as sister of the sect. *Americanae* species, which has been a recent finding across different study groups that have analyzed genomic data in this section (J. Nason, comm. pers.). As mentioned above, this phylogeny is limited by the extent of the sampling of the species in the sect.

Americanae, an ideal phylogenetic framework would be comprising the species distributed along the continent and sampled along their distributions.

Phylogenomics within the *Ficus aurea* complex

The results of the phylogenomic analyses show that species in the *F. aurea* complex as delimited in Hernández-Esquivel et al. (2020) represent reciprocally monophyletic groups. Both, concatenated and species tree analyses recovered the monophyly of the species with high support values (Figure 3 and 4A).

It is interesting that *F. tecolutensis* did not result the sister species of *F. aurea*, since they display similar syconium traits, the eccentric attachment of the receptacle to the branch and the arrangement of the external ostiole bracts. (Hernández-Esquivel et al., 2020). The close relationships of *F. isophlebia*, *F. cookii* and *F. tuerckheimii* agrees with their morphological traits. For example, these species exhibit leaves frequently with cordate base, the presence of a base or disc that holds the receptacle, and proportionally larger basal bracts of the syconium (Hernández-Esquivel et al., 2020). Likewise, when individuals of these three species are observed in young states in the field or the younger branches of the adult trees, leaf shape tends to be similar among them.

Species delimitation

The species delimitation analysis recovered seven groups that are well differentiated according to the discriminant analysis (Figure 4B). This result agrees with the deep branch dividing both groups in two different clades in the phylogenetic analyses (Figure 3, 4A). Berg (2007) mentioned that Caribbean individuals were the least conflicting to separate among the whole variation of the *F. aurea* complex. In the continent, this species was described by Standley (1917) as *F. jimenezii*. However,

morphological differences between what it is called *F. jimenezii* and *F. aurea* are scarce (Hernández-Esquivel et al., 2020). William Ramírez (com. pers.) mentioned that he grew up *F. aurea* from Florida in his yard in Costa Rica, where continental *F. aurea* occurs; the individual from Florida kept the same appearance of the Caribbean individuals, however, it is not clear what the differences between the two groups are. In addition, he commented that the tree was never visited by pollinating fig wasps, which would imply a reproductive barrier between the two clades. This result is consistent with the phylogenetic analysis of the fig wasps present in the *F. aurea* complex (Vazquez-Quintana, 2019; Hernández-Esquivel, this dissertation, chapter IV), which resulted in genetically distinct fig wasps associated to different populations of *F. aurea*. In the light of this evidence, the taxonomic status of *F. aurea* needs to be reexamined.

The second split that resulted from the species delimitation test, was the Western populations of *F. tuerckheimii*, Comala (COMA) and Manantlán (MANT), separated from the rest of their conspecifics (Figure 4B). These two populations were recovered in a clade sister to the rest of *F. tuerckheimii* in the species tree (Figure 4A). However, in the concatenated tree, they were clustered with the sample from Costa Rica (CRSJ); because of the high quantities of missing data, this last sample was excluded from the species tree and the rest of the analyses.

Despite that Comala and Manantlán populations were also removed in the co-ancestry matrix because missing data in the haplotype dataset, there might be enough evidence to suggest that these populations represent a distinct taxonomic entity. In Hernández-Esquivel et al. (2020), the morphometric tests evidenced these populations present smaller fig size respect to the rest of the populations in *F. tuerckheimii*. Also, taxonomic descriptions indicate that they are the only populations across the entire *F. aurea* complex with pubescence in syconia and leaves. Our

results thus indicate that re-analyzing morphological data to test for significant differences is necessary.

Shared ancestry

The coancestry matrix (Figure 5) showed strong population structure within *F. aurea*, and an elevated frequency of shared alleles between the two clusters of populations, Caribbean and continent. The structured pattern between the two clades in *F. aurea* (Figure 2) suggests some barrier to free gene flow between them. It can be hypothesized that separation of the two clades has been reinforced because of the patterns of seed dispersal by birds. The migration routes followed by some of the New World birds can be either terrestrial or transoceanic, from North, North West to South, South East and vice versa, but no bird migration East to West has been documented (la Sorte et al., 2016). No population structure was detected within the species *F. isophlebia*, *F. cookii*, *F. tecolutensis* and *F. tuerckheimii*, however, allele sharing between the four species was evidenced.

The results here can be compared with the results in Souto-Villarós et al. (2019), who analyzed a group of closely related *Ficus* in the subgenus *Sycomorus* (Gasp.) Miq. section *Papuasyce*. These authors concluded that figs can display different gradations of the speciation continuum, from fully diverged to weakly separated species. When they compared the coancestry matrix of figs with the ones from the fig wasps, it is evidenced that the faster speciation of the fig wasps can play an important role in the population structure and eventual divergence of *Ficus* (Souto-Villarós, 2019).

The values of genetic differentiation F_{st} , in the *F. aurea* species complex, ranging from 0.12 to 0.21, are comparable to the values obtained from the *F. itoana* species complex, subg. *Sycomorus* which was also analyzed through a RADSeq

approach (Souto-Villarós et al., 2019), its F_{st} values ranges from 0.16 to 0.34 among the three putative species that they recognize. The authors of that study found the lowest differentiation between two closely related species, which display differences in morphology and breeding system, results also coincident with the patterns displayed in the *F. aurea* species complex in this study. The low genetic differentiation can be associated with the shared alleles between the species in the *F. aurea* complex, and the presence of some hybrid individuals; as it was also shown by the study of the *F. itoana* complex (Souto-Villarós et al., 2019). Strong population assumptions are difficult to infer with the sampling size for most of the species analyzed here. Specifically, for *F. isophlebia*, *F. cookii*, and *F. tecolutensis*; particularly, this last species is known from very few collection sites (Figure 1) and their presence is scattered, which would make it difficult to perform solid population genetic analysis.

CONCLUSIONS

This is the first study to date that uses a genomic approach to analyze phylogenetic and intraspecific patterns of diversity in a group of figs of the section *Americanae*. We demonstrate, for the first time, that species in the *F. aurea* complex are closely related yet reciprocally monophyletic species. These species can be accurately delimited with genomic data despite having shared alleles in their recent past. These results reveal the existence of more species diversity than what was found in analyses with morphometric data. Thus, this study provides evidence that the diversification of *Ficus* in the Neotropics has been underestimated and misunderstood for a long time.

REFERENCES

- Baird, N. A., P. D. Etter, T. S. Atwood, M. C. Currey, A. L. Shiver, Z. A. Lewis, E. U. Selker, et al. 2008. Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. *PLoS ONE* 3: e3376.
- Berg, C. C. 1989. Classification and distribution of *Ficus*. *Experientia* 45: 605–611.
- Berg, C. C. 2007. Proposals for treating four species complexes in *Ficus* subgenus *Urostigma* section *Americanae* (Moraceae). *Blumea - Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants* 52: 295–312.
- Berg, C. C., and E. J. H. Corner. 2005. Moraceae (*Ficus*). *Flora Malesiana*, ser. 1 17 (2): 1–702.
- Boucher, F. C., G. Casazza, P. Szövényi, and E. Conti. 2016. Sequence capture using RAD probes clarifies phylogenetic relationships and species boundaries in *Primula* sect. *Auricula*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 104: 60–72.
- Catchen, J., P. A. Hohenlohe, S. Bassham, A. Amores, and W. A. Cresko. 2013. Stacks: An analysis tool set for population genomics. *Molecular Ecology* 22: 3124–3140.
- Catchen, J. M., A. Amores, P. Hohenlohe, W. Cresko, and J. H. Postlethwait. 2011. Stacks: Building and genotyping loci de novo from short-read sequences. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 1: 171–182.
- Chifman, J., and L. Kubatko. 2014. Quartet Inference from SNP data under the coalescent Model. *Bioinformatics* 30: 3317–3324.
- Cook, J. M., and J.-Y. Rasplus. 2003. Mutualists with attitude: Coevolving fig wasps and figs. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 241–248.
- Cruaud, A., Ronsted, N., Chantarasuwan, B., Chou, L. S., Clement, W. L., Couloux, A., Cousins, B., Genson, G., Harrison, R. D., Hanson, P. E., Hossaert-Mckey, M., Jabbour-Zahab, R., Jouselin, E., Kerdelhué, C., Kjellberg, F., Lopez-Vaamonde,

- C., Peebles, J., Peng, Y. Q., Santinelo Pereira, R. A., ... Savolainen, V. 2012. An extreme case of plant-insect codiversification: figs and fig-pollinating wasps. *Systematic Biology* 61: 1029–1047.
- Cruaud, A., M. Gautier, M. Galan, J. Foucaud, L. Sauné, G. Genson, E. Dubois, et al. 2014. Empirical Assessment of RAD Sequencing for Interspecific Phylogeny. *Molecular Biology and Evolution* 31: 1272–1274.
- Cruaud, A., M. Gautier, J.-P. Rossi, J.-Y. Rasplus, and J. Gouzy. 2016. RADIS: analysis of RAD-seq data for interspecific phylogeny. *Bioinformatics* 32: 3027–3028.
- Cruaud, A., and J.-Y Rasplus. 2016. Testing cospeciation through large-scale cophylogenetic studies. *Current Opinion in Insect Science*, 18, 53–59.
- DeWolf, G. P. 1960. Moraceae. In R. E. Woodson, and R. W. Schery [eds.], *Flora of Panama*, 146–165. Annals of the Missouri Botanical Garden.
- Dodsworth, S. 2015. Genome skimming for next-generation biodiversity analysis. *Trends in Plant Science* 20: 525–527.
- Etter, P. D., J. L. Preston, S. Bassham, W. A. Cresko, and E. A. Johnson. 2011. Local de novo assembly of rad paired-end contigs using short sequencing reads. *PLoS ONE* 6: e18561.
- González, J. 2007. Moraceae. In B. E. Hammel, C. Grayum, C. Herrera, and N. Zamora [eds.], *Manual de plantas de Costa Rica*, 635–675. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden.
- Harrison, R. D. 2005. Figs and the Diversity of Tropical Rainforests. *BioScience* 55: 1053–1064.
- Hernández-Esquivel, K. B., E. M. Piedra-Malagón, G. Cornejo-Tenorio, L. Mendoza-Cuenca, A. González-Rodríguez, E. Ruiz-Sánchez, and G. Ibarra-Manríquez. 2020. Unraveling the extreme morphological variation in the neotropical *Ficus*

- aurea* complex (subg. *Spherosuke*, sect. *Americanae*, Moraceae). *Journal of Systematics and Evolution* 58: 1-19.
- Ibarra-Manríquez, G., G. Cornejo-Tenorio, N. González-Castañeda, and E. M. Piedra-Malagón. 2012. El género *Ficus* L. (Moraceae) en México. *Botanical Sciences* 90: 389–452.
- Jackson, A. P., C. A. Machado, N. Robbins, and E. A. Herre. 2008. Multi-locus phylogenetic analysis of neotropical figs does not support co-speciation with the pollinators : The importance of systematic scale in fig/wasp cophylogenetic studies. *Symbiosis* 45: 1–16.
- Jombart, T. 2008. adegenet: A R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics* 24: 1403-1405.
- Jombart, T., S. Devillard, and F. Balloux. 2010. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics* 11: 94.
- la Sorte, F. A., D. Fink, W. M. Hochachka, and S Kelling. 2016. Convergence of broad-scale migration strategies in terrestrial birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 283.
- Lomáscolo, S. B., D. J. Levey, R. T. Kimball, B. M. Bolker, and H. T. Alborn. 2010. Dispersers shape fruit diversity in *Ficus* (Moraceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 14668–14672.
- Malinsky, M. and E. Trucchi. 2018. fineRADstructure activity.
<http://evomics.org/learning/population-and-speciation-genomics/2018-population-and-speciation-genomics/>.

- Malinsky, M., E. Trucchi, D. J. Lawson, and D. Falush. 2018. RADpainter and fineRADstructure: Population Inference from RADseq Data. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1284–1290.
- Matschiner, T. (2018). Convert_vcf_to_nexus.rb. GitHub repository, https://github.com/mmatschiner/tutorials/blob/master/species_tree_inference_with_snp_data/.
- McKey, D. 1989. Population biology of figs: Applications for conservation. *Experientia* 45: 661–673.
- Nicotra, A. B., C. Chong, J. G. Bragg, C. R. Ong, N. C. Aitken, A. Chuah, B. Lepschi, and J. O. Borevitz. 2016. Population and phylogenomic decomposition via genotyping-by-sequencing in Australian Pelargonium. *Molecular Ecology* 25: 2000–2014.
- Paris, J. R., Stevens, J. R., and Catchen, J. M. (2017). Lost in parameter space: a road map for stacks. *Methods in Ecology and Evolution* 8: 1360–1373.
- Pyron, R. A., F. W. Hsieh, A. R. Lemmon, E. M. Lemmon, and C. R. Hendry. 2016. Integrating phylogenomic and morphological data to assess candidate species-delimitation models in brown and red-bellied snakes (Storeria). *Zoological Journal of the Linnean Society* 177: 937–949.
- Rambaut, A., 2009. FigTree. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rasplus, J.-Y., L. J. Rodriguez, C. Tollon-Cordet, and A. Cruaud. 2018. Revisiting the phylogeny of *Ficus* (Moraceae): when next generation Sequencing corroborates past generation botanists. bioRxiv: 1–13.
- Rochette, N. C., Rivera-Colón, A. G., and Catchen, J. M. 2019. Stacks 2: Analytical methods for paired-end sequencing improve RADseq-based population genomics. *Molecular Ecology*, 28(21), 4737–4754.

- Rønsted, N., G. D. Weiblen, J. M. Cook, N. Salamin, C. Machado, and V. Savolainen. 2005. 60 Million Years of Co-Divergence in the Fig-Wasp Symbiosis. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society* 272: 2593–2599.
- Shanahan, M., S. So, S. G. Compton, and R. Corlett. 2001. Fig-eating by vertebrate frugivores: a global review. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 76: 529–572.
- Souto-Vilarós, D., A. Machac, J. Michalek, C. T. Darwell, M. Sisol, T. Kuyaiva, ... S. T. Segar. 2019. Faster speciation of fig-wasps than their host figs leads to decoupled speciation dynamics: Snapshots across the speciation continuum. *Molecular Ecology* 28: 3958–3976.
- Stamatakis, A. 2006a. Phylogenetic models of rate heterogeneity: A high performance computing perspective. 20th International Parallel and Distributed Processing Symposium, IPDPS 2006, IEEE Computer Society.
- Stamatakis, A. 2006b. RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688–2690.
- Standley, P. C. 1917. The Mexican and Central American species of *Ficus*. *Contributions from the United States National Herbarium* 20: 37.
- Stöver, B. C., & Müller, K. F. (2010). TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC Bioinformatics* 11: 7.
- Swofford, D. L. 2003. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Todzia, C. A. 2001. *Ficus* (Moraceae). In O. M. Stevens, W. D., Ulloa, C., Pool, A., Montiel [ed.], *Flora de Nicaragua, 1520–1533*. Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden.

Ulloa, C. U., P. Acevedo-Rodríguez, S. Beck, M. J. Belgrano, R. Bernal, P. E. Berry, L. Brako, et al. 2017. An integrated assessment of the vascular plant species of the Americas. *Science* 358: 1–5.

Vázquez-Quintana, P. (2019). Relaciones filogenéticas y patrones de diversificación de las avispas polinizadoras del complejo *Ficus aurea*. Bachelor these. Universidad Nacional Autónoma de México.

Supplementary Table 1. Specimen information and sampling localities. CR, Costa Rica; DR, Dominican Republic, MX, Mexico; USA, United States of America. E, Ivan Ek; H, Karen Hernández-Esquível; I, Guillermo Ibarra-Manríquez; J, Brett Jestrow. Vouchers of I, H and E deposited in MEXU; J, deposited in FTG.

Species/ Populations	N	Locality	Voucher
<i>F. aurea</i> complex			
<i>F. aurea</i>			
CRGR	6	CR, Alajuela, Grecia,	I-7160
FLOR	7	USA, Florida, Coral Gables	J-2015-FTG-66
REDO	6	DR, Puerto Plata, Sosúa	H-341
TRIU	4	MX, Chiapas, Triunfo BR	I-7047
TUXJ	6	MX, Veracruz, Tuxtlas BR	H-348
<i>F. cookii</i>			
OCOZ	4	MX, Chiapas, Ocozocoautla	H-349
SUMI	4	MX, Chiapas, Sumidero Canyon	H-346
<i>F. isophlebia</i>			
ACAY	2	MX, Veracruz, Acayucan	H-345
LACA	3	MX, Chiapas, Lacandona	I-7005
TUXT	2	MX, Veracruz, Tuxtlas BR	H-288
NIZA	1	MX, Oaxaca, Juchitán	
<i>F. tecolutensis</i>			
NEBR	3	MX, Querétaro, Neblinas	I-7080
TUXR	4	MX, Veracruz, Tuxtlas BR	H-347

Species/ Populations	N	Locality	Voucher
<i>F. tuerckheimii</i>			
CIEL	5	MX, Tamaulipas, Cielo BR	H-298
COAT	2	MX, Veracruz, Coatepec	H-295
COMA	1	MX, Colima, Comala	H-325
CRSJ	1	CR, San José, San José	I-7162
HUEY	2	MX, Puebla, Hueytamalco	I-6949
MANT	2	MX, Jalisco, Manantlán	H-318
NEBI	5	MX, Landa, Querétaro	I-7080
ORIZ	5	MX, Veracruz, Orizaba	H-351
XILI	2	MX, San Luis Potosí, Xilitla	H-308
Congeners sect. <i>Americanae</i>			
<i>F. americana</i>	1	MX, Veracruz, Tuxtlas BR	E-414
<i>F. citrifolia</i>	1	Florida, USA	JRAS06090_001
<i>F. colubrinae</i>	1	MX, Veracruz, Tuxtlas BR	I-6939
<i>F. cotinifolia</i>	1	MX, Tamaulipas, Gómez Farías	H-305
<i>F. crassinervia</i>	1	MX, Chiapas, Mapastepec	I-7006
	1	DR, Puerto Plata, Sosúa	H-343
<i>F. membranacea</i>	1	MX, Nayarit, San Blas	H-330
<i>F. paraensis</i>	1	MX, Veracruz, Tuxtlas BR	H-357
<i>F. pertusa</i>	1	MX, Veracruz, Tuxtlas BR	H-285
	1	MX, Tamaulipas, El Cielo	H-301
<i>F. petiolaris</i>	1	MX, Jalisco, Tecolotlan	H-315
<i>F. pringlei</i>	1	MX, Jalisco, Zapopan	H-332
<i>F. trigonata</i>	1	RD, Puerto Plata	H-344
<i>F. turrialbana</i>	1	MX, Puebla, Hueytamalco	I-6950
sect. <i>Pharmacosycea</i>			
<i>F. apollinaris</i>	1	MX, Veracruz, Tuxtlas BR	I-6933
<i>F. insipida</i>	1	MX, Veracruz, Tuxtlas BR	I-6938

Supplementary Table 2. Sample statistics after cleaning step in Stacks.

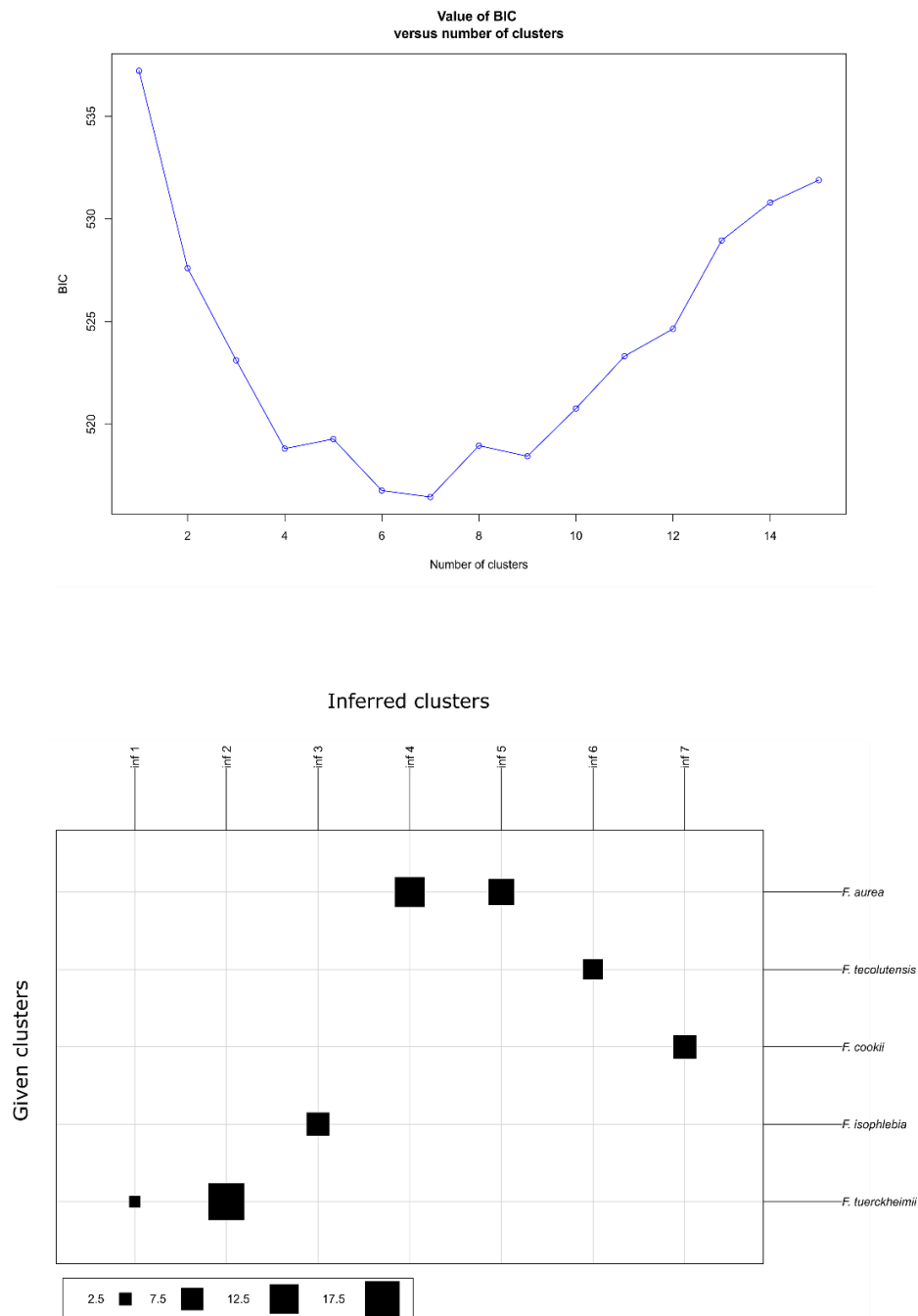
Sample code*	Species	Population ID	Purified reads	Clones	Seq. depth
KHER00001	<i>F. aurea</i>	CRGR1	101315	16266	17.8227
KHER00002	<i>F. aurea</i>	CRGR2	220476	54686	27.2387
KHER00003	<i>F. aurea</i>	CRGR6	69502	18468	10.8751
KHER00004	<i>F. aurea</i>	CRGR7	181119	54194	5.58631
KHER00006	<i>F. aurea</i>	CRGR8	68046	24858	5.96173
KHER00008	<i>F. aurea</i>	FLOR10	140803	31886	38.2395
KHER00009	<i>F. aurea</i>	FLOR3	216148	39712	53.2616
KHER00010	<i>F. aurea</i>	FLOR4	108384	12875	29.4117
KHER00011	<i>F. aurea</i>	FLOR6	314635	81417	58.4859
KHER00012	<i>F. aurea</i>	FLOR8	141619	64171	19.7742
KHER00013	<i>F. tecolutensis</i>	NEBI11	240650	57710	26.4782
KHER00014	<i>F. tecolutensis</i>	NEBI4	55157	10973	6.76921
KHER00015	<i>F. aurea</i>	CRGR9	93844	14453	18.9816
KHER00016	<i>F. tecolutensis</i>	NEBI6	288463	56835	8.96298
KHER00019	<i>F. aurea</i>	REDO2	584140	200379	97.4544
KHER00020	<i>F. aurea</i>	REDO4	583176	198155	127.16
KHER00021	<i>F. aurea</i>	REDO6	118750	24578	33.9292
KHER00022	<i>F. aurea</i>	REDO8	205348	62205	49.2314
KHER00023	<i>F. aurea</i>	REDO10	156317	74428	11.0536
KHER00024	<i>F. aurea</i>	TRIU3	176776	56236	7.22827
KHER00025	<i>F. aurea</i>	TRIU4	297461	78245	5.88008
KHER00027	<i>F. aurea</i>	TRIU6	88907	15776	5.76621
KHER00029	<i>F. aurea</i>	TRIU2	460194	256169	6.00192
KHER00030	<i>F. aurea</i>	TUXT12	132975	41278	17.0914
KHER00031	<i>F. aurea</i>	TUXT17	55628	15212	7.90556
KHER00032	<i>F. aurea</i>	TUXT2	30739	5756	8.03678
KHER00033	<i>F. aurea</i>	TUXT3	58446	17379	10.807
KHER00034	<i>F. aurea</i>	TUXT5	37372	11548	8.37283
KHER00035	<i>F. tecolutensis</i>	TUXT10	40703	10476	6.37085
KHER00036	<i>F. tecolutensis</i>	TUXT4	51802	24271	14.6697
KHER00037	<i>F. tecolutensis</i>	TUXT6	298687	149487	11.3821
KHER00038	<i>F. tecolutensis</i>	TUXT8	209179	94346	10.3411
KHER00039	<i>F. cookii</i>	OCOZ1	92680	27914	13.7675
KHER00040	<i>F. cookii</i>	OCOZ10	80368	14250	16.7496

Sample code*	Species	Population ID	Purified reads	Clones	Seq. depth
KHER00042	<i>F. cookii</i>	OCOZ4	125231	44689	9.98263
KHER00043	<i>F. cookii</i>	OCOZ8	235289	107625	22.8722
KHER00044	<i>F. cookii</i>	SUMI1	132544	62259	35.6396
KHER00045	<i>F. cookii</i>	SUMI2	128530	59262	33.9542
KHER00046	<i>F. cookii</i>	SUMI4	96412	26624	28.8698
KHER00048	<i>F. cookii</i>	SUMI7	120392	53215	32.8107
KHER00050	<i>F. isophlebia</i>	ACAY1	56734	19779	14.5842
KHER00052	<i>F. isophlebia</i>	ACAY7	28784	7466	9.37738
KHER00055	<i>F. isophlebia</i>	LACA4	154043	61915	10.561
KHER00057	<i>F. isophlebia</i>	LACA7	56662	19601	15.5548
KHER00058	<i>F. isophlebia</i>	LACA8	241933	90948	34.8155
KHER00059	<i>F. isophlebia</i>	NIZA	161737	74067	14.5734
KHER00061	<i>F. isophlebia</i>	TUXT5	157042	102298	33.4619
KHER00065	<i>F. isophlebia</i>	TUXT12	99024	35192	6.56429
KHER00066	<i>F. tuerckheimii</i>	CIEL3	227907	146078	25.8944
KHER00068	<i>F. tuerckheimii</i>	CIEL5	104755	65491	24.0704
KHER00069	<i>F. tuerckheimii</i>	CIEL6	92499	58179	22.585
KHER00070	<i>F. tuerckheimii</i>	CIEL7	88979	50595	10.6126
KHER00071	<i>F. tuerckheimii</i>	CIEL10	204934	107396	5.87454
KHER00074	<i>F. tuerckheimii</i>	COAT6	125706	86479	13.3021
KHER00075	<i>F. tuerckheimii</i>	COAT7	179075	103479	23.1705
KHER00083	<i>F. tuerckheimii</i>	COMA3	201778	68047	5.1608
KHER00089	<i>F. tuerckheimii</i>	CRSJ4	29911	13662	8.13142
KHER00090	<i>F. tuerckheimii</i>	HUEY1	166158	41306	35.2268
KHER00092	<i>F. tuerckheimii</i>	HUEY4	253575	91602	36.9617
KHER00096	<i>F. tuerckheimii</i>	MANT2	443065	199933	6.40198
KHER00101	<i>F. tuerckheimii</i>	MANT1	129303	47297	4.55271
KHER00102	<i>F. tuerckheimii</i>	NEB1	130336	38589	16.7946
KHER00103	<i>F. tuerckheimii</i>	NEB2	60564	11278	12.3394
KHER00104	<i>F. tuerckheimii</i>	NEB3	322575	133808	8.24066
KHER00105	<i>F. tuerckheimii</i>	NEB5	215103	83167	8.50086
KHER00106	<i>F. tuerckheimii</i>	NEB7	176510	55982	8.1186
KHER00107	<i>F. tuerckheimii</i>	ORIZ10	49474	11704	14.3528
KHER00108	<i>F. tuerckheimii</i>	ORIZ3	130875	38112	13.5946
KHER00109	<i>F. tuerckheimii</i>	ORIZ4	129274	35754	29.1102
KHER00111	<i>F. tuerckheimii</i>	ORIZ9	389624	161152	8.89101
KHER00112	<i>F. tuerckheimii</i>	ORIZ7	189694	96267	8.23184

Sample code*	Species	Population ID	Purified reads	Clones	Seq. depth
KHER00113	<i>F. tuerckheimii</i>	XILI10	28335	12820	7.245
KHER00117	<i>F. tuerckheimii</i>	XILI7	39177	17242	5.74918
KHER00121	<i>F. apollinaris</i>	I-6933	125333	30127	27.3407
KHER00122	<i>F. insipida</i>	I-6938	241202	105652	63.2663
KHER00127	<i>F. colubrinae</i>	I-6939	90657	43166	9.24261
KHER00128	<i>F. petiolaris</i>	H-315	198523	85574	49.6532
KHER00130	<i>F. membranacea</i>	H-330	76885	32132	18.8338
KHER00131	<i>F. crassinervia</i>	H-343	49560	14226	13.2822
KHER00133	<i>F. americana</i>	E-414	125199	53887	9.81136
KHER00134	<i>F. trigonata</i>	H-344	228144	100667	30.1203
KHER00135	<i>F. crassinervia</i>	I-7006	83916	33928	21.2628
KHER00136	<i>F. paraensis</i>	H-357	39171	9405	7.46512
KHER00137	<i>F. cotinifolia</i>	H-305	240811	111099	8.68261
KHER00138	<i>F. pertusa</i>	H-301	230061	93981	41.9161
KHER00141	<i>F. pringlei</i>	H-332	52991	11578	15.2828
KHER00142	<i>F. turrialbana</i>	I-6950	144957	59132	24.0148
KHER00143	<i>F. velutina</i>	I-7054	292116	138363	6.45152
KHER00144	<i>F. pertusa</i>	H-285	123730	49968	6.09985
JRAS06090	<i>F. citrifolia</i>	NA	NA	NA	49.561

*Complete code includes “_0001” in every sample.

Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 1. Bayesian Information Criterion results. A) Plot of the number of clusters tested for the lowest BIC. B) Assignment plot with the given clusters in rows and inferred clusters with the BIC in columns. Square size indicates proportion of individuals.

CAPÍTULO IV



Avispas polinizadoras del género *Pegoscapus* sp., polinizadoras de *Ficus isophlebia* (Los Tuxtlas, Veracruz; imagen superior) y *Ficus cookii* (Tuxtla Gutiérrez, Chiapas; imagen inferior). Micrografías: superior, Nadia Castro Cárdenas; inferior, Karen B. Hernández.

New insights into the coevolutionary history of the fig-fig wasp mutualism in the Neotropics using genomic data: the case of *Ficus aurea* complex and its pollinating fig-wasps

Karen Beatriz Hernández-Esquivel¹, Sabine Nidelet², Laure Saune², Astrid Cruaud²,
Guillermo Ibarra-Manríquez¹, Jean-Yves Rasplus²

¹*Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Universidad Nacional Autónoma de México. Antigua carretera a Pátzcuaro No. 8701. Col. San José de La Huerta. C. P. 58190. Morelia, Michoacán, México*

²*CBGP, INRA, CIRAD, IRD, Montpellier SupAgro, Univ Montpellier, Montpellier, France*

ABSTRACT

A strict coevolutionary history in the fig-fig wasps mutualistic interaction has been largely demonstrated at a subgenus level. However, controversial results have been obtained when analyzing this mutualism at specific levels. Data has been commonly biased by taxonomy, sampling, and phylogenetic reconstruction methods. In the present study, the coevolutionary history of the *Ficus aurea* complex and its pollinating fig wasps was analyzed. Intraspecific sampling along the distribution of the five *Ficus* species that comprise this complex was addressed. Phylogenomic analyses of the figs were taken from a previous study (Hernández-Esquivel, Chapter III, this dissertation). For fig wasps, 41 individuals and 770 loci were analyzed with the technique of Ultra Conserved Elements (UCE). Multiple lineages of fig wasps associated to the five *Ficus* species were detected. Both, figs and fig wasps were clustered by sampling sites, indicating divergence by allopatry. Correlation tests for both phylogenies were significant. Codivergence events could have shaped the mutualistic interactions in the *F. aurea* species complex as well as duplication, losses, and non-codivergent events. These results contrast to what has been found

in previous analyses of Neotropical figs and their pollinating fig wasps, where non coevolutionary history and unspecific host association from fig wasps has been reported.

INTRODUCTION

One of the most striking mutualisms known in nature is the obligate interaction between figs and their pollinating fig wasps. In this strict mutualism, *Ficus* species rely entirely on the fig-wasps of the family Agaonidae (Hymenoptera: Chalcidoidea) to be pollinated, while the life cycle of the Agaonids depends on the syconium development. Figs and their interacting fig wasps have been of main interest for scientists because this tight relationship is important for the understanding of coevolutionary processes. In past decades, it was generally accepted that this interaction was species specific: one species of wasp pollinating one species of *Ficus* (Baker & Hurd, 1968; Galil & Eisikowitch, 1969; Ramírez, 1970a), called the one to one association rule (Cook & Rasplus, 2003; Cruaud, Cook, et al., 2012). It has been widely demonstrated that specificity of the interaction is strong at the genus-section levels; that is, one section of *Ficus* is normally pollinated by one genus of Agaonidae (Cook & Segar, 2010; Cruaud, Rønsted, et al., 2012; Rønsted et al., 2005). As a result of a perfect one to one association, a strict cospeciation event of the figs and fig wasps would be expected from such interaction. The coevolution between *Ficus* sections and Agaonid genera has been confirmed through the correlations of their phylogenies and their diversification times (Cruaud, Rønsted, et al., 2012; Rønsted et al., 2005).

Research at shallow phylogenetic scales has shown that strict cospeciation and the one to one association rule fail at the species level (Machado et al., 2005; Peng et al., 2008; Su et al., 2008). But studies at this level have had their limitations;

phylogeny estimations are subject to error from various sources, and taxonomy of figs is often unreliable because of their high morphological intraspecific variability (Cook & Rasplus, 2003; Cook & Segar, 2010; Hembry & Althoff, 2016). A break down in the specificity can occur when: i) wasps speciate in the same host (a process named duplication); ii) wasps colonize unrelated hosts (host-shift); iii) the host diversifies but the wasp fail to diverge; or iv) by extinction, lineage sorting and sampling error, (processes called losses) (Charleston, 1998).

At the population level, some coevolutionary patterns have been detected, specifically in Old World figs. When sampling widespread fig species, either species complexes or one species along its range, several pollinating wasp clades or cryptic species have been found (Bain et al., 2016; Chen et al., 2012; Rodriguez et al., 2017; Wachi et al., 2016; Wei et al., 2014). The presence of a specific wasp is not random; some of them are geographically differentiated (Bain et al., 2016; Chen et al., 2012); others are co-pollinators with genetic differentiation (Rodriguez et al., 2017) or they are associated with more than one fig species, with the possibility to colonize different sections in sympatric species (Wei et al., 2014). Geographic differentiation of the wasps with almost null differentiation of the figs, seems to be the most common process; it has been explained because pollinators tend to speciate faster than figs, as fig wasps are short lived and fast generational organisms (Cook & Rasplus, 2003). However, distance alone is not the main factor that promotes speciation of wasps, given that the same genetic pool of wasps can be found within 1000 km of distance, as has been reported in China (Tian et al., 2015).

In the Neotropics, the first problem faced when testing for cospeciation and the one to one association is the complicated taxonomy of Neotropical figs. Widespread species complexes are found along the Neotropics and species limits are difficult to

detect (Berg, 2007). Also, morphological based taxonomy in fig wasps has been understudied and a circular problem arises when their hosts are widely distributed.

In the present study, we used the *Ficus aurea* species complex (subgenus *Spherosuke*, section *Americanae*) and its pollinating fig wasps of the genus *Pegoscapus* to test the one to one association rule and their coevolutionary history in the New World. A recent taxonomic revision of the *F. aurea* complex along its entire range (Hernández-Esquivel et al., 2020) clarified the species limits within it. With a resolved taxonomy, it is possible to test for coevolutionary relationships without strong taxonomical biases. Species in this complex are distributed in Florida, The Greater Antilles, Central America and a considerable part of Mexico, and occupy several distinct vegetation types (Hernández-Esquivel et al., 2020). This allows to test a variety of geographical barriers, including island systems, mountain chains, plateaus and depressions, that could have shaped the coevolutionary history of figs with their pollinating fig-wasps.

Five pollinating fig wasp species have been described for the *F. aurea* species complex (Ramírez, 1970b; Wiebes, 1995): *P. jimenezii* Grandi described from Costa Rica, associated with *F. jimenezii* Standl. synonym of *F. aurea*; *P. mexicanus* Ashmead (*F. aurea*), from Mexico; *P. urbanae* Ramirez (*F. isophlebia*), *P. carlosi* Ramírez and *P. mariae* Ramírez (*F. tuerckheimii*), the three described from Costa Rica. *Ficus tuerckheimii* is the only Neotropical fig documented with the presence of two fig wasps developing simultaneously in the syconia (Ramírez, 1970b).

Pegoscapus mariae and *P. carlosi* are also the fig wasps with the most contrasting characteristics among the known *Pegoscapus*; they are the only species in the genus without coxal combs and a reduced metasomal corbiculae used for active pollen collection (Ramírez, 1970b). They also differ morphologically from each other: *P. mariae* is yellow, while *P. carlosi* is black.

A recent study using the Cytochrome Oxidase I (*COI*) to infer genetic differentiation in fig pollinating wasps associated to four species of the *F. aurea* complex, nine clades were found; which indicates that several fig wasps lineages pollinate species in the *F. aurea* species complex (Vázquez-Quintana, 2019). In the same study, it was found that fig wasps were more related to each other depending on their geographical distribution, than on the host fig. An interesting finding of this work evidenced the presence of pairs of fig wasps in *F. tuerckheimii*, also with yellow and black colors, but they resulted distantly related, and displayed differences in the body size with regards to the species described by Ramírez (1970b), *P. carlosi* and *P. mariae*.

On the other hand, unsolved internal nodes and high intraspecific genetic distance, were also found by Vazquez-Quintana (2019). It has been documented that mitochondrial sequences can overestimate the number of species because it can exist nuclear paralogous copies, and the mutational rates in the mitochondria can be altered by the presence of *Wolbachia* symbionts. Consequently, *COI* is not the most suitable marker to infer phylogenies, and delimitate species in Hymenoptera (Haïne et al., 2006; Rodríguez et al., 2017; J. H. Xiao et al., 2011; J.-H. Xiao et al., 2010). The recently developed anchored markers based on Ultraconserved Elements (UCEs) are becoming a successful tool for inferring phylogenies in animals because they are universally conserved sequences in the genome and their flanking regions are variable enough to be phylogenetically informative (Faircloth et al., 2012). A set of UCE probes have been developed for hymenoptera (Faircloth et al., 2015) and tested successfully in the superfamily Chalcidoidea with a 72.3% of parsimony informative sites from a matrix composed of 340,286 bp (Cruaud et al., 2019).

In the present study, we reconstructed the coevolutionary history of the pollinating fig wasps and the *F. aurea* species complex using genomic data for both

lineages. We addressed the following questions: How many pollinating fig wasp clades are associated within the *F. aurea* species complex, using UCEs? Are the phylogenies of both, *F. aurea* species complex and its pollinating fig wasps correlated? Do these relationships reflect a codivergence/coevolutionary association?

METHODS

Study species and taxonomic sampling

Ficus. The phylogenetic analysis, co-ancestry matrix and multivariate analysis of the *F. aurea* species complex that resulted from Hernández-Esquivel et al., (Chapter III, this dissertation) were used as a reference to select a subset of individuals representing the distinct genetic groups within each species. The selection was done according to the different population genetic clusters found previously in Hernández-Esquivel et al., (Chapter III, this dissertation). This resulted in a selection of 11 individuals from the species *F. aurea*, *F. cookii*, *F. isophlebia*, *F. tecolutensis* and *F. tuerckheimii* and *F. citrifolia* as outgroup. This data set was used to perform a phylogenetic analysis of the species and use it as input in the cophylogenetic analysis. Sampling localities are shown in Figure 1, the complete distribution records of each *Ficus* species were plotted to show their known distributions. The maps were performed with ggmap (Kahle & Wickham, 2013) in R Core Team (2019).

Pegoscapus. A total of 41 *Pegoscapus* individuals were analyzed, which were obtained from fig trees sampled for this study or from previous collections made by J-Y Rasplus, and selected to match the geographical area of the hosts, see Table S2 for detailed information about specimens and their hosts. All the specimens were

collected and stored in EtOH 96%. Individuals corresponding to different putatively morphological species in every fig tree were identified by J-Y Rasplus.

DNA extraction

Pegoscapus. A non-destructive protocol was used following the modifications performed in Cruaud et al. (2019) for the Qiagen DNeasy Blood and Tissue kit. After extraction, the body of the specimens was stored at -20°C in EtOH 96% to keep vouchers, especially in case that type specimens are required. The extraction was performed using one individual in most of the cases, but if required, a pool of maximum three individuals, from the same host, were used when DNA from one specimen did not yield the minimum amount required for library construction (Table 1). Vouchers (individuals from which DNA was extracted) are found at the Centre de Biologie Pour la Gestion des Populations, Montferrier Sur-Lez, France.

Library construction

Pegoscapus. Libraries were constructed according to the protocol described by Cruaud et al. (2019). Briefly, the input DNA was sheared to a size of ca 400 bp using the Bioruptor® Pico (Diagenode). The NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina (NEB) was used to perform the End repair, 3'-end adenylation, adapters ligation and PCR enrichment. Barcoded adapters with primer sites for amplification and Illumina sequencing, were used. A set of nucleotide barcodes of 5-6 bp long was used for sample identification. Pools of 16 samples were made at equimolar ratio. Each pool was enriched using the 2,749 probes designed by Faircloth et al. (2015) and contained in the MyBaits kit (Arbor Biosciences, Inc.). The manufacturer's protocol was followed (MyBaits, user manual version 4, <https://arborbiosci.com/wp-content/uploads/2018/04/myBaits-Manual-v4.pdf>). The hybridization reaction was

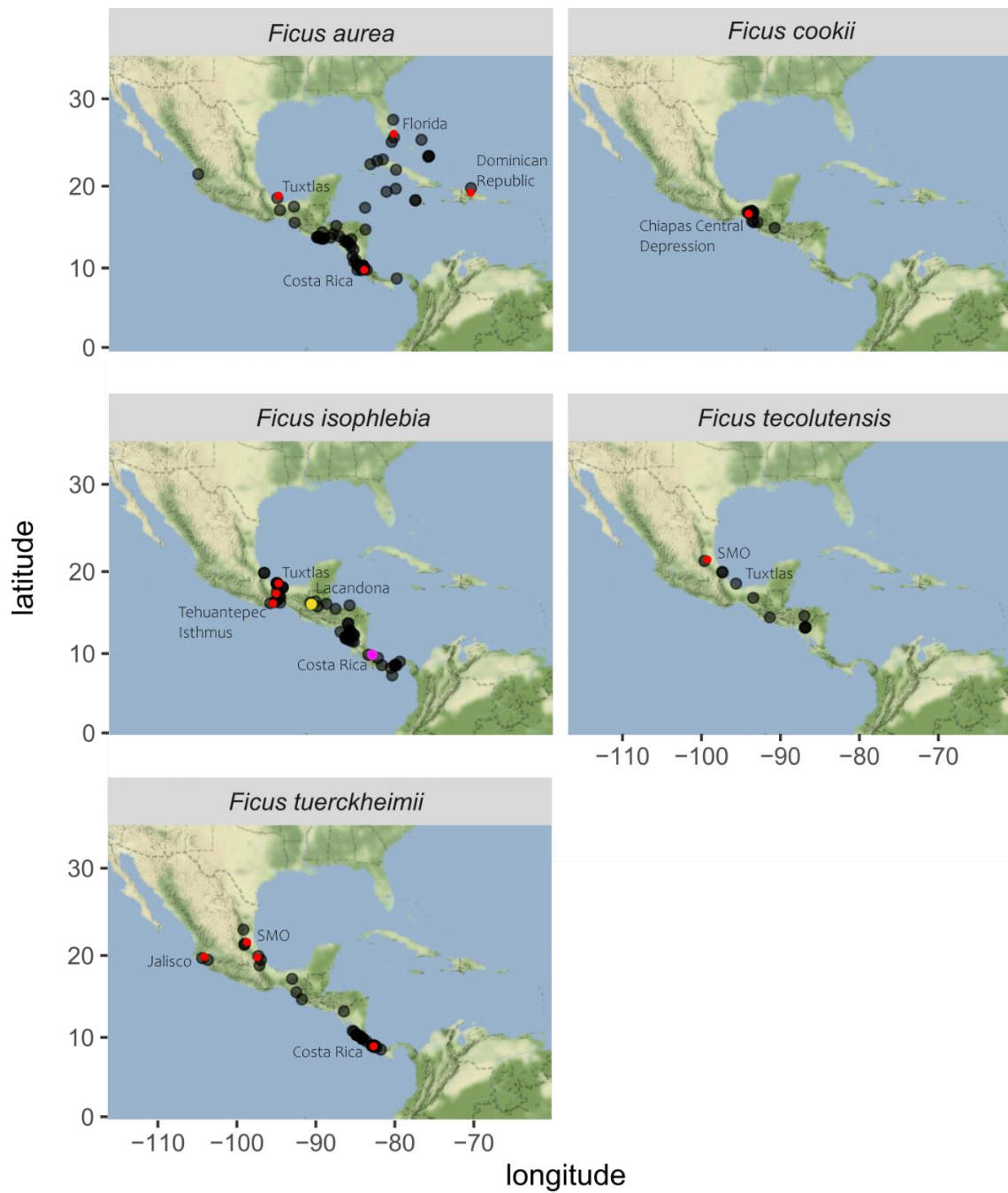


Figure 1. Distribution records (grayscale dots, the blackest represent highest density of records) of the *Ficus aurea* species complex. Sampling localities of fig and fig wasps are in red dots. Yellow circle indicates only host sampled; pink circle indicates only fig wasp sampled. SMO: Sierra Madre Oriental.

run for 12 h at 65°C. The KAPA HiFi HotStart ReadyMix was used to perform post-enrichment amplification on beads. Once libraries were enriched, DNA was quantified with Qubit, Agilent Bioanalyzer and qPCR with the Library Quantification Kit- Illumina/Universal from KAPA (KK4824). Finally, they were pooled at equimolar ratio. A 2*300 paired-end sequencing was performed on an Illumina MiSeq platform at UMR AGAP (Montpellier, France).

Raw data processing and phylogenetic analysis

Ficus. The pearl pipeline RADIS, which relies on Stacks v1.46 (Catchen et al., 2011, 2013) and RAxML (Stamatakis, 2006) was implemented for phylogenetic analyses. The following parameters were selected in ustacks: minimum stack depth = m3, distance allowed between stacks = M3, maximum distance allowed to align secondary reads to the primary reads = N4. The construction of the catalog of loci was performed with cstacks allowing n=10. The sstacks program was used to map the individual loci in the catalog. In the catalog of loci, samples with a minimum of 500 loci were kept; the 65% of the individuals that share a unique locus were selected, loci for which a sample had three or more sequences were removed.

Pegoscapus. The data analysis was based on the workflow performed in Cruaud et al. (2019). The quality of the raw sequences was revised in FastQC 0.11.2 (Andrews, 2010). Default parameters in Trimmomatic 0.36 (Bolger et al., 2014) were used for quality filtering and adapter trimming. To merge overlapping reads FLASH 1.2.11 (Magoč & Salzberg, 2011) was used (-m, minimum overlap=10 pb; -M, maximum overlap=300 pb). Demultiplexing was based in the custom bash script published in Cruaud et al. (2019). For assembling cleaned and demultiplexed reads, CAP3 (Huang & Madan, 1999) with default parameters, was used. The reference UCEs dataset

containing 1432 sequences and assembled in Cruaud et al. (2019) was handled to align the contigs to this reference dataset with Lastz Release 1.2.0 (Harris, 2007). A filtering step to remove of sequences that aligned to more than one UCE reference, and multiple sequences that aligned with the same UCE reference, was performed using Geneious 11.1.5 (<https://www.geneious.com>).

The loci matrix was built including UCEs that were present for at least 78% of the taxa. The alignment was performed in MAFFT 7.245 (Kato & Standley, 2013), in the terminal with default parameters. A phylogenetic tree was inferred in RAxML (Stamatakis, 2014) with the unpartitioned dataset, 100 rapid bootstrap searches and the GTRGAMMA model. The software phytools 0.7.20 was used (R Core Team, 2019) to plot the tree on a map.

Coevolution

To compare the degree of correspondence between the two phylogenies, the TreeMap 3.0b (Charleston, 2011) software was used. To reduce the computational demand, a *Pegoscapus* phylogeny was generated with a subset of 16 individuals that correspond to differentiated lineages and morphospecies of *Pegoscapus* associated to the differentiated subclades of fig trees (Table 1). For example, for *F. tuerckheimii*, there are at two well differentiated clades of fig wasps associated to the Costa Rican fig clade. This phylogenetic tree was used to map along with the phylogeny of the *F. aurea* species complex generated for this study. TreeMap returns the number and classes of events that shaped the actual mutualist associations on a node by node basis: cospeciation, duplication, host shifts, losses and other non-coevolutionary events. The *Pegoscapus* phylogeny was mapped as the dependent variable and the *Ficus* phylogeny as the independent variable, with 1000 random mappings, the time option selected and 25 generations to test for significance in

coevolution. The significance of codivergence events at each internal node was also tested. TreeMap is not able to analyze when one pollinator is hosted by more than one host species.

Table 1. Figs and fig wasps pairs selected to perform the coevolutionary analysis. In the Sample ID, the number after capital letters refers to the fig tree number. In the fig wasps codes, the number after the underscore indicates the number of the morphospecies found in the same fig tree (01, 02, and so on). The number 88 refers to individual one sequenced from the same wasp morphospecies and the 89 refers to the second individual sequenced.

<i>Ficus</i> clades	Sample ID	Fig wasps <i>Pegoscapus</i>	Sample ID	Fig wasp lineage
<i>F. aurea</i>				
Florida	JRAS06886	Florida	JRAS02871_0189	L7
Dominican Republic	KHER0021	Dominican Republic	KHER00018_0188	L8
Los Tuxtlas	KHER00031	Los Tuxtlas	KHER00031_0188	L5
Costa Rica	KHER00006	Costa Rica	JRAS02175_0189	L4
			KHER00005_0188	L6
<i>F. cookii</i>	KHER00039	<i>ex. Ficus cookii</i>	KHER00039_0188	L15
<i>F. isophlebia</i>				
Los Tuxtlas and Isthmus	KHER00061	Los Tuxtlas and Isthmus	KHER00060_0188	L14
Lacandona	KHER00055	Costa Rica	JRAS02824_0195	L13
<i>F. tuerckheimii</i>				
Sierra Madre Oriental	KHER00102	Sierra Madre Oriental	KHER00103_0288	L3
			KHER00102_0188	L10
			KHER00102_0288	L11
Jalisco	KHER00096	Jalisco	KHER00096_0188	L9
Costa Rica	KHER00089	Costa Rica	KHER00084_0288	L2
			KHER00084_0188	L1
<i>F. tecolutensis</i>	KHER00013	<i>ex Ficus tecolutensis</i>	KHER00017_0188	L12
<i>F. citrifolia</i>	JRAS06090	<i>ex Ficus citrifolia</i>	JRAS02284_0189	

Results

Ficus. The final alignment consisted of 160 234 bp, with a 17.3% of missing data, a total of 6108 variable sites from which 1.5% were parsimony informative; and a total of 41% of GC content. Overall, phylogenetic relationships were recovered as in Hernández-Esquivel et al. (Chapter III, this dissertation); except for *F. isophlebia* and *F. cookii*, which were recovered in a clade as closest sisters, instead of *F. isophlebia* as sister of *F. cookii*.

Pegoscapus. The data matrix consisted of 840 UCEs loci and 540 285 bp, with a 21.6% of missing data, 135 228 (25%) variable sites, from this, 16% were parsimony informative sites, and a 42.6% of GC content. Additional information is in the Supplementary Table 1. The phylogenetic tree was returned with high branch support (Figure 2). A total of 15 lineages of *Pegoscapus* can be associated with the *F. aurea* species complex. From these clades, five lineages are associated to *F. aurea*, corresponding to the four sampling localities. One lineage is associated with *F. cookii*, that is sister to the two clades associated to *F. isophlebia*, likewise corresponding to the two sampling localities of this last species. One clade is associated to *F. tecolutensis*. Six closely and distantly related *Pegoscapus* lineages are associated with *F. tuerckheimii*. One wasp lineage was found in two hosts, *F. tuerckheimii* and *F. tecolutensis*. The *Pegoscapus* analyzed from fig trees outside of the complex (Figure 2), fell as sister to *Pegoscapus* ex *F. tuerckheimii* in Costa Rica, which indicates that pollinating fig wasps of the *F. aurea* complex are non-monophyletic.

The overall associations follow a geographical pattern (Figure 3) such that approximately one wasp lineage is specific to one population of figs or a closely

geographic set of populations. However, the lineages keep their relatedness in function of the figs that they pollinate. For example, in Costa Rica, there are independent lineages of fig wasps that pollinate *F. aurea*, *F. isophlebia* and *F. tuerckheimii*, but the fig wasps of *F. aurea* and *F. isophlebia* are more closely related to the fig wasps that pollinate their hosts in the Mexican populations (Figure 3).

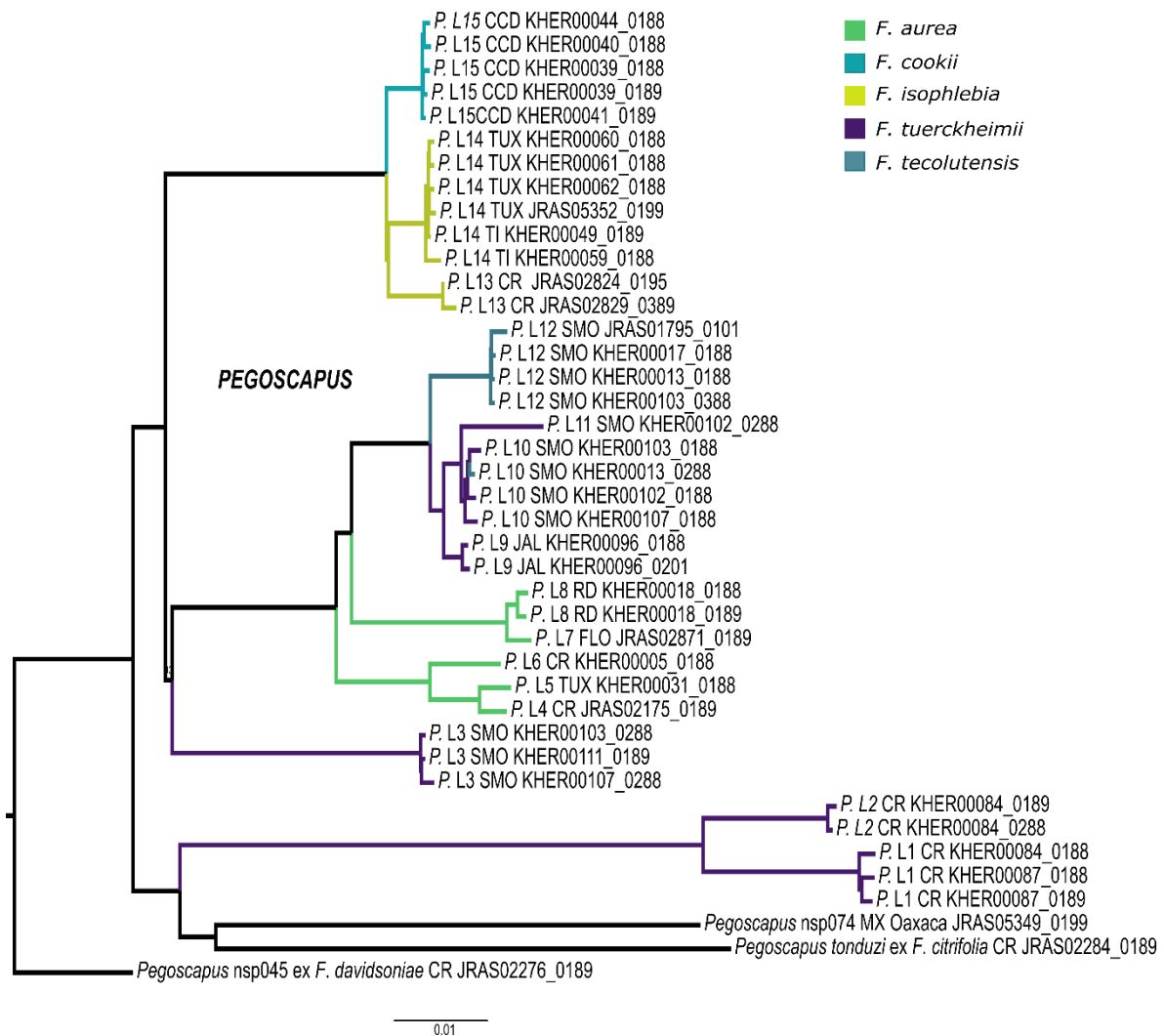


Figure 2. Maximum Likelihood tree based on UCEs of *Pegoscapus* fig wasps associated to the *F. aurea* species complex. All internal nodes are >96 bootstrap support. CCD: Chiapas Central Depression; CR: Costa Rica; TI: Tehuantepec Isthmus; TUX: Tuxtlas; JAL: Jalisco, RD: Dominican Republic; SMO: Sierra Madre Oriental. L: lineage.

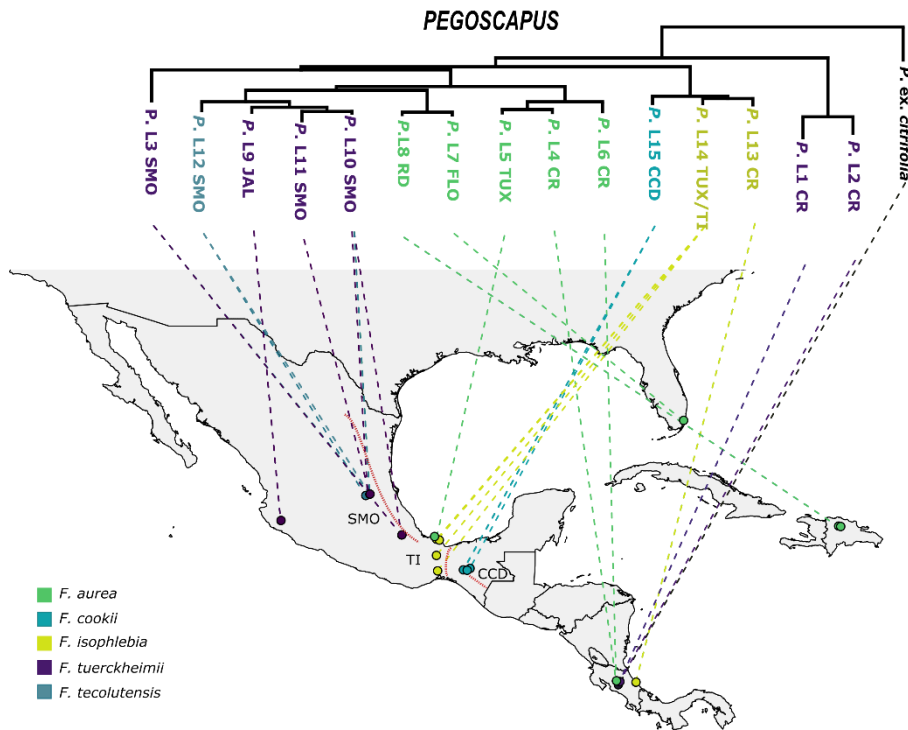


Figure 3. *Pegoscapus* lineages associated to the *F. aurea* species complex and its phylogenetic relationships. Red smoothed lines indicate geographic barriers. CCD: Chiapas Central Depression; TI: Tehuantepec Isthmus; SMO: Sierra Madre Oriental.

Coevolutionary relationships. When testing the association between the 16 fig wasp lineages associated to 12 terminal branches belonging to the five *F. aurea* species in the complex plus *F. citrifolia*, TreeMap detected a maximum of 16 codivergence events, 14 duplications, 18 losses, no host shifts and a minimum of 32 non-codivergence events. Some internal nodes displayed significant correlation in both phylogenies (Figure 4). The correlation test of the two phylogenies was significant ($P = 0.0003$).

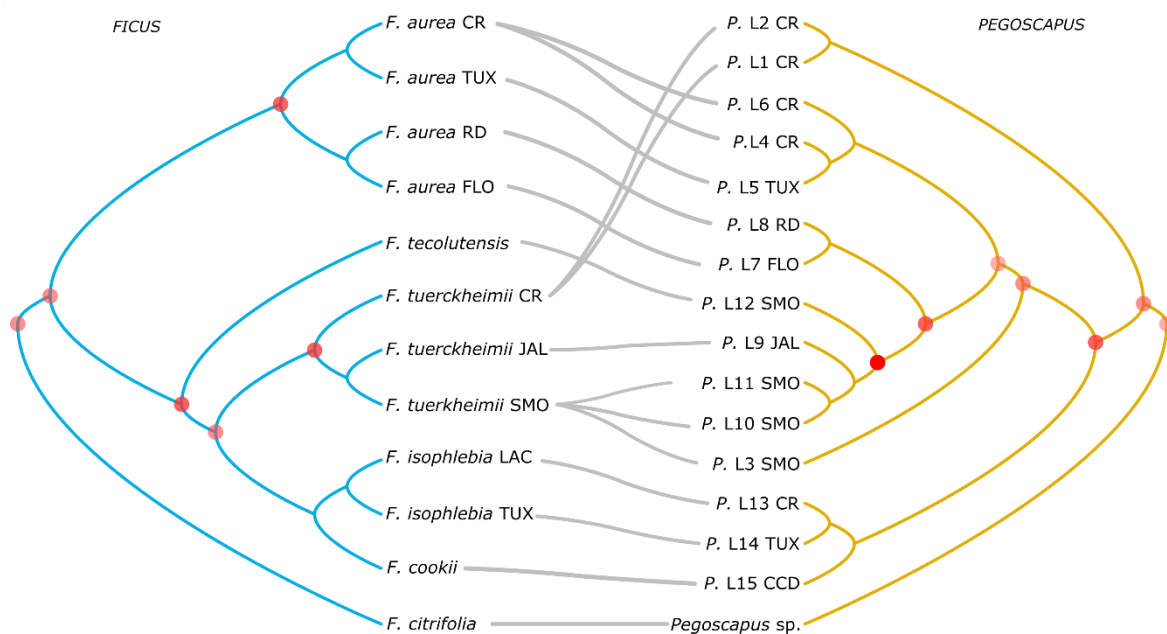


Figure 4. Tanglegram of the *F. aurea* complex species and *Pegoscapus* fig wasps. Red dots indicate significant correlated nodes (from lightest low correlation to strongest correlation). CR, Costa Rica; RD, Dominican Republic; FLO, Florida; JAL, Jalisco; LAC, Lacandona; SMO, Sierra Madre Oriental; TUX; Tuxtlas.

DISCUSSION

Specificity patterns

We found several clades of fig-wasps that are specific to different geographic areas where their hosts from the *F. aurea* species complex are present. This pattern is congruent with the results obtained by Vázquez-Quintana (2019) with *COI* data. The fig wasp clades were labeled for analytical purposes, and they could be designated in the future as different species, subspecies or clades. The genetic clustering of the fig wasps coincides with the genetic clustering by populations in the *F. aurea* species complex as shown by Hernández-Esquivel et al. (Chapter III, this dissertation). The occurrence of multiple fig wasps lineages in different geographical areas of the hosts distribution has been documented in the Old World (Rodriguez et al., 2017; Wachi et al., 2016; Wei et al., 2014) and the co-structuring of the hosts has also been

demonstrated previously (Rodriguez et al., 2017; Tian et al., 2015; Wachi et al., 2016; Souto-Vilarós et al. 2019).

Among the five species comprised in the *F. aurea* species complex, *F. cookii* is the only one that has a one to one relationship with its pollinating fig wasp. The results obtained here contrast with what was previously known for this mutualism in the Neotropics, where several fig wasp species exchange hosts in the same locality, and *Ficus* individuals from several species tend to be polyphyletic (Jackson et al., 2008; Machado et al., 2005).

With different fig wasps clades associated to each of the *F. aurea* populations, we suspect that the known pollinator of *F. aurea* in Florida, commonly called *P. mexicanus*, has probably not been described before, since *P. mexicanus* was described from *F. aurea* in Nayarit, Mexico, and it is unlikely that they are the same species. Unfortunately, *F. aurea* at Nayarit is rare, and the only specimen known was not found in our explorations at the time that this work was done.

We found only one case of fig wasp exchange for this study, one of the *F. tuerckheimii* pollinating fig wasps was also found in the *F. tecolutensis* samples (Figure 2). Exhaustive sampling is needed at the locality where those species are coexisting to confirm if the fig wasp is common in both hosts, or if it was a random event or a sampling error (for example, the wasp scaping from the bag, because they are able to chew them, and landing in the bags of the other species).

We also confirm the presence of co-occurring fig wasps in *F. tuerckheimii* along its range (Figure 2). However, pairs of fig wasps are distantly related, the Mexican fig wasps of *F. tuerckheimii* are grouped in two main unrelated clades and the Costa Rican fig wasps are two other distantly related clades (Figure 2). These results were also documented by Vázquez-Quintana (2019) with *COI* analyses, with observations indicating that these groups present morphological differences. One of the Mexican

clades of *F. tuerckheimii* holds exclusively black colored fig wasps (L3), and the other clade can be subdivided into black (L9, L11) and yellow wasp lineages (L10) (Figure 1). Also, in the Costa Rican clade, L2 is comprised by two fig-wasps that vary in their coloration. The presence of co-occurring fig wasp species with yellow and black color, has also been documented for *F. sycomorus* (Warren et al., 2010) and *F. rubiginosa* (Darwell et al., 2014) in the Old World. In *F. septica*, also from the Old World, a single fig wasp species can comprise subclades of either yellow or black individuals (Rodriguez et al., 2017), which indicates that polymorphisms are possible. Explanations about the coexistence of co-occurring fig wasps relate to differences in wasps' lifespan, emergence times and competitiveness (Warren et al., 2010).

Geographical patterns

The phylogenetic clustering of the fig wasps and the fig trees of the *F. aurea* complex exhibits a pattern that corresponds to geography (Figure 2, 3). In *F. aurea*, the existence of two main clades of fig wasps match the split of *F. aurea* between Costa Rica-Los Tuxtlas and Florida-Dominican Republic clades (Hernández-Esquivel et al, Chapter III this dissertation).

The genetic differentiation between continental and island populations in other fig-fig wasp systems has been highlighted previously (Yu & Nason, 2013; Tian et al., 2015). Such is the case of *Valisia javana* pollinating fig wasp in Asia (Tian et al., 2015), which exhibits genetically differentiated populations in the insular and continental populations. This is concordant with the restricted haplotype of its host tree *F. hirta* in the same island where fig wasps are genetically differentiated (Yu & Nason, 2013). In *F. septica*, an exclusive gene pool in Taiwan is pollinated by a fig wasp clade distributed exclusively in the same island, and not in the closest islands (Rodriguez et al., 2017). In both cases, pollinating fig wasps from *Ficus* species are genetically

differentiated in islands that are close to others or to the continent, and a hypothesis of isolation by distance has been rejected (Yu & Nason, 2013). However, in our study, the distance between samples from the continental and Antillean portions, is more than 1 800 km, then an hypothesis of isolation by distance needs to be tested for the pollinating fig wasps of *F. aurea*.

The subclades formed within the two main clades of *F. aurea* are in agreement with their corresponding population (Hernández-Esquivel, Chapter III, this dissertation); on the fig-wasp side, they group also by population in the Caribbean samples. Yu & Nason (2013) and Souto-Vilarós (2019) attribute the pattern to a spatially structured gene flow mediated by the pollinators. This process could be suggested at least for the Caribbean populations of *F. aurea*. Experiments have shown that *F. aurea* from Florida exhibits self-pollination without consequences of inbreeding depression (Hossaert-Mckey & Bronstein, 2001); this could be preventing long distance dispersal of the fig wasps, and in consequence of the fig pollen.

As it was mentioned before, *F. cookii* is the only species with one clade of fig wasp associated. The restricted distribution of this fig tree species can be inferred as the factor that contributes to this specialization (Figures 1, 3). *Ficus cookii* and its fig wasp are distributed mainly in the Chiapas Central Depression, a physiographic region consisting of a subhumid slump surrounded by mountain chains (Johnson, 1990), which could have functioned as geographic barriers when *F. cookii* and its fig wasp diverged from from *F. isophlebia* and its two pollinating fig wasps lineages. For *F. isophlebia*, one clade of fig wasps can be found from the Los Tuxtlas Reserve to the Tehuantepec isthmus, and one clade of fig wasp in Central America (Figure 3). The individuals of *F. isophlebia* figs reflect the same clustering as in fig wasps (Figure 1). While we cannot confirm that the same fig wasp clade from Costa Rica pollinates *F. isophlebia* from the Lacandona reserve, it can be assumed that a process of

divergence is occurring between the fig trees and fig wasps of the Los Tuxtlas Reserve-Tehuantepec region and those from Central America. In fact, *F. isophlebia* from this geographic area presents morphological differences in the syconium compared to the syconia from individuals of Central America (Hernández-Esquivel et al., 2020). The Tehuantepec isthmus is a 200 km long and 40 to 100 km wide subduction zone (Barrier et al., 1998), where strong winds come into land (Steenburgh et al., 1998). Then, it can be hypothesized that in the absence of barriers, the fig wasp species associated to *F. isophlebia* in this region can be easily dispersed along this area, as fig wasps can be dispersed by wind (Compton et al., 2000) and *F. isophlebia* is mostly a lowland species (Hernández-Esquivel et al., 2020). On the Central American side, collecting efforts are needed to elucidate if the presence of geographical barriers along this region are promoting speciation in the fig wasps associated to *F. isophlebia*.

The species *F. tecolutensis* is the only species in the complex whose individuals do not cluster according to a geographical pattern (Hernández-Esquivel et al., Chapter III, this dissertation). However, as the fig wasps were obtained only from one locality, increasing sampling could help to elucidate patterns relative to this species.

In *F. tuerckheimii*, as it was mentioned before, several unrelated clades of fig wasps were found; yet, specific fig wasp clades of the different geographic areas sampled can be identified. In its northern distribution, *F. tuerckheimii* is distributed in Neotropical cloud forests or in tropical forests adjacent to cloud forests (Hernández-Esquivel et al., 2020). Cloud forests are restricted to montane areas in a specific altitudinal range, which causes a natural fragmentation of these forests (Ornelas et al., 2013). Several studies have detected genetic differentiation and phylogeographic structure in taxa distributed along neotropical cloud forests (Ornelas et al., 2013;

Rodríguez-Gómez et al., 2013; Ruiz-Sanchez & Ornelas, 2014). In such studies, the populations at SMO tend to share haplotypes and are strongly differentiated from the populations separated by large geographical barriers (e. g. Tehuantepec isthmus). From these observations, it is possible to infer that the effects of the unconnected cloud forests are causing the speciation processes for the fig wasps associated to *F. tuerckheimii*.

Coevolutionary history

The reconciliation analysis indicates that the phylogenies of the *F. aurea* species complex and its *Pegoscapus* pollinators are significantly correlated. Events like losses or duplications have affected the exact correspondence between the phylogenies, and non-coevolutionary events have also contributed to shape their associations. These results are contrary to what has been found before in the Neotropics where no significant codivergence was detected between a group of neotropical fig species and their associated fig wasps in Panama (Machado et al., 2005). Conversely, in the Old World, strong correlation between phylogenies of figs and fig wasps (pollinating and non-pollinating) at species level in the section *Galoglichya* (Jousselin et al., 2008) and in the subgenus *Sycomorus* (Weiblen & Blush, 2002), has been detected.

Cruaud & Rasplus (2016) pointed out that a significant correspondence between the phylogenies of the interacting lineages can also be the result of limiting dispersal by geographical barriers. As it was mentioned in the section above, the diversification patterns that reflect the phylogenies are strongly influenced by the geographical distribution of the species analyzed. Thus, one of the suggestions to increase the accuracy when testing codivergence is the use of several individuals of fig wasps at different host populations (Cruaud & Rasplus, 2016). Although, our

sampling was not exhaustive within populations, it is a good evidence of the processes happening below the species level. With this regard, Thompson (1994) has pointed out that the more it is studied, the more has been found that specialization and coevolution are better understood at the population level, in all kinds of parasitic and mutualist interactions. He called this the geographic mosaic of coevolution. Still, the results obtained here need to be improved since fig wasps in the *F. aurea* complex are not monophyletic (Figure 2) and hosts outside of the *F. aurea* complex were not tested. It has also been noticed that subsampling can affect the results of the reconciliation tests (Jousselin et al., 2008).

In the reconciled trees tested here (Figure 4), the overall picture confirms the existence of a coevolutionary history at deeper nodes. It indicates that there was a time in the past when the fig trees and fig wasps could have speciated simultaneously. For example, when *F. cookii* and *F. isophlebia* and their fig wasps diverged (Figure 4), a codivergence event could have occurred. Then, in some cases duplication followed, and it probably was the result of allopatric events. In the same example, *F. isophlebia* populations from Central America were separated from the Los Tuxtlas Reserve- the Tehuantepec Isthmus populations which eventually could have caused fig wasp speciation and geographical structure in the fig trees. All these hypotheses should be corroborated with the inference of divergence times.

Duplication events happen when the fig wasps speciate but the fig trees do not. This process can be detected also for the two clades of fig wasps that pollinate *F. aurea* hosts, which contain two or three lineages that could be classified as species or subspecies (L4 and 5; L6, 7 and 8), and are associated with different *F. aurea* populations (Figure 4). This pattern suggests duplication of the fig wasps associated to *F. aurea*. Likewise, one of the clades of fig wasps associated to *F. tuerkheimii* in Mexico is subdivided in the lineages 9, 10 and 11 (Figure 2), which indicates another

case of duplication probably caused by allopatry, since *F. tuerckheimii* hosts are also geographically clustered (Hernández-Esquivel et al., Chapter III, this dissertation).

Losses can be more difficult to detect, but subsampling could be a cause since other fig wasps could be associated to the *Pegoscapus* from the *F. aurea* complex that were not considered here. Non-coevolutionary events can also be shaping the interaction between figs and fig wasps in the *F. aurea* complex. For example, *F. tuerckheimii* is hosting two fig wasps of contrasting coloration, but this phenomenon is rather convergence given that the lineages of fig wasps obtained from two distant localities are also distantly related (Figures 2, 3).

CONCLUSIONS

Our results suggest that the *F. aurea* species complex and its wasp pollinators *Pegoscapus* share a significant coevolutionary history and are associated specifically at a geographic level. A broad *Ficus* range and the presence of geographical barriers can promote diversification of the fig wasps, and geographic clustering in the fig trees. Duplications, losses and non-coevolutionary events have also shaped the history of these mutualists. A strict test for cospeciation needs to be informed by the divergence times of the interacting pairs, and thus, a study involving divergence times and more dense sampling is a natural next step toward the reconstruction of the evolutionary history in the fig and fig wasp mutualism in the Neotropics.

REFERENCES

- Andrews, S. (2010). *FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data* (0.11.2).
- Bain, A., Borges, R M, Chevallier, M H, Vignes, H, Kobmoo, N, Peng, Y. Q., Cruaud, A, Rasplus, J Y, Kjellberg, F, & Hossaert-Mckey, M. (2016). Geographic structuring into vicariant species-pairs in a wide-ranging, high-dispersal plant-insect mutualism: the case of *Ficus racemosa* and its pollinating wasps. *Evol Ecol*, *30*, 663–684.
- Baird, N. A., Etter, P. D., Atwood, T. S., Currey, M. C., Shiver, A. L., Lewis, Z. A., Selker, E. U., Cresko, W. A., & Johnson, E. A. (2008). Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLoS ONE*, *3*(10), e3376.
- Baker, H. G., & Hurd, P. D. (1968). Intrafloral ecology. *Annual Review of Entomology*, *13*(1), 385–314.
- Barrier, E., Velasquillo, L., Chavez, M., & Gaulon, R. (1998). Neotectonic evolution of the Isthmus of Tehuantepec (southeastern Mexico). In *TECTONOPHYSICS* (Vol. 287).
- Berg, C. C. (2007). Proposals for treating four species complexes in *Ficus* subgenus *Urostigma* section *Americanae* (Moraceae). *Blumea - Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants*, *52*(2), 295–312.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). *Genome analysis Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data*. *30*(15), 2114–2120.
- Catchen, J., Amores, A., Hohenlohe, P., Cresko, W., & Postlethwait, J. H. (2011). Stacks: Building and genotyping loci de novo from short-read sequences. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, *1*(3), 171–182.

- Catchen, J., Hohenlohe, P. A., Bassham, S., Amores, A., & Cresko, W. A. (2013). Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Molecular Ecology*, *22*(11), 3124–3140.
- Charleston, M. A. (1998). Jungles: A new solution to the host/parasite phylogeny reconciliation problem. *Mathematical Biosciences*, *149*(2), 191–223.
- Charleston, M. A. (2011). TreeMap 3.0b. Java.
<https://sites.google.com/site/cophylogeny/software>
- Chen, Y., Compton, S. G., Liu, M., & Chen, X. Y. (2012). Fig trees at the northern limit of their range: The distributions of cryptic pollinators indicate multiple glacial refugia. *Molecular Ecology*, *21*, 1687–1701.
- Compton, S. G., Ellwood, M. D. F., Davis, A. J., & Welch, K. (2000). The Flight Heights of Chalcid Wasps (Hymenoptera, Chalcidoidea) in a Lowland Bornean Rain Forest: Fig Wasps are the High Fliers¹. *Biotropica*, *32*(3), 515.
- Cook, J. M., & Rasplus, J. Y. (2003). Mutualists with attitude: Coevolving fig wasps and figs. *Trends in Ecology and Evolution*, *18*(5), 241–248.
- Cook, J. M., & Segar, S. T. (2010). Speciation in fig wasps. *Ecological Entomology*, *35*(SUPPL. 1), 54–66.
- Cruaud, A., Cook, J., Da-Rong, Y., Genson, G., Jarbour-Zahab, R., Kjellberg, F., Pereira, R. A. S., Ronsted, N., Santos-Mattos, O., Savolainen, V., Ubaidillah, R., van Noort, S., Yang-Qion, P., & Rasplus, J.-Y. (2012). Fig-fig wasp mutualism: the fall of the strict cospeciation paradigm? In S. Patiny (Ed.), *Evolution of Plant-Pollinator Relationships* (pp. 68–102). Cambridge University Press.
- Cruaud, A., Gautier, M., Galan, M., Foucaud, J., Sauné, L., Genson, G., Dubois, E., Nidelet, S., Deuve, T., & Rasplus, J.-Y. (2014). Empirical Assessment of RAD Sequencing for Interspecific Phylogeny. *Molecular Biology and Evolution*, *31*(5), 1272–1274.

- Cruaud, A., Nidelet, S., Arnal, P., Weber, A., Fusu, L., Gumovsky, A., Huber, J., Polaszek, A., & Yves, J. (2019). Optimized DNA extraction and library preparation for minute arthropods : Application to target enrichment in chalcid wasps used for biocontrol. *Molecular Ecology Resources*, *19*(February), 702–710.
- Cruaud, A., & Rasplus, J.-Y. (2016). Testing cospeciation through large-scale cophylogenetic studies. *Current Opinion in Insect Science*, *18*, 53–59.
- Cruaud, A., Ronsted, N., Chantarasuwan, B., Chou, L. S., Clement, W. L., Couloux, A., Cousins, B., Genson, G., Harrison, R. D., Hanson, P. E., Hossaert-Mckey, M., Jabbour-Zahab, R., Jousselin, E., Kerdelhué, C., Kjellberg, F., Lopez-Vaamonde, C., Peebles, J., Peng, Y. Q., Santinelo Pereira, R. A., ... Savolainen, V. (2012). An extreme case of plant-insect codiversification: Figs and fig-pollinating wasps. *Systematic Biology*, *61*(0), 1029–1047.
- Darwell, C. T., Al-Beidh, S., & Cook, J. M. (2014). Molecular species delimitation of a symbiotic fig-pollinating wasp species complex reveals extreme deviation from reciprocal partner specificity. *BMC Evolutionary Biology*, *14*(1), 1–10.
- Etter, P. D., Preston, J. L., Bassham, S., Cresko, W. A., & Johnson, E. A. (2011). Local de novo assembly of rad paired-end contigs using short sequencing reads. *PLoS ONE*, *6*(4), e18561.
- Faircloth, B. C., Branstetter, M. G., White, N. D., & Brady, S. G. (2015). Target enrichment of ultraconserved elements from arthropods provides a genomic perspective on relationships among Hymenoptera. *Molecular Ecology Resources*, *15*(3), 489–501.
- Faircloth, B. C., McCormack, J. E., Crawford, N. G., Harvey, M. G., Brumfield, R. T., & Glenn, T. C. (2012). Ultraconserved Elements Anchor Thousands of Genetic Markers Spanning Multiple Evolutionary Timescales. *Systematic Biology*, *61*(5), 717–726.

- Galil, J., & Eisikowitch, D. (1969). Further studies on the pollination ecology of *Ficus sycomorus* L. (Hymenoptera, Chalcidoidea, Agaonidae). *Tijdschrift Voor Entomologie*, *112*(1), 1–13.
- Haine, E. R., Martin, J., & Cook, J. M. (2006). Deep mtDNA divergences indicate cryptic species in a fig-pollinating wasp. *BMC Evolutionary Biology*, *6*, 1–11.
- Harris, R. S. (2007). *Improved Pairwise Alignment of Genomic DNA*.
- Hembry, D. H., & Althoff, D. M. (2016). Diversification and coevolution in brood pollination mutualisms: Windows into the role of biotic interactions in generating biological diversity. *American Journal of Botany*, *103*(10), 1783–1792.
- Hernández-Esquivel, K. B., Piedra-Malagón, E. M., Cornejo-Tenorio, G., Mendoza-Cuenca, L., González-Rodríguez, A., Ruiz-Sanchez, E., & Ibarra-Manríquez, G. (2020). Unraveling the extreme morphological variation in the neotropical *Ficus aurea* complex (subg. *Spherosuke*, sect. *Americanae*, Moraceae). *Journal of Systematics and Evolution*, *58*(3), 1–19.
- Hossaert-Mckey, M., & Bronstein, J. L. (2001). Self-pollination and its costs in a monoecious fig (*Ficus aurea*, Moraceae) in a highly seasonal subtropical environment. *American Journal of Botany*, *88*(4), 685–692.
- Huang, X., & Madan, A. (1999). CAP3: A DNA sequence assembly program. *Genome Research*, *9*(9), 868–877.
- Ibarra-Manríquez, G., Cornejo-Tenorio, G., González-Castañeda, N., & Piedra-Malagón, E. M. (2012). El género *Ficus* L. (Moraceae) en México. *Botanical Sciences*, *90*(4), 389–452.
- Jackson, A. P., Machado, C. A., Robbins, N., & Herre, E. A. (2008). Multi-locus phylogenetic analysis of neotropical figs does not support co-speciation with the pollinators: The importance of systematic scale in fig/wasp cophylogenetic studies. *Symbiosis*, *45*, 1–16.

- Johnson, J. D. (1990). Biogeographic aspects of the herpetofauna of the Central Depression of Chiapas, México, with comments on surrounding areas. *The Southwestern Naturalist*, *35*(3), 268–278.
- Jousselin, E., van Noort, S., Berry, V., Rasplus, J. Y., Rønsted, N., Erasmus, J. C., & Greeff, J. M. (2008). One fig to bind them all: Host conservatism in a fig wasp community unraveled by cospeciation analyses among pollinating and nonpollinating fig wasps. *Evolution*, *62*, 1777–1797.
- Kahle, D., & Wickham, H. (2013). ggmap: Spatial visualization with ggplot2. *R Journal*, *5*(1), 144–161. <https://doi.org/10.32614/rj-2013-014>
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(4), 772–780.
- la Sorte, F. A., Fink, D., Hochachka, W. M., & Kelling, S. (2016). Convergence of broad-scale migration strategies in terrestrial birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *283*(1823).
- Machado, C. a, Robbins, N., Gilbert, M. T. P., & Herre, E. A. (2005). Critical review of host specificity and its coevolutionary implications in the fig/fig-wasp mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102 Suppl*, 6558–6565.
- Magoč, T., & Salzberg, S. L. (2011). FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, *27*(21), 2957–2963.
- Ornelas, J. F., Sosa, V., Soltis, D. E., Daza, J. M., González, C., Soltis, P. S., Gutiérrez-Rodríguez, C., de los Monteros, A. E., Castoe, T. A., Bell, C., & Ruiz-Sanchez, E. (2013). Comparative Phylogeographic Analyses Illustrate the Complex Evolutionary History of Threatened Cloud Forests of Northern Mesoamerica. *PLoS ONE*, *8*(2).

- Peng, Y.-Q., Duan, Z.-B., Yang, D.-R., & Rasplus, J.-Y. (2008). Co-occurrence of two *Eupristina* species on *Ficus altissima* in Xishuangbanna, SW China. *Symbiosis*, 45(1), 9–14.
- R Core Team. (2019). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing.
- Ramírez, W. (1970a). Host Specificity of Fig Wasps. *Evolution*, 24(4), 680–691.
- Ramírez, W. (1970b). Taxonomic and biological studies of neotropical fig wasps (Hymenoptera: Agaonidae). *The University of Kansas Science Bulletin*, 49(1), 1–44.
- Rasplus, J.-Y., Rodriguez, L. J., Tollon-Cordet, C., & Cruaud, A. (2018). Revisiting the phylogeny of *Ficus* (Moraceae): when next generation Sequencing corroborates past generation botanists. *BioRxiv*, 1–13.
<https://doi.org/10.1101/340463>
- Rodriguez, L. J., Bain, A., Chou, L.-S., Conchou, L., Cruaud, A., Gonzales, R., Hossaert-McKey, M., Rasplus, J.-Y., Tzeng, H.-Y., & Kjellberg, F. (2017). Diversification and spatial structuring in the mutualism between *Ficus septica* and its pollinating wasps in insular South East Asia. *BMC Evolutionary Biology*, 17(1), 207.
- Rodríguez-Gómez, F., Gutiérrez-Rodríguez, C., & Ornelas, J. F. (2013). Genetic, phenotypic and ecological divergence with gene flow at the isthmus of Tehuantepec: The case of the azure-crowned hummingbird (*Amazilia cyanocephala*). *Journal of Biogeography*, 40(7), 1360–1373.
- Rønsted, N., Weiblen, G. D., Cook, J. M., Salamin, N., Machado, C. a., & Savolainen, V. (2005). 60 Million Years of Co-Divergence in the Fig-Wasp Symbiosis. *Proceedings. Biological Sciences / The Royal Society*, 272(September), 2593–2599.

- Ruiz-Sanchez, E., & Ornelas, J. F. (2014). Phylogeography of *Liquidambar styraciflua* (Altingiaceae) in Mesoamerica: Survivors of a Neogene widespread temperate forest (or cloud forest) in North America? *Ecology and Evolution* 4(4), 311–328.
- Souto-Vilarós, D., A. Machac, J. Michalek, C. T. Darwell, M. Sisol, T. Kuyaiva, ... S. T. Segar. 2019. Faster speciation of fig-wasps than their host figs leads to decoupled speciation dynamics: Snapshots across the speciation continuum. *Molecular Ecology* 28: 3958–3976.
- Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22(21), 2688–2690.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *BIOINFORMATICS APPLICATIONS*, 30(9), 1312–1313.
- Steenburgh, W. J., Schultz, D. M., & Colle, B. A. (1998). The structure and evolution of gap outflow over The Gulf of Tehuantepec, Mexico. *American Meteorological Society*, 126, 2673–2691.
- Su, Z.-H., Iino, H., Nakamura, K., Serrato, A., & Oyama, K. (2008). Breakdown of the one-to-one rule in Mexican fig-wasp associations inferred by molecular phylogenetic analysis. *Symbiosis*, 45, 73–81.
- Thompson, J. N. 1994. *The coevolutionary process*. Chicago Press, Chicago, 376 p.
- Tian, E., Nason, J. D., Machado, C. A., Zheng, L., Yu, H., & Kjellberg, F. (2015). Lack of genetic isolation by distance, similar genetic structuring but different demographic histories in a fig-pollinating wasp mutualism. *Molecular Ecology*, 24, 5976–5991.
- Vázquez-Quintana, P. (2019). *Relaciones filogenéticas y patrones de diversificación de las avispas polinizadoras del complejo Ficus aurea*. Bachelor thesis, Facultad

de Ciencias, UNAM.

<http://132.248.9.195/ptd2019/septiembre/0794979/Index.html>

- Wachi, N., Kusumi, J., Tzeng, H.-Y., & Su, Z.-H. (2016). Genome-wide sequence data suggest the possibility of pollinator sharing by host shift in dioecious figs (Moraceae, *Ficus*). *Molecular Ecology*, *25*(22), 5732–5746.
- Warren, M., Robertson, M. P., & Greeff, J. M. (2010). A comparative approach to understanding factors limiting abundance patterns and distributions in a fig tree-fig wasp mutualism. *Ecography*, *33*(1), 148–158.
- Wei, Z.-D., Kobmoo, N., Cruaud, A., & Kjellberg, F. (2014). Genetic structure and hybridization in the species group of *Ficus auriculata*: can closely related sympatric *Ficus* species retain their genetic identity while sharing pollinators? *Molecular Ecology*, *23*(14), 3538–3550.
- Wiebes, J. T. (1995). *The New World Agaoninae (pollinators of figs)*. Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen.
- Xiao, J. H., Jia, J. G., Murphy, R. W., & Huang, D. W. (2011). Rapid evolution of the mitochondrial genome in chalcidoid wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea) driven by parasitic lifestyles. *PLoS ONE*, *6*(11).
- Xiao, J.-H., Wang, N.-X., Li, Y.-W., Murphy, R. W., Wan, D.-G., Niu, L.-M., Hu, H.-Y., Fu, Y.-G., & Huang, D.-W. (2010). Molecular Approaches to Identify Cryptic Species and Polymorphic Species within a Complex Community of Fig Wasps. *PLoS ONE*, *5*(11), e15067.
- Yu, H., & Nason, J. D. (2013). Nuclear and chloroplast DNA phylogeography of *Ficus hirta*: Obligate pollination mutualism and constraints on range expansion in response to climate change. *New Phytologist*, *197*(1), 276–289.

Supplementary information. Table S1. Specimen information of the fig wasps in the *Pegoscapus* genus studied here and UCE data characteristics. N: Number of individuals pooled for DNA extraction. In brackets are the ID of the host before taxonomical changes in Hernandez-Esquivel et al. (2020).

Specimen ID	<i>Ficus</i> host	Locality	N	Raw reads	Contig depth	Total UCEs	UCEs (78%)	Missing percent	AT content	GC content
JRAS01795_0101	<i>tecolutensis</i>	Querétaro, Mexico	1				705	55.57	0.548	0.452
JRAS02175_0189	<i>aurea</i> (<i>jimenezii</i>)	Costa Rica	1				726	16.093	0.582	0.418
JRAS02276_0189	<i>davidsoniae</i>	Costa Rica	1				779	9.891	0.575	0.425
JRAS02284_0189	<i>citrifolia</i>	Costa Rica	1				783	10.879	0.583	0.417
JRAS02824_0195	<i>isophlebia</i>	Costa Rica	1				825	7.717	0.577	0.423
JRAS02829_0389	<i>isophlebia</i>	Costa Rica	1				322	80.937	0.584	0.416
JRAS02871_0189	<i>aurea</i>	Florida, USA	1				670	37.227	0.595	0.405
JRAS05349_0199	(<i>jimenezii</i>) <i>isophlebia</i>	Oaxaca, Mexico	1				793	11.876	0.578	0.422
JRAS05352_0199	(<i>aurea</i>)	Los Tuxtlas, Veracruz, México	1				826	17.497	0.57	0.43
KHER00005_0188	<i>aurea</i>	Grecia, Alajuela, Costa Rica	1	35797	19.874	970	808	15.152	0.573	0.427
KHER00013_0188	<i>tecolutensis</i>	Neblinas, Querétaro, México	1	44656	24.2337	1024	835	9.046	0.575	0.425
KHER00013_0288	<i>tecolutensis</i>	Neblinas, Querétaro, México	1	69481	30.6186	1037	820	5.216	0.577	0.423
KHER00017_0188	<i>tecolutensis</i>	Neblinas, Querétaro, México	1	46256	24.1775	1025	840	11.481	0.573	0.427
KHER00018_0188	<i>aurea</i>	Puerto Plata, República Dominicana	1	47649	22.4675	1027	829	8.762	0.572	0.428
KHER00018_0189	<i>aurea</i>	Puerto Plata, República Dominicana	3	58081	26.1886	1031	824	5.988	0.576	0.424

Specimen ID	<i>Ficus</i> host	Locality	N	Raw reads	Contig depth	Total UCEs	UCEs (78%)	Missing percent	AT content	GC content
KHER00031_0188	<i>aurea</i>	Los Tuxtlas, Veracruz, México	1	13826	10.6508	908	787	37.881	0.56	0.44
KHER00039_0188	<i>cookii</i>	Ocozocoautla, Chiapas, Mexico	1	107797	33.9771	1048	836	9.555	0.574	0.426
KHER00039_0189	<i>cookii</i>	Ocozocoautla, Chiapas, Mexico	3	39676	21.8608	1013	839	9.218	0.573	0.427
KHER00040_0188	<i>cookii</i>	Ocozocoautla, Chiapas, Mexico	1	14723	11.2952	943	811	31.218	0.562	0.438
KHER00041_0189	<i>cookii</i>	Ocozocoautla, Chiapas, Mexico	3	97169	31.3724	1048	832	6.172	0.576	0.424
KHER00044_0188	<i>cookii</i>	Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, Mexico	1	3316	4.41352	580	503	71.479	0.55	0.45
KHER00049_0189	<i>isophlebia</i>	Acayucan, Veracruz, Mexico	1	111882	34.7279	1026	814	6.493	0.58	0.42
KHER00059_0188	<i>isophlebia</i>	Juchitán, Oaxaca, México	1	46253	22.653	979	812	19.541	0.573	0.427
KHER00060_0188	<i>isophlebia</i>	Los Tuxtlas, Veracruz, México	1	59272	26.5402	1037	837	5.799	0.577	0.423
KHER00061_0188	<i>isophlebia</i>	Los Tuxtlas, Veracruz, México	1	15429	11.235	921	798	32.069	0.569	0.431
KHER00062_0188	<i>isophlebia</i>	Los Tuxtlas, Veracruz, México	1	14655	11.6079	902	783	35.58	0.567	0.433
KHER00084_0188	<i>tuerckheimii</i>	San José, Costa Rica	1	36808	14.6758	961	800	20.951	0.57	0.43
KHER00084_0189	<i>tuerckheimii</i>	San José, Costa Rica	1	65511	18.3921	997	806	21.962	0.567	0.433
KHER00084_0288	<i>tuerckheimii</i>	San José, Costa Rica	1	55693	22.1517	994	812	14.753	0.573	0.427
KHER00087_0188	<i>tuerckheimii</i>	San José, Costa Rica	1	42363	14.8453	964	785	21.265	0.572	0.428
KHER00087_0189	<i>tuerckheimii</i>	San José, Costa Rica	3	40991	16.3064	948	788	17.27	0.575	0.425
KHER00096_0188	<i>tuerckheimii</i>	Manantlán, Jalisco, México	1	113521	33.0272	1012	790	9.229	0.577	0.423

Specimen ID	<i>Ficus</i> host	Locality	N	Raw reads	Contig depth	Total UCEs	UCEs (78%)	Missing percent	AT content	GC content
KHER00096_0201	<i>tuerckheimii</i>	Manantlán, Jalisco, México	1	128600	34.9296	1076	824	5.581	0.576	0.424
KHER00102_0188	<i>tuerckheimii</i>	Neblinas, Querétaro, México	1	55101	24.4354	1007	814	8.824	0.577	0.423
KHER00102_0288	<i>tuerckheimii</i>	Neblinas, Querétaro, México	1	58181	18.4233	482	357	62.679	0.575	0.425
KHER00103_0188	<i>tuerckheimii</i>	Neblinas, Querétaro, México	1	5378	5.64355	707	623	61.797	0.546	0.454
KHER00103_0288	<i>tuerckheimii</i>	Neblinas, Querétaro, México	3	70149	22.2708	1025	826	6.743	0.572	0.428
KHER00103_0388	<i>tuerckheimii</i>	Neblinas, Querétaro, México	1	28560	17.8008	993	833	25.942	0.565	0.435
KHER00107_0188	<i>tuerckheimii</i>	Orizaba, Veracruz, Mexico	1	50238	24.2827	1013	826	8.054	0.574	0.426
KHER00107_0288	<i>tuerckheimii</i>	Orizaba, Veracruz, Mexico	1	69701	21.3409	1026	827	24.884	0.558	0.442
KHER00111_0189	<i>tuerckheimii</i>	Orizaba, Veracruz, Mexico	1	94752	24.5141	1035	811	7.647	0.575	0.425

CAPÍTULO V



Ficus cookii, Ilustración en tinta. Karen B. Hernández.

DISCUSIÓN GENERAL

Variación morfométrica y tratamiento taxonómico

Para delimitar especies, se ha promovido el uso de distintos tipos de datos no sólo morfológicos. A este enfoque se le ha llamado taxonomía integrativa, ya que implica la evaluación conjunta de datos genéticos, morfológicos, ecológicos, geográficos, climáticos, y de comportamiento, entre otros (Dayrat, 2005). Con el estudio de variables morfométricas y ecológicas para analizar la variación fenotípica entre las poblaciones del complejo de especies *Ficus aurea*, se determinó que en éste había contenidas un mínimo de cinco especies, que se pueden diferenciar significativamente con base en caracteres de los siconos, la forma de las hojas y sus hábitats (Hernández-Esquivel et al., 2020). Las especies que se reconocen dentro del complejo *F. aurea* son: *F. aurea*, *F. cookii*, *F. isophlebia*, *F. tecolutensis* y *F. tuerkcheimii*. El penúltimo taxón había sido reconocido por Ibarra-Manríquez et al. (2012) con el nombre de *F. rzedowskiana*. De este modo, de las 22 especies de *Ficus* reconocidas en este trabajo para México, se agregan formalmente tres especies.

Como resultado del presente estudio, se reafirma la importancia que tienen las colecciones biológicas en expandir el conocimiento de las especies. La revisión de las colectas realizadas en los sitios de registro de las especies incluidas en el complejo *F. aurea*, que no fue posible visitar en este proyecto, consolidó y reforzó los resultados obtenidos a través de los análisis cuantitativos realizados. La consulta también ayudó a reconocer la existencia de variantes que no coincidieron con las analizadas dentro del complejo *F. aurea* en Hernández-Esquivel et al. (2020). Estos especímenes fueron asociados en el pasado a lo que fue descrito como *Ficus mayana* Lundell y *Ficus lundellii* Standl. Posteriormente fueron designados por Berg (2007) como *Ficus aurea*, posiblemente debido a que presentan brácteas basales que cubren dos tercios del sicono, que es la característica principal de las especies

asociadas al complejo. Sin embargo, en el caso de lo que se puede llamar *F. mayana*, el ostiolo del higo es profundamente crateriforme, lo cual no coincide con las especies descritas en Hernández-Esquivel et al. (2020). Por el contrario, en *F. lundellii* los siconos son de morfología similar a *F. cookii*, pero con tamaños menores y son comparables en este atributo a *F. tecolutensis* (Figura 1).

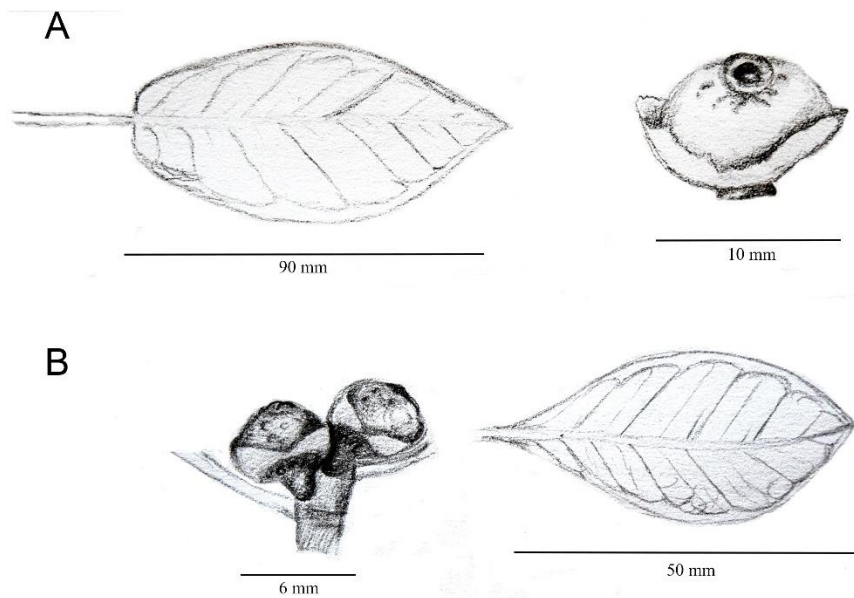


Figura 1. Ilustraciones basadas en A) el ejemplar tipo de *Ficus lundellii* (Lundell 3406) y B) el ejemplar tipo de *Ficus mayana* (Lundell 19266). Ilustración por Karen B. Hernández.

Una delimitación clara de estos ejemplares requiere estudios más detallados, lo cual se podría lograr a través de la integración de datos morfométricos. No obstante, a la fecha la cantidad de colectas es insuficiente para lograr un muestreo estadísticamente representativo basado en ejemplares de herbario (no hay más de cinco especímenes de cada uno, entre el Herbario Nacional de México MEXU y el Herbario del Missouri Botanical Garden MO). También podría hacerse uso de la obtención de datos moleculares, aunque los ejemplares de herbario de *Ficus*, en

general, representan un reto en este sentido. Por ejemplo, para el Capítulo III de este trabajo, fue necesario repetir más de tres veces las extracciones del ADN total, ya que hubo complicaciones en los pasos subsecuentes para la construcción de las bibliotecas genómicas, ya sea por la cantidad o por la calidad del ADN. Varios colegas también han notado dificultades con respecto a la obtención de ADN de buena calidad para estudios genómicos, aunque estas no han sido formalmente documentados. Es necesario, entonces, continuar con exploraciones en la parte de América Central para tener un panorama de lo que queda por ver en este grupo. Además de ello, realizar trabajo de campo contribuiría a fortalecer las colecciones biológicas y a conocer el estado de conservación que tienen las especies actualmente en esa región.

Por otro lado, aún queda trabajo por hacer en cuanto al reconocimiento de caracteres que contribuyan a mejorar la delimitación e identificación de las especies de *Ficus*, tanto del complejo *F. aurea*, como del resto de las especies neotropicales. Tal es el caso de la morfología floral, para la cual DeWolf (1960) señaló que existía poca variación en los *Ficus* neotropicales. Sin embargo, uno de los pocos trabajos que considera la variación floral es el de Ibarra-Manríquez y Wendt, (1992) en el que se presentan descripciones detalladas de los caracteres florales para el subgénero *Pharmacosyceae*, del estado de Veracruz, en las que se observan algunas diferencias de tamaños en cuanto a longitudes de estilo, brácteas y ovarios. Además de variación en el tamaño en las flores de *Ficus*, se ha encontrado que los estigmas también pueden variar en su morfología (Teixeira et al., 2018), aunque esto sólo se ha estudiado a nivel de subgénero y se desconoce qué tanto este atributo pueda variar en especies cercanamente relacionadas. De cualquier modo, lo anterior sugiere que la variación de los atributos florales en *Ficus* podría estar subestimada.

De igual forma, se conoce muy poco acerca de las características anatómicas en los *Ficus* neotropicales. Parra (2014) estudió la anatomía del xilema en especies del subgénero *Spherosuke*, de la sección *Americanae* y de secciones del viejo mundo, sin encontrar diferencias entre las especies que estudió, por lo que no recomienda atributos de la madera para estudios sistemáticos. Sin embargo, Quintanar et al. (2004) documentaron la variación anatómica del xilema de un grupo de moráceas, en su mayoría especies de *Ficus* que son aprovechadas para la elaboración de papel y en éste se pueden apreciar diferencias en la comparación entre especies. No obstante, debido a que el estudio no se enfocó en el uso taxonómico de estos atributos, se analizan marginalmente las diferencias entre los *Ficus*. Comparaciones de la anatomía foliar han sido realizadas en especies de interés medicinal por Araújo et al. (2014), entre las que se encontraron contrastes en varios atributos que podrían ser de utilidad taxonómica. Carvajal & Shabes (2005) describieron, con un enfoque taxonómico, la anatomía de los pecíolos en las especies del género en México; sin embargo, al basarse en ejemplares de herbario, las estructuras pudieron sufrir modificaciones a causa de la desecación. La evidencia aquí vertida señala que es necesario profundizar más en esta área del conocimiento para los *Ficus* neotropicales.

Una tercera fuente de caracteres que podrían ser informativos para la taxonomía de *Ficus* y que han sido inexplorados en las especies neotropicales, son los compuestos volátiles. Los *Ficus* liberan compuestos volátiles en la etapa receptiva de los siconos y éstos son responsables de promover la atracción de las avispas polinizadoras (Hossaert-McKey et al., 1994). Estudios en especies del viejo mundo señalan que existen combinaciones únicas de compuestos volátiles, con lo que también se refuerza la especificidad en las avispas polinizadoras que son atraídas (Grison-Pigeá et al., 2002). Si bien no se sabe qué tanto los compuestos

volátiles podrían variar dentro de una sola especie, investigaciones para determinar si estos atributos podrían usarse en estudios taxonómicos, aún no se han desarrollado.

Filogenómica del complejo *Ficus aurea* y su relación con otros *Ficus* neotropicales

La sistemática es la ciencia que se encarga de clasificar los organismos vivos de acuerdo con sus relaciones filogenéticas. Uno de los principales retos en sistemática es encontrar caracteres que reflejen la historia evolutiva de los grupos taxonómicos (Stevens, 2000) y parte de este problema es que los datos morfológicos, normalmente usados para reconocer especies, no son siempre adecuados para establecer relaciones filogenéticas ni límites claros entre especies (Dayrat, 2005; Choi, 2016).

En el tercer capítulo del presente estudio, se buscó determinar si las especies delimitadas del complejo *F. aurea* por Hernández-Esquivel et al. con base en estudios morfométricos (2020; capítulo 2), reflejaban linajes evolutivos independientes. Los resultados de los análisis filogenómicos basados en datos de RADSeq, tanto con base en datos concatenados como con un enfoque de árbol de especies, mostraron que las especies contenidas en el complejo *F. aurea* pueden separarse en grupos monofiléticos diferenciados. Los clados formados coinciden con la propuesta de Hernández-Esquivel et al. (2020), basada en datos morfométricos y ecológicos. No obstante, el análisis de delimitación de especies recuperó siete grupos genéticos, lo que indica la existencia de siete linajes dentro del complejo *F. aurea*, y no cinco. Con base en estos resultados, la especie *F. aurea*, se divide en dos especies hermanas en con rasgos morfológicos similares, sugiriendo especiación críptica, lo cual no ha sido documentado previamente para

Ficus. También *F. tuerckheimii* podría ser dividida en al menos dos especies, que sí presentan diferencias morfológicas, como muestran las descripciones de Hernández-Esquivel et al. (2020), sobre la variación poblacional de esta especie.

Con base en un análisis de coalescencia se determinó que las especies del complejo *F. aurea* comparten alelos que pudieran provenir de un pasado reciente, indicando eventos de introgresión o hibridación. Todo parece indicar que, a pesar de compartir alelos, las especies dentro del complejo *F. aurea*, se pueden diferenciar genética, ecológica y morfológicamente.

Por otro lado, análisis de datos de RADSeq para 13 especies de *Ficus* que se distribuyen México y dos en República Dominicana, sugieren que el complejo *F. aurea* es monofilético. Se determinó también que *F. petiolaris* es el grupo hermano de las especies analizadas de la sección. Debido a que los *Ficus* neotropicales forman con frecuencia complejos de especies, es necesario realizar análisis con un enfoque más detallado, como el que se realizó en este proyecto con el complejo *F. aurea*. Hay especies para las cuales será necesario realizar actualizaciones taxonómicas; por ejemplo, todas aquellas que se engloban en los complejos mencionados por Berg (2007), varias de las cuales han sido citadas para México. En consecuencia, el número de especies de *Ficus* en el continente podría variar en el futuro.

Este enfoque filogenético regional ha sido útil para evaluar posibles eventos de hibridación, cuando las especies están en simpatría (Jackson et al., 2008). En este trabajo se muestra por primera vez, que a pesar de estar en simpatría, y que existen probables eventos de hibridación, es posible recuperar una filogenia con especies monofiléticas.

Avispas polinizadoras e historia coevolutiva

El Capítulo IV de este estudio contribuye la primera filogenia basada en datos de secuenciación masiva en el género *Pegoscapus*. Los datos obtenidos asemejan mucho a lo que se ha observado al utilizar la región mitocondrial COI (Vázquez-Quintana, 2019). Una de las grandes ventajas que se ha tenido con el uso de captura de secuencias (UCEs) versus COI, es la técnica no destructiva de extracción de ADN que permite preservación de los especímenes y que aún con bajas concentraciones de ADN (<2 ng/μl), se puede obtener una cantidad relevante de datos (Cruaud et al., 2019). Es de gran importancia taxonómica asociar un espécimen de respaldo a sus secuencias genéticas, cuando se descubren nuevas especies a través de estos métodos. Con ello, se puede ligar dicha variación genética con la variación morfológica, al realizar las descripciones de las nuevas especies. Ambos enfoques, genómico y por marcadores, han demostrado que la diversidad de avispas es mucho mayor de la esperada, por lo que es muy probable que aún falten especies por descubrir en el grupo estudiado.

Particularmente, identificar avispas polinizadoras, tanto en la superfamilia Chalcidoide, como en la familia Agaonidae, es complicado debido a su diminuto tamaño y a la presencia de convergencias morfológicas (Cook y Rasplus, 2003; Cruaud et al., 2019). De acuerdo con Janzen et al. (2009), entre más pequeños son los insectos, menor es la selección que favorece caracteres morfológicos visibles que difieren entre linajes evolutivos independientes. En el caso de las avispas parasitoides, lo que se podría encontrar son rasgos distintivos relacionados con la búsqueda o la defensa-tolerancia de sus hospederos (Janzen et al., 2009). No obstante, poder detectar diferencias morfológicas a simple vista, es importante para descartar especies crípticas y enfocar el muestreo para realizar los análisis genómicos.

Para describir la morfología, es necesario un mayor conocimiento del grupo. Al respecto es posible encontrar, al menos, dos aproximaciones. La primera, que se puede llamar tradicional y que es la que ha sido reproducida por taxónomos como Grandi (1919), Ramírez (1963) y Wiebes (1995), que consiste en la disección de los diferentes miembros del cuerpo de las avispas (antenas, mandíbulas, lamela, cabeza, patas, metasoma, ovipositor) y su montaje para realizar observaciones y mediciones a detalle, utilizando microscopios ópticos. Del ejemplar tipo se deben montar todas las piezas que se extraigan, incluyendo aquellas que pudieran romperse (W. Ramírez, comunicación personal). Una segunda forma, es a través del uso de microscopios estereoscópicos conectados a cámaras que permiten hacer diferentes tomas del cuerpo de la avispa, una vez que éste ha sido montado para una colección; en este caso, el ejemplar tipo no tiene que ser disectado. También se pueden incluir observaciones en el microscopio electrónico de barrido (MEB) de especímenes disectados, que correspondan con la misma especie. Esta forma es la que se puede observar en los trabajos de Farache et al. (2013, 2017); Farache y Rasplus (2014) para avispas de higo no polinizadoras.

Por otro lado, se han realizado muy pocos estudios en el sistema mutualista *Ficus-Agaonidae* en el Neotrópico con el objetivo de analizar su historia coevolutiva. Dentro del grupo de especies que se ha estudiado (Machado et al., 2005), no se ha logrado determinar la existencia de una historia coevolutiva debido a que, por un lado, las especies de *Ficus* analizadas muestran un patrón de especies polifiléticas, por lo que es posible que estén ocurriendo eventos de hibridación entre ellas (Jackson et al., 2008). Así mismo, las avispas han mostrado compartir hospederos simpátricos, y se ha logrado reconocer más de una especie de avispa asociada a un hospedero (Machado et al., 2005). En el presente estudio, se determinó que las

especies que integran el complejo *Ficus aurea* comparten eventos de codivergencia con sus avispas polinizadoras del género *Pegoscapus*.

Una prueba rigurosa de coevolución requiere un muestreo exhaustivo de hospederos y sus asociados, hipótesis filogenéticas confiables y bien resueltas, y análisis de fechamiento adecuados (Cruaud y Rasplus, 2016). A partir de este esquema, se puede identificar que para complementar los análisis realizados en el Capítulo IV, son necesarios análisis de fechamiento para contar con la verificación de que los eventos cofilogenéticos detectados ocurrieron de forma simultánea. Entre las limitaciones de los datos genómicos para estimar tiempos de divergencia se encuentran la elevada demanda computacional debido al gran número de datos (McCormack et al., 2013) y la variación en la tasa de heterogeneidad entre genes, la cual puede llevar a la selección errónea de modelos de mutación (Smith et al., 2018).

Amenazas en el mutualismo *Ficus*-Agaonidae y estrategias de estudio para la conservación

Los *Ficus* son una fuente de alimentación permanente a lo largo de todo el año para una gran variedad de animales (e. g. mamíferos, aves, peces) (Shanahan et al., 2001), por lo que contribuyen de forma importante a las comunidades a las que pertenecen. Una de las amenazas más directas sobre la biodiversidad es la fragmentación del hábitat, que ocasiona que las poblaciones rompan su conexión a través de los procesos de dispersión; el aislamiento persistente de poblaciones locales podría llevar a cambios en los rasgos de historias de vida ligadas al mutualismo *Ficus*-Agaonidae (Bronstein et al., 2004). Sin embargo, es probable que el mutualismo sea resiliente en este sentido, ya que se sabe de casos particulares en el Neotrópico en los que las avispas pueden viajar grandes distancias (Nason et al., 1998) y recolonizar poblaciones de hospederos cuando han perdido por

completo la producción de siconos por un huracán; tal es el caso específico de *F. aurea*, en Florida (Bronstein y Hossaert-Mckey, 1995). En el presente trabajo se encontró que las filogenias, tanto de *Ficus*, como de *Pegoscapus*, muestran divergencia genética acorde con regiones geográficas, lo que sugiere un aislamiento natural de las poblaciones. Esto implica que los efectos de la fragmentación podrían aislar aún más a las poblaciones y ocasionar una pérdida de la diversidad genética en los hospederos. Por otro lado, los eventos de duplicación de las avispas polinizadoras detectados en este trabajo, pueden ser una respuesta a los eventos de separación a gran distancia de las poblaciones de los hospederos. Todavía hacen falta estudios que pongan a prueba diferentes condiciones, tanto geográficas, como climáticas, para detectar la capacidad de dispersión de las avispas y su supervivencia, así como estudios sobre la diversidad genética dentro y entre las poblaciones de *Ficus*, especialmente de aquellas especies que están más aisladas o que se encuentran en bajas densidades.

Otra amenaza potencial sobre el mutualismo *Ficus*-Agaonidae es el uso de agroquímicos y pesticidas (Bronstein et al., 2004). Se ha encontrado que los pesticidas afectan la diversidad de polinizadores a escala local, del paisaje y regional (Brittain et al., 2010). La mayor parte de los hábitats de las especies de *Ficus* estudiadas en este trabajo se encuentran en áreas de conservación, normalmente, aledañas a zonas donde se desarrolla la agricultura. Incluso, algunos individuos de *Ficus* pueden encontrarse formando parte de cercas vivas o árboles de sombra para ganado (Hernández-Esquivel et al., 2020). Por ello, es importante realizar estudios a escala de paisaje para conocer lo que ocurre con las avispas polinizadoras y no polinizadoras, cuando los hospederos se encuentran en paisajes fragmentados o bajo usos intensivos (Figura 2), en comparación con aquellos que se encuentran en bosques conservados.

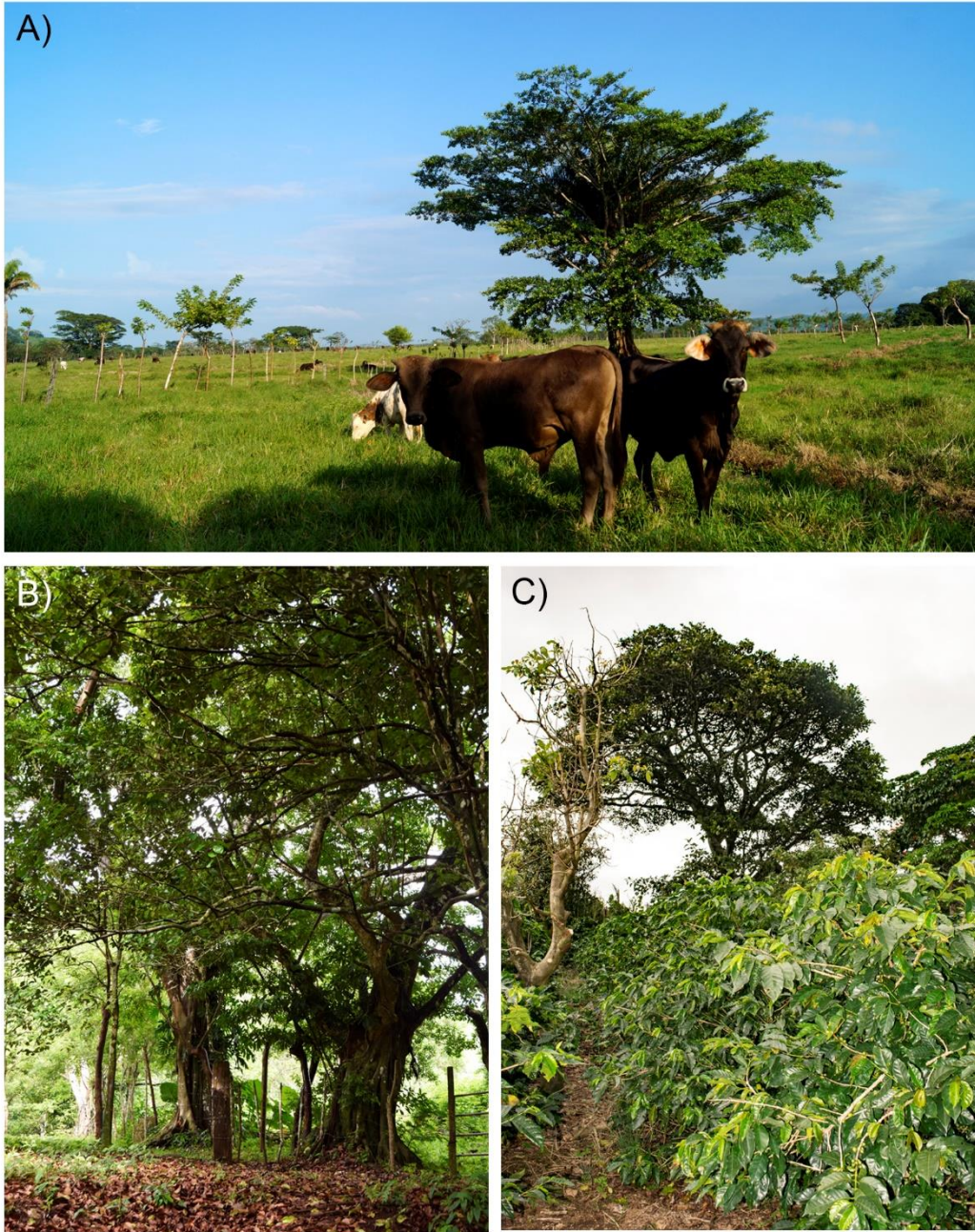


Figura 2. Escenarios distintos de fragmentación del hábitat de especies del complejo *Ficus aurea*. A) *F. isophlebia* como árbol de sombra para ganado en potrero. B) *F. isophlebia* como cerca viva. C) *F. tuerckheimii* en cultivo de café.

Una tercera amenaza para la conservación del mutualismo *Ficus*-Agaonidae es el cambio climático. Poco se sabe acerca de las predicciones a futuro para el

mutualismo. Piatscheck (2019) mostró que las predicciones a futuro, bajo esquemas de cambio climático, deben integrar las condiciones climáticas que favorecen a avispas polinizadoras y no polinizadoras para predecir cambios en el mutualismo. Este autor estimó que para el 2070, la modificación de la distribución de las poblaciones en *F. petiolaris* favorecerá el incremento de las avispas no polinizadoras, lo que iría en detrimento de las avispas polinizadoras. Estas predicciones se dan en el contexto de una especie que se distribuye en bosques estacionalmente secos, pero es posible que patrones distintos emerjan al analizar especies que se distribuyen en bosques perennifolios o de alta montaña. Debido a estas diferencias en el hábitat, se retoma la importancia del estudio taxonómico aquí realizado, puesto que las predicciones climáticas a futuro y estudios de conservación no serán igualmente dirigidos si se toman en cuenta las distribuciones de cinco o siete especies a que si se considerara a *F. aurea* como una especie de amplia distribución.

CONCLUSIONES

De acuerdo con una revisión realizada por Cornwell et al. (2019), del total de nombres de especies de plantas aceptados (350,699), se conocen datos geográficos para ca. 105 mil especies; datos genéticos sólo para 38,605; datos funcionales para 56,165 y para el 26.7 % no se conoce nada más que un nombre. Para Hymenoptera, se estiman entre cuatro y seis millones de especies (Ulrich, 1999), pero se desconocen las estimaciones sobre la disponibilidad de datos funcionales y genéticos para sus especies. El presente trabajo es una contribución al conocimiento taxonómico, sistemático, ecológico y evolutivo de dos grupos importantes, *Ficus* y *Pegoscapus*, los cuales mantienen un mutualismo. Se ofrecen nuevas formas de analizar los rasgos morfológicos de las especies de *Ficus*, se

reconocen nuevos caracteres que pueden ser útiles para la identificación de las especies y se estiman asociaciones de éstos con variables ambientales, por lo que es una contribución en la parte taxonómica y funcional. Se establece la primera filogenia del complejo *F. aurea*, y una de las primeras filogenias resueltas para un grupo de *Ficus* neotropicales. Para las avispas *Pegoscapus*, este estudio aporta la primera filogenia con datos genómicos. Este estudio también es una contribución al conocimiento de los patrones coevolutivos que ocurren en este importante mutualismo en el neotrópico. Por todo lo anterior, este trabajo reestructura las bases de nuestro entendimiento del mutualismo entre *Ficus* y sus avispas polinizadoras y ofrece soluciones a problemas taxonómicos, ecológicos y evolutivos relacionados al mismo, que habían permanecido sin solución durante décadas. Con ello, se espera que este trabajo promueva la integración de diferentes disciplinas que contribuyan a un mejor entendimiento de la diversidad y los procesos que pueden incidir en el mutualismo entre *Ficus* y las avispas que los polinizan.

REFERENCIAS

- Araújo, N. D., V. P. M. Coelho, M. C. Ventrella, y M. de Fátima Agra. 2014. Leaf anatomy and histochemistry of three species of *Ficus* sect. *Americanae* supported by light and electron microscopy. *Microscopy and Microanalysis* 20: 296–304.
- Avice, J. C. 2000. Phylogeography. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Berg, C. C. 2007. Proposals for treating four species complexes in *Ficus* subgenus *Urostigma* section *Americanae* (Moraceae). *Blumea - Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants* 52: 295–312.
- Brittain, C. A., M. Vighi, R. Bommarco, J. Settele, y S. G. Potts. 2010. Impacts of a pesticide on pollinator species richness at different spatial scales. *Basic and Applied Ecology* 11: 106–115.

- Bronstein, J. L., U. Dieckmann, y L. Hordijk. 2004. Coevolutionary Dynamics and the Conservation of Mutualisms.
- Bronstein, J. L., y M. Hossaert-Mckey. 1995. Hurricane Andrew and a Florida fig pollination mutualism: resilience of an obligate interaction. *Biotropica* 27: 373–381.
- Carvajal, S., y L. K. Shabes. 2005. Estructura anatómica de los pecíolos de especies americanas del género *Ficus* L. (Moraceae). *Ibugana* 13: 49–66.
- Chifman, J., y L. Kubatko. 2014. Quartet inference from SNP data under the coalescent model. *Bioinformatics* 30: 3317–3324.
- Choi, S. C. 2016. Methods for delimiting species via population genetics and phylogenetics using genotype data. *Genes & Genomics* 38: 905–915.
- Cook, J. M., y J. Y. Rasplus. 2003. Mutualists with attitude: Coevolving fig wasps and figs. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 241–248.
- Cornwell, W. K., W. D. Pearse, R. L. Dalrymple, y A. E. Zanne. 2019. What we (don't) know about global plant diversity. *Ecography* 42: 1819–1831.
- Cruaud, A., S. Nidelet, P. Arnal, A. Weber, L. Fusu, A. Gumovsky, J. Huber, et al. 2019. Optimized DNA extraction and library preparation for minute arthropods : Application to target enrichment in chalcid wasps used for biocontrol. *Molecular Ecology Resources* 19: 702–710.
- Cruaud, A., y J.-Y. Rasplus. 2016. Testing cospeciation through large-scale cophylogenetic studies. *Current Opinion in Insect Science* 18: 53–59.
- Dayrat, B. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 407–415.
- DeWolf, G. P. 1960. Moraceae. In R. E. Woodson, and R. W. Schery [eds.], Flora of Panama, 146–165. *Annals of the Missouri Botanical Garden*.

- Farache, F. H. A., A. Cruaud, G. Genson, R. A. S. Pereira, y J. Y. Rasplus. 2013. Taxonomic revision and molecular phylogeny of the fig wasp genus *Anidarnes* Bouček, 1993 (Hymenoptera: Sycophaginae). *Systematic Entomology* 38: 14–34.
- Farache, F. H. A., A. Cruaud, G. Genson, J. Y. Rasplus, y R. A. S. Pereira. 2017. Taxonomic revision and molecular phylogenetics of the *Idarnes incertus* species-group (hymenoptera, agaonidae, sycophaginae). *PeerJ* 2017: e2842.
- Farache, F. H. A., y J. Y. Rasplus. 2014. Revision of the Australasian genus *Pseudidarnes* Girault, 1927 (Hymenoptera, Agaonidae, Sycophaginae). *ZooKeys* 404: 31–70.
- Fujita, M. K., F. T. Burbrink, J. A. McGuire, A. D. Leache, y C. Moritz. 2012. Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution* 27.
- Grandi, G. 1919. Contributo alla conoscenza degli Agaonini (Hymenoptera-Chalcididae) dell'America. *Bollettino del Laboratorio di zoologia generale e agraria della R. Scuola superiore d'agricoltura in Portici* 13: 15–59.
- Grisson-Pigeá, L., M. Hossaert-Mckey, J. M. Greeff, y J.-M. Bessière. 2002. Fig volatile compounds-a first comparative study. *Phytochemistry* 61: 61–71.
- Hernández-Esquivel, K. B., E. M. Piedra-Malagón, G. Cornejo-Tenorio, L. Mendoza-Cuenca, A. González-Rodríguez, E. Ruiz-Sánchez, y G. Ibarra-Manríquez. 2020. Unraveling the extreme morphological variation in the neotropical *Ficus aurea* complex (subg. *Spherosuke*, sect. *Americanae*, Moraceae). *Journal of Systematics and Evolution* 58: 1–19.
- Hossaert-Mckey, M., M. Gibernau, y J. E. Frey. 1994. Chemosensory attraction of fig wasps to substances produced by receptive figs. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 70: 185–191.

- Ibarra-Manríquez, G., G. Cornejo-Tenorio, N. González-Castañeda, and E. M. Piedra-Malagón. 2012. El género *Ficus* L. (Moraceae) en México. *Botanical Sciences* 90: 389–452.
- Ibarra-Manríquez, G., y T. L. Wendt. 1992. El género y, subgénero *Pharmacosycea* (Moraceae) en Veracruz, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 52: 3–29.
- Jackson, A. P., C. A. Machado, N. Robbins y E. A. Herre. 2008. Multi-locus phylogenetic analysis of neotropical figs does not support co-speciation with the pollinators: The importance of systematic scale in fig/wasp cophylogenetic studies. *Symbiosis*, 45, 1–16.
- Janzen, D. H., W. Hallwachs, P. Blandin, J. M. Burns, J.-M. Caudiou, I. Chacon, T. Dapkey, et al. 2009. Integration of DNA barcoding into an ongoing inventory of complex tropical biodiversity. *Molecular Ecology Resources* 9: 1–26.
- Machado, C. A., N. Robbins, M. T. P. Gilbert, y E. A. Herre. 2005. Critical review of host specificity and its coevolutionary implications in the fig/fig-wasp mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 Suppl: 6558–6565.
- McCormack, J. E., S. M. Hird, A. J. Zellmer, B. C. Carstens, y R. T. Brumfield. 2013. Applications of next-generation sequencing to phylogeography and phylogenetics. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 66: 526–538.
- Nason, J. D., E. a Herre, y J. L. Hamrick. 1998. The breeding structure of a tropical keystone plant resource. *Nature* 5504: 1996–1998.
- Parra, J. E. 2014. Xylem secondary anatomy in six species of *Ficus* L. (Moraceae) from Mérida city, Venezuela. *Acta Botánica Venezuelana* 37: 165–176.
- Piatscheck, F. 2019. Past, present and future: Geographic and temporal variation in a fig – fig wasp mutualism. PhD dissertation. Iowa State University.

- Quintanar, A., J. Luis, Z. Castrejón, C. López, e I. H. Salgado-Ugarte. 2004. Anatomía e histoquímica de la corteza de cinco especies de Moraceae. *Polibotánica* 17: 15-38.
- Ramírez, W. 1963. Taxonomic and biological studies of Neotropical fig wasps. *The University of Kansas science bulletin* XLIV: 1902–1996.
- Rosenberg, N. A., y M. Nordborg. 2002. Genealogical Trees, coalescent theory and the analysis of genetic polymorphisms. *Nature Reviews Genetics* 3: 380–390.
- Shanahan, M., S. So, S. G. Compton, y R. Corlett. 2001. Fig-eating by vertebrate frugivores: a global review. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 76: 529–572.
- Smith, S. A., J. W. Brown, y J. F. Walker. 2018. So many genes, so little time: A practical approach to divergence-time estimation in the genomic era. *PLoS ONE* 13: e0197433.
- Stevens, P. F. 2000. Botanical Systematics 1950-2000: Change, Progress, or Both? *Taxon* 49: 635.
- Teixeira, S. P., M. F. B. Costa, J. P. Basso-Alves, F. Kjellberg, y R. A. S. Pereira. 2018. Morphological diversity and function of the stigma in *Ficus* species (Moraceae). *Acta Oecologica* 90: 117–131.
- Ulrich, W. 1999. The numbers of species of Hymenoptera in Europe and assessment of the total number of Hymenoptera in the world. *Polskie Pismo Entomologiczne*, 68, 151–164.
- Vázquez-Quintana, P. 2019. Relaciones filogenéticas y patrones de diversificación de las avispa polinizadoras del complejo *Ficus aurea*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Wiebes, J. T. 1995. *The New World Agaoninae (pollinators of figs)*. Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, Amsterdam.