



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE CIENCIAS

**Variación geográfica y límite de especies en *Ternstroemia lineata* DC. y  
*Ternstroemia tepezapote* Schldl. et Cham. (Ternstroemiaceae)**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**OTHÓN ALCANTARA AYALA**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MERCEDES ISOLDA LUNA VEGA  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTORAL: DRA. HELGA OCHOTERENA BOOTH  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA  
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES CAMPUS  
MORELIA, UNAM



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE CIENCIAS

**Variación geográfica y límite de especies en *Ternstroemia lineata* DC. y  
*Ternstroemia tepezapote* Schldl. et Cham. (Ternstroemiaceae)**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**OTHÓN ALCANTARA AYALA**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MERCEDES ISOLDA LUNA VEGA  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM

COMITÉ TUTORAL: DRA. HELGA OCHOTERENA BOOTH  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA  
ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES CAMPUS  
MORELIA, UNAM

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISIÓN ACADÉMICA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO  
OFICIO FCIE/DAIP/408/2020  
ASUNTO: Oficio de Jurado

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
P r e s e n t e.

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Evolutiva, Ecología, Manejo Integral de Ecosistemas y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **27 de abril de 2020** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **ALCÁNTARA AYALA OTHÓN** con número de cuenta **87525560** con la tesis titulada: "**Variación geográfica y límite de especies en Ternstroemia lineata DC. y Ternstroemia tepezapote Schldl. et Cham. (Ternstroemiaceae)**", realizada bajo la dirección de la **DRA. MERCEDES ISOLDA LUNA VEGA:**

Presidente:	<b>DRA. TERESA MARGARITA TERRAZAS SALGADO</b>
Vocal:	<b>DRA. SUSANA VALENCIA ÁVALOS</b>
Secretario:	<b>DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA</b>
Suplente:	<b>DR. ANTONIO GONZÁLEZ RODRÍGUEZ</b>
Suplente:	<b>DR. DAVID NAHUM ESPINOSA ORGANISTA</b>

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

**A T E N T A M E N T E**  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 05 de octubre de 2020

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al apoyo económico recibido por CONACYT al otorgamiento de la beca para la realización de mis estudios con el número 245683 y a los proyecto de PAPIIT con los números IV201015 y IN215914.

Al Tutor Principal y miembros del Comité Tutorial:

Dra. Mercedes Isolda Luna Vega

Dra. Helga Ochoterena Booth

Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

A la Dra. Mercedes Isolda Luna por su eterna paciencia y apoyo y sus siempre sabios consejos, a los Doctores Helga Ochoterena y Ken Oyama su apoyo, revisiones y valiosas sugerencia para enriquecer este trabajo. De manera especial a los consejos y apoyo incondicional del Dr. Ken.

A las sugerencias para este trabajo, apoyo en la realización de análisis y la ayuda en trabajo de campo de las siguientes personas: Andrés Torres-Miranda, Hernán Alvarado-Sizzo, Celia Sanginés, Rito Vega, Antonio Solís, Francisco Maradiaga, Armando Ponce, Mario Véliz, Dagoberto Alavez and Andrés González. Al Dr. Ramón Cuevas las facilidades para acceder a la Reserva de Manantlán.

De manera especial al Dr. Alvarado-Sizzo, su ayuda en la realización e interpretación de algunos análisis, pero sobre todo su constante aliento fueron factores muy importantes en la conclusión de este trabajo.

Gracias a todos.

## **DEDICATORIA**

A los dos motores de mi vida:

Aquetzalli y Ameyalli mis dos más grandes amores.



## ÍNDICE

Resumen .....	1
Abstract .....	4
Introducción general.....	6
Capítulo I. Alcántara-Ayala O, Oyama K, Ríos-Muñoz C, Rivas G, Ramirez-Barahona S, Luna-Vega I. 2020. Morphological variation of leaf traits in the <i>Ternstroemia lineata</i> species complex (Ericales: Pentaphylacaceae) in response to geographic and climatic variation. PeerJ 8: e8307 <a href="http://doi.org/10.7717/peerj.8307">http://doi.org/10.7717/peerj.8307</a> .....	16
Capítulo II. Othón Alcántara-Ayala, Hernán Alvarado-Sizzo, Helga Ochoterena Boot, Ken Oyama, César Ramiro Martínez-González and Isolda Luna-Vega (2020) Estructura genética, variación geográfica y delimitación de especies en el complejo de especies <i>Ternstroemia lineata</i> DC. (Pentaphylacaceae). En proceso.....	43
Capítulo III. Othón Alcántara-Ayala, Andrés Torres-Miranda, Isolda Luna-Vega and Ken Oyama (2020) Morphological differentiation among populations of <i>Ternstroemia tepezapote</i> Schldl. & Cham. (Ericales: Pentaphylacaceae). En revisión.....	74
Discusión general y Conclusiones.....	133
Referencias Bibliográficas .....	150

## RESUMEN

La variación geográfica de las especies es una fuente inagotable de información que ayuda a inferir los mecanismos evolutivos que subyacen a la estructura geográfica de las poblaciones. En evolución, es interesante descubrir la ocurrencia de covariación entre caracteres de organismos que habitan un área determinada y poner a prueba indirectamente hipótesis sobre el papel de diferentes factores ecológicos o geográficos en la formación de variación de estos caracteres biológicos entre poblaciones. Éste es el tema de investigación tratado en el capítulo 1, dónde nos planteamos la pregunta de si los patrones de variación morfológica geográfica encontrados en el complejo de especies de *Ternstroemia lineata*, presentan alguna relación con los factores ambientales de los sitios donde se ubican.

Las poblaciones del complejo *T. lineata* muestran una gran variación en cuanto a los caracteres morfológicos foliares a través de su intervalo distribucional. Los análisis permitieron definir nueve grupos morfológicamente homogéneos dentro del complejo y definir sus distribuciones geográficas. Algunos de los grupos geográficos encontrados son consistentes con el estatus taxonómico aceptado actualmente, pero otros no tienen una clara asociación con la circunscripción taxonómica actual. Los resultados de este trabajo muestran que existe una fuerte correlación entre la morfología de la hoja y variables medioambientales.

La taxonomía de *Ternstroemia* en México es muy compleja y está mal entendida. De acuerdo con las revisiones de los especialistas del grupo existen en el país un total de ocho especies, aunque realmente no hay un consenso al respecto, ya que hay discusión sobre el verdadero estatus de algunas de ellas por ejemplo está el caso de *T. dentisepala*. Por lo que es necesario llevar a cabo estudios de diferente índole (genéticos, ecológicos, morfológicos, etc.) para poder delimitar a las especies mexicanas, que no se basen exclusivamente en la mera descripción de caracteres de morfología externa, caracteres que son muy escasos en los ejemplares de herbario. El tema de estudio presentado en el capítulo II es delimitar las especies del complejo de *Ternstroemia lineata* utilizando métodos de agrupamiento genéticos. Nuestra hipótesis es que el complejo *T. lineata* está formado por más de tres linajes, que son más de las que tradicionalmente se aceptan.

Los resultados del trabajo de este capítulo muestran que el enfoque multiloci empleado, a pesar de integrar evidencias de diferentes compartimentos genómicos (núcleo, mitocondria y cloroplasto) no es suficientemente informativo para concluir sobre los límites específicos del complejo. Por otra parte, esta aproximación evidenciar la existencia de linajes comunes a varias especies del complejo.

La aproximación filogeográfica, al emplear un mayor número de individuos permite vislumbrar escenarios históricos comunes entre *Ternstroemia lineata* y *T. dentisepala*, sin embargo, el umbral que define a la segunda como subespecie de la primera necesita el empleo de otros marcadores que proporcionen una mayor información filogenética así como la puesta a prueba de escenarios demográficos explícitos.

La formación de grupos soportados de *T. impressa* y *T. chalicophila* con los métodos tanto filogenéticos como filogeográficos evidencian su estatus de especies. Adicionalmente, el método filogeográfico permitió determinar que *T. chalicophila* se compone tanto de linajes muy divergentes entre sí más linajes comunes en el complejo y no de especies crípticas.

En el capítulo 3, el tema de estudio es caracterizar ambientalmente y morfológicamente las poblaciones de *T. tepezapote* s.s. (una especie mesoamericana con problemas en su delimitación taxonómica) de *T. tepezapote* s.l. Una pregunta a responder fue si existen rompimientos morfológicos entre y dentro de ellas basados en sus diferencias ambientales. Se examinó e identificó la segregación ambiental de estas poblaciones basada en sus nichos fundamentales delimitados utilizando técnicas multivariadas. El grado de diferenciación morfológica en hojas, flores (sépalos) y frutos fueron cuantificados en el grupo ambiental definido como *T. tepezapote* s.l. a lo largo de su distribución geográfica en México. Se identificaron tres grupos ambientales de las poblaciones mexicanas. El análisis morfométrico del fruto mostró una evidente discriminación entre los tres grupos ambientales. Resultados similares se obtuvieron de los análisis morfométricos de hojas y flores (sépalos), aunque con menos significancia estadística. El análisis de la morfometría del fruto detectó los cinco subgrupos ambientales previamente identificados. Los análisis morfológicos tradicionales produjeron resultados similares reforzando nuestros resultados. Finalmente se concluye que sólo las poblaciones del norte de Veracruz (Tecolutla, Chontla

y alrededores) de latitudes bajas podrían considerarse como *Tenstroemia tepezapote* s.s. Algunas otras poblaciones necesitarían renombrarse, de ser necesario para reconsiderar algunas de las primeras sinonimias propuestas como entidades taxonómicas válidas.

## ABSTRACT

The geographic variation of the species is an inexhaustible source of information that helps to infer the evolutionary mechanisms that underlie the geographic structure of populations. In evolution, it is interesting to discover the occurrence of covariation between characters of organisms that inhabit a certain area and indirectly to test hypotheses about the role of different ecological or geographical factors in the formation of variation of these biological characters between populations. The latter is the objective of Chapter 1, where we test whether the patterns of geographic variation found in the *Ternstroemia lineata* species complex is somehow associated to the environmental factors of the sites where they are located.

The populations of the *T. lineata* complex show great variation in terms of foliar morphological characters throughout their distribution interval. Our analyzes allowed to define nine morphologically homogeneous groups within the complex and to define their geographical distributions. Some of the geographic groups found are consistent with the currently accepted taxonomic status (Kobuski, 1942; Bartholomew & McVaugh, 1997). Other results of this work show a strong correlation between leaf morphology and environmental variables.

The taxonomy of *Ternstroemia* in Mexico is very complex and poorly understood. According to the reviews of the group's specialists (Kobuski 1942, Bartholomew 1988 and Bartholomew and McVaugh 1997), there are eight species in the Mexico, although there is really no consensus in this regard, since there is discussion about the true status of some of them, such as *T. dentisepala* (González-Villarreal 2001). Therefore, it is necessary to carry out studies of different kinds to be able to separate the Mexican species, which are not based exclusively on the mere description of the external morphological characters, which are scarce in herbarium specimens. The objective of this study, which is presented in Chapter II is to delimit *Ternstroemia lineata* complex species using genetic grouping methods. Our hypothesis is that the *T. lineata* complex is made up of more than three lineages, which are more than those traditionally managed.

The results of this chapter showed that the multiloci approach used, despite integrating evidence from different genomic compartments (nucleus, mitochondria, and chloroplast), is

not informative enough to conclude on the specific limits of the complex. However, this approach evidences the existence of common lineages among the species of the complex.

The phylogeographic approach, by employing a greater number of individuals, allowed to glimpse common historical scenarios between *T. lineata* and *T. dentisepala*. However, the threshold that defines the latter as a subspecies of the former requires the use of additional markers that might provide a greater phylogenetic informativity as well as the testing of explicit demographic scenarios.

The formation of supported groups of *T. impressa* and *T. chalicophila* using both phylogenetic and phylogeographic methods demonstrate their species status. Additionally, the phylogeographic method made it possible to determine that *T. chalicophila* is made up of two very divergent lineages instead of cryptic species. Additionally, intra-specific alleles were also found.

In Chapter 3, the objective of the study is to characterize the populations of *T. tepezapote* s.s. (a Mesoamerican species with problems in its taxonomic delimitation) of *T. tepezapote* s.l. and we analyze if there are morphological breaks between and within them based on their environmental differences. We examined and identified the environmental segregation of these populations based on their defined fundamental niches using multivariate techniques. The degree of morphological differentiation of leaves, flowers (sepals) and fruits were quantified in the environmental group defined as *T. tepezapote* s.l. throughout its geographical distribution in Mexico. Three environmental groups of the Mexican populations were identified. The morphometric analysis of the fruit showed an evident discrimination among the three environmental groups. Similar results were obtained from the morphometric analyzes of leaves and flowers (sepals), although with lesser statistical significance. Fruit morphometry analysis detected the five previously identified environmental subgroups. Morphological analyzes produced similar results supporting our results. Finally, we conclude that only the populations of northern Veracruz (Tepetzintla, Chontla and surroundings) of low latitudes could be considered as *Tenstroemia tepezapote* s.s. Some other populations still require to be renamed, if necessary to reconsider some of the first synonyms proposed as valid taxonomic entities.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Los patrones de variación geográfica son una fuente inagotable de información, la cual si se interpreta correctamente, representa una herramienta eficaz para descubrir mecanismos evolutivos que subyacen a la estructura geográfica de las poblaciones. En evolución, una parte interesante de los análisis de variación geográfica reside en descubrir la ocurrencia de covariación entre caracteres de organismos que habitan una área determinada e indirectamente para poner a prueba hipótesis sobre el papel de diferentes factores ecológicos o geográficos en la formación de variación de estos caracteres biológicos entre poblaciones (Donatella, et al., 1997). Los estudios de variación geográfica ayudan a entender diferentes aspectos de la evolución, por ejemplo, cómo actúan las fuerzas microevolutivas y los procesos de especiación, así como a entender mejor los conceptos de especie, la naturaleza de las especies y a explicar la gran diversidad de especies.

Los estudios que integran descripciones cuantitativas de la variación con la ecología molecular, la filogenética molecular, los estudios de campo y la evaluación de hipótesis cuantitativas han permitido entender los factores causantes de la variación geográfica y su relación con la especiación. Todo esto se ha facilitado en los últimos tiempos gracias a una amplia disponibilidad de nuevas técnicas en la investigación, tales como la variación en las secuencias de DNA y los avances conceptuales en relación con el papel de los factores históricos en la ecología (Thorpe, 2002).

Los datos moleculares se han convertido en una fuente de caracteres importante para establecer hipótesis filogenéticas, lo que ha llevado a un incremento explosivo en estudios de sistemática y genética de poblaciones (Avise, 2000), enfocados en definir el estatus

taxonómico de especies o poblaciones de una especie, asumiendo que las especies taxonómicas generalmente reflejan las entidades evolutivas cuyo origen deseamos explicar, aunque esto no necesariamente es así, ya que el número e identidad de especies taxonómicas en un grupo depende del taxónomo quien las describe y las opiniones pueden variar. Taxonomía del género *Ternstroemia* La familia que originalmente comprende a este género fue reconocida por primera vez por Mirbel (1813), quien separó a sus elementos en dos grupos: las Theaceae (*Thea* y *Camellia*) y Ternstroemieae (*Ternstroemia* y *Freziera*). Don (1925) une a estos dos grupos dentro del nombre de Theaceae, aunque algunos autores siguieron nombrándola Ternstroemiaceae.

Según Cronquist (1981) Theaceae estaba compuesta de cuatro subfamilias: Ternstroemioideae, Bonnetioideae, Theoideae y Asteropeioideae, aunque Keng (1961) sugiere que sólo se compone de dos: Ternstroemioideae (que incluye las tribus Ternstroemieae, Adinandrieae y Sladenieae), y Camellioideae (compuesta por las tribus Stuartieae, Gordonieae y Camellieae). La subfamilia Ternstroemioideae se diferencia de las demás por sus anteras elongadas, embrión generalmente curvo y fruto abayado o seco e indehiscente.

A la luz de los recientes estudios moleculares, algunos taxones anteriormente incluidos en Theaceae se transfirieron a otras familias y se segregó la familia Ternstroemiaceae (APGII, 2003; Stevenson and Stevenson, 2004; Weitzman et al., 2004; Schönenberger, 2005).

Estos estudios muestran que Theaceae s.l. no es un grupo monofilético y se ha sugerido que Ternstroemiaceae s.s. comparte un ancestro común con Pentaphragaceae y



Sladeniaceae, y que estas tres familias podrían considerarse como tales (Prince 2001; Luna-Vega y Ochoterena, 2004; Ochoterena y Luna-Vega en prep).

Ternstroemiaceae s.s. puede reconocerse por sus flores solitarias, estambres con el conectivo extendido en una pequeña protrusión (excepto en *Ternstroemia*) y fruto abayado (con excepción de *Balthasaria*). Mientras que Theaceae s.s. comparte un ancestro común con Actinidiaceae-Roridulaceae-Serraceniaceae y Styracaceae-Diapensiaceae+Symlocaceae. Theaceae s.s. puede reconocerse por sus vasos muy largos, estomas del tipo paracítico y flores solitarias (Luna-Vega y Ochoterena 2004).

Hasta el momento, sigue existiendo controversia acerca del nombre correcto de la familia en la cual se ubica *Ternstroemia*. De acuerdo con algunos autores el nombre correcto es Pentaphylacaceae (Stevens 2008 onwards, APGIV; 2016), sin embargo, otros consideran que el nombre correcto sería Ternstroemiaceae (Luna-Vega y Ochoterena 2004), debido al principio de prioridad en nomenclatura botánica.

El género *Ternstroemia* (nombre dedicado al botánico sueco Ternstroem (Conzatti, 1903) es el que posee un mayor número de especies dentro de la familia, con aproximadamente 130 especies que se distribuyen principalmente en las zonas tropicales de ambos hemisferios, desde América del Sur a México, incluyendo a las Antillas y la región Indomalaya hasta este de Asia y Nueva Guinea; una especie está presente en África Tropical.

El género *Ternstroemia* fue propuesto por primera vez por Mutis in Linnaeus f., *Supplementum Plantarum*, 39. 1781 (Kobuski, 1942). Otros nombres que han sido acuñados a él son *Taonabo* Aubl. (1775), *Dupinia* Scop. (1777), *Hoferia* Scop. (1777),

Tonabea Jussieu (1789), Amphania Banks (1821), Reinwardtia Korthals (1840), Llanosia Blanco (1845), Erythrochiton Griff. (1846), Voelckeria Klotzsch et H. Karst. (1850), Mokofua O. Kuntze (1891) y Adinandrella Exell (1927).

De acuerdo con el principio de prioridad el nombre válido sería Taonabo, el cual fue utilizado por varios autores como Standley (1926); sin embargo, Ternstroemia fue aceptado por el Congreso del Código Internacional de Nomenclatura como "nomen conservandum", rechazando así a Taonabo como nombre válido.

Este género fue estudiado especialmente por Kobuski (1942, 1943, 1961, 1963) para América, África y Asia, por Urban (1896) para las Antillas y por Wawra (1866) para Brasil. El primer autor logró una excelente monografía del género (Kobuski, 1942). Ternstroemia Mutis ex L.f, es un género sumamente heterogéneo desde el punto de vista taxonómico, por lo que ha tenido un gran número de sinónimos (Luna-Vega y Villaseñor, 1996). Se distribuye en los trópicos y subtropicos del mundo. Se calcula que este género cuenta con 110-160 especies en total; 50-70 especies habitan en el Neotrópico (Weitzman 1995). Kobuski (1942) separó a las especies neotropicales en tres grupos geográficos: de México a América Central, Las Antillas y América del Sur, todas ellas hermafroditas. De acuerdo con Kobuski (1942) las especies de Sudamérica presentan caracteres que son mucho más claramente distintivos y consistentes para la delimitación de especies, en cambio las descripciones de muchas de las especies de México y América Central, están basadas sólo en un carácter extremadamente variable.

En un estudio areográfico de las Ternstroemiaceae de México Luna-Vega et al. (2004) proponen que en el país existen aproximadamente ocho especies de este género, cinco de ellas endémicas (v. gr. Ternstroemia dentisepala, T. huasteca, T. lineata subsp.

lineata, *T. oocarpa* y *T. sylvatica*) y tres rebasan su frontera al sur hasta Honduras y Panamá (*T. lineata* subsp. *chalicophila*, *T. seemannii* y *T. tepezapote*).

En la mayoría de los casos, estas especies están geográficamente bien localizadas, *T. dentisepala* hacia la parte noroccidental del país, *T. huasteca* y *T. sylvatica* con una distribución principal en la parte oriental, *T. oocarpa* y *T. seemannii* en el sur. *Ternstroemia lineata* con dos subespecies tiene una distribución más amplia con *T. lineata* subsp. *lineata* en la Faja Volcánica Transmexicana incluyendo Los Tuxtlas en Veracruz, en la Sierra Madre del Sur y serranías chiapanecas y *T. lineata* subsp. *chalicophila* con una distribución en Chiapas, Guatemala y Honduras. Por su parte *T. tepezapote* tiene una distribución principalmente en la porción oriental del país siguiendo hacia el sur hasta alcanzar Nicaragua.

El género en México presenta problemas taxonómicos principalmente en cuanto a la delimitación de sus especies, por ejemplo, Pool (2001) ha sugerido que *T. seamannii* es un sinónimo de *T. tepezapote*, lo que a su vez ha generado problemas con la identificación de sus especies y consecuentemente no existe información confiable acerca de los límites de distribución de cada una de sus especies (Luna-Vega et al., 2004).

## Objetivos

La covariación entre caracteres de organismos que habitan una área determinada, es un fenómeno muy interesante desde un punto de vista evolutivo, ya que permite poner a prueba hipótesis cómo por ejemplo el papel que juegan los diferentes factores ecológicos o geográficos en la formación de la variación y diversidad biológica y en cómo surgen nuevas especies. Entender ésto representa una gran ayuda para la sistemática de ciertos grupos de organismos en los cuales resulta difícil la correcta delimitación de sus especies sobre todo en aquellas especies conocidas como crípticas. El estudio de la variación, hoy día no sólo se

basa en la comparación de caracteres morfológicos cómo tradicionalmente se venía haciendo sino que utiliza todo tipo de evidencia, empleando información de distinta índole (genéticos, ecológicos, morfológicos, etc.). Dos tipos de evidencias que recientemente se utilizan como excelentes complementos de la morfología es el análisis de datos moleculares (secuencias, microsátélites, entre otros) y la información ambiental, cómo por ejemplo sus nichos fundamentales.

#### Objetivo General

Analizar la variación geográfica en las entidades que conforman dos complejos de especies del género *Ternstroemia*, con el propósito de contribuir en la delimitación de las entidades taxonómicas que conforman cada complejo.

#### Objetivos particulares

- a) Identificar patrones variación de caracteres foliares en el complejo de especies de *Ternstroemia lineata* y la relación que presentan con los factores ambientales de los sitios donde se distribuyen.
- b) Delimitar las especies del complejo de *Ternstroemia lineata* utilizando métodos de agrupamiento genéticos.
- c) Caracterizar ambientalmente y morfológicamente las poblaciones de *T. tepezapote* s.s. (una especie mesoamericana con problemas en su delimitación taxonómica) de *T. tepezapote* s.l.

#### Métodos utilizados

Para estudiar la variación morfológica foliar se colectaron muestras de 270 individuos de 32 poblaciones, se midieron y analizaron nueve caracteres foliares utilizando un vernier . Se realizó un análisis de componentes principales utilizando el programa Statistica (Statsoft Inc, 2009) para seleccionar los caracteres morfológicos foliares con más información y varianza y a partir de los cuales se generaron mapas de interpolación espacial utilizando la extensión Geostatistical Analyst (Johnston et al., 2001) del programa ArcGis (ESRI, 2011) que se utilizaron para detectar áreas discretas delimitadas por zonas de cambios drásticos (BioMedware, 2013) en los valores de las características morfológicas. Con esto se identifico un patrón general de la distribución geográfica en la variación de las características foliares. Finalmente se realizaron análisis de redundancias parciales utilizando el programa estadístico R (R Core Team, 2018) y análisis de regresión lineal para correlacionar éstos patrones de distribución de los caracteres foliares con variables medio ambientales.

Para realizar la delimitación de especies dentro del complejo de *Ternstroemia lineata*, se realizó un análisis de agrupamiento genético utilizando técnicas filogenéticas y filogeográficas. Para ello se recolectaron hojas de las especies pertenecientes al complejo de 192 individuos (5 a 10 hojas por individuos) de 25 poblaciones localizadas a lo largo del área de distribución de las especies. Las hojas fueron colocadas en bolsas resellables con sílica gel y los ejemplares de referencia fueron secados y prensados para ejemplares de herbario. El DNA se extrajo a partir de 50 hasta 100 mg de tejido foliar utilizando el método CTAB con algunas modificaciones (Martínez-González et al., 2017) y se cuantificó con un Nanodrop 2000c (Thermo, EE. UU.).

Para llevar a cabo los análisis filogenéticos, se consideraron 18 individuos representativos de cuatro especies del complejo. Se realizó la amplificación de dos regiones nucleares: el segundo intrón del gen de copia única LEAFY mediante los oligonucleótidos LFY-F y LFY-R (Zhang et al., 2014), así como toda la región del espaciador transcrito interno (ITS1, 5.8s e ITS2) usando los oligonucleótidos 17SE y 26SE (Sun et al., 1994). La amplificación del gen mitocondrial matR se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos matR3'R y matR5'F (Anderberg et al., 2002), mientras que el espaciador intergénico plastídico trnL-trnF requirió los oligonucleótidos universales “e” y “f” (Taberlet, 1991). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Multigene Optimax (Labnet International, EUA) usando el kit de polimerasa Kapa3G (Kapa Biosystems, Sudáfrica) y siguiendo las condiciones del fabricante, excepto por la temperatura de alineamiento (T<sub>m</sub>), que se determinó para cada región mediante una prueba de gradiente (LEAFY= 56 °C, ITS= 60 °C, matR= 54 °C y trnL-trnF = 60 °C). Los amplificados fueron secuenciados por Macrogen USA (EUA).

A partir de las secuencias se realizaron las siguientes particiones: el intrón LEAFY completo, la región ITS se consideró como espaciador 1, gen ribosomal 5.8S y espaciador 2, el gen mitocondrial se dividió en las regiones 3' y 5', mientras que el espaciador plastídico trnL-trnF también se mantuvo íntegro como una sola partición. Las particiones se analizaron en JModeltest 2.1.10 (Darriba et al., 2012) para determinar sus respectivos modelos de evolución molecular. Todas las particiones se concatenaron formando una supermatriz de 2959 pb y se analizaron mediante el algoritmo de Máxima Verosimilitud en el programa RAxML-NG (Kozlov et al., 2019) usando modelos de evolución molecular individuales para cada partición.

Para los análisis filogeográficos el alineamiento de las secuencias se realizó mediante el software Geneious (Biomatters Ltd, Nueva Zelanda) usando el alineamiento automático refinado manualmente. Las bases ambiguas se codificaron siguiendo el código de nomenclatura para bases nitrogenadas de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (Cornish-Bowden, 1985). Los haplotipos de las secuencias con sitios heterocigotos se reconstruyeron mediante el algoritmo PHASE (Stephens et al., 2001) en el programa DnaSP 5.10.01 (Librado y Rozas, 2009) que adicionalmente se empleó para los cálculos de los índices de fijación para diversidad genética ordenada y no ordenada ( $N_{st}$  y  $G_{st}$ , respectivamente). La red de haplotipos se contruyó mediante el software PopART (Leigh y Bryant, 2015) usando el método TCS (Clement et al., 2000). La visualización espacial de las frecuencias haplotípicas se realizó mediante ArcGIS 10.5 (ESRI, 2011).

Para analizar la circunscripción de *Ternstroemia tepezapote* sensu stricta (s.s.) a partir de todos los especímenes que en algún momento se han identificado como esta especie, se realizaron análisis de agrupamientos basados en caracteres morfológicos y características ambientales. Para lo cual inicialmente se elaboró una base de datos con 660 registros de ejemplares de *Ternstroemia tepezapote* sensu lato (s.l.) distribuidos en México y Centro América utilizando como fuente los herbarios (MEXU, ENCB, XAL, IEB, FCME, MO, ZEA, SERBO, OAX, F y GH), consultas de bases de datos en línea [Global Biodiversity Information Facility (GBIF), <http://www.gbif.org/>; Tropicos®, <http://www.tropicos.org/>; Red Mundial de Información sobre Biodiversidad (REMIB), [http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/remib\\_esp.html](http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/remib_esp.html)] y de colectas realizadas en campo.

Para analizar las diferencias ambientales entre las poblaciones de *T. tepezapote*, se obtuvieron los datos climáticos a partir de las 19 variables bioclimáticas disponibles en la base de datos de WorldClim (Hijmans et al. 2006; <http://www.worldclim.org/>), a partir de los cuales se realizó un análisis de componentes principales (PCA) utilizando el programa estadístico R, y un análisis de discriminantes (DA) para probar la significancia estadística de los grupos utilizando el programa SPSS (x)

Para reconocer las discontinuidades morfológicas entre las poblaciones basadas en la hipótesis de divergencia ambiental, se seleccionaron y fotografiaron al menos tres ejemplares de herbario para cada grupo ambiental reconocido (74 especímenes en total). Desafortunadamente se utilizaron sólo ejemplares mexicanos debido a que no tuvimos disponibles ejemplares de Centro América. Para cada ejemplar se digitalizaron fotografías de hojas, sépalos y frutos utilizando el programa TPS Dig (Rohlf 2010). Con esta información, utilizamos dos diferentes metodologías para realizar los análisis de diferenciación morfológica, el primero se basó en un análisis de morfometría geométrica, en el cual se asignaron directamente landmarks a las hojas, flores (sépalos) y frutos, y el segundo análisis morfológico se basó en la morfometría tradicional, utilizando datos de la distancia entre pares de landmarks seleccionados, seis caracteres morfológicos cuantitativos y dos cualitativos.

Finalmente, para identificar las variables morfológicas y ambientales más útiles para la discriminación de los grupos, realizamos correlaciones múltiples entre las funciones discriminantes y las ocho variables ambientales. Igualmente se incluyó la latitud, longitud como variables adicionales. De la misma manera investigamos la correlación entre las funciones discriminantes y las variables morfológicas.



## Capítulo I

**Morphological variation of leaf traits in the *Ternstroemia lineata* species complex  
(Ericales: Pentaphragaceae) in response to geographic and climatic variation.**

(Artículo de requisito)

Cita completa

Alcántara-Ayala O, Oyama K, Ríos-Muñoz C, Rivas G, Ramirez-Barahona S, Luna-Vega I.  
2020. Morphological variation of leaf traits in the *Ternstroemia lineata* species complex  
(Ericales: Pentaphragaceae) in response to geographic and climatic variation. *PeerJ* 8:  
e8307 <http://doi.org/10.7717/peerj.8307>

# Morphological variation of leaf traits in the *Ternstroemia lineata* species complex (Ericales: Pentaphragaceae) in response to geographic and climatic variation

Othón Alcántara-Ayala<sup>1,2</sup>, Ken Oyama<sup>3</sup>, César A. Ríos-Muñoz<sup>4</sup>, Gerardo Rivas<sup>5</sup>, Santiago Ramirez-Barahona<sup>6</sup> and Isolda Luna-Vega<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, México

<sup>2</sup> Laboratorio de Biogeografía y Sistemática, Departamento de Biología Evolutiva, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, México

<sup>3</sup> Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES), Unidad Morelia, Universidad Nacional Autónoma de México, Morelia, Michoacán, México

<sup>4</sup> Coordinación Universitaria para la Sustentabilidad, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, México

<sup>5</sup> Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, México

<sup>6</sup> Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, México

## ABSTRACT

Variation in leaf morphology is correlated with environmental variables, such as precipitation, temperature and soil composition. Several studies have pointed out that individual plasticity can largely explain the foliar phenotypic differences observed in populations due to climatic change and have suggested that the environment plays an important role in the evolution of plant species by selecting for phenotypic variation. Thus, the study of foliar morphology in plant populations can help us identify the environmental factors that have potentially influenced the process of species diversification. In this study, we analyzed morphological variation in the leaf traits of the *Ternstroemia lineata* species complex (Pentaphragaceae) and its relation to climatic variables across the species distribution area to identify the patterns of morphological differentiation within this species complex. Based on the collected leaves of 270 individuals from 32 populations, we analyzed nine foliar traits using spatial interpolation models and multivariate statistics. A principal component analysis identified three main morphological traits (leaf length and two leaf shape variables) that were used to generate interpolated surface maps to detect discrete areas delimited by zones of rapid change in the values of the morphological traits. We identified a mosaic coarse-grain pattern of geographical distribution in the variation of foliar traits. According to the interpolation maps, we could define nine morphological groups and their geographic distributions. Longer leaves, spatulate leaves and the largest foliar area were located in sites with lower precipitation and higher seasonality of precipitation following a northwest–southeast direction and following significant latitudinal and longitudinal gradients. According to the phenogram of the relationships of the nine morphological groups based on morphological similarity, the putative species and subspecies of the *T. lineata* species complex did not show a clear pattern of differentiation. In this study, we found a complex pattern of differentiation with some

Submitted 30 March 2019

Accepted 27 November 2019

Published 10 January 2020

Corresponding author

Isolda Luna-Vega,  
isolda\_luna-vega@ciencias.unam.mx

Academic editor

Juliana Schietti

Additional Information and  
Declarations can be found on  
page 20

DOI 10.7717/peerj.8307

© Copyright

2020 Alcántara-Ayala et al.

Distributed under

Creative Commons CC-BY 4.0

OPEN ACCESS

isolated populations and some other contiguous populations differentiated by different traits. Further genetic and systematic studies are needed to clarify the evolutionary relationships in this species complex.

**Subjects** Biogeography, Ecology, Plant Science, Taxonomy, Population Biology

**Keywords** Morphological variation, Ternstroemia, Leaf traits, Geographical variation, Species complex

## INTRODUCTION

Intraspecific variation is one of the main sources of information for recognizing evolutionary patterns. Identifying the causes of intraspecific variation is essential to understanding the evolutionary processes that maintain diversity and promote speciation (Futuyma, 1998). In plants, variation occurs in populations of species that are separated in space, encompassing both the genotype and phenotype (Thorpe, 2002). The causes of phenotypic variation among individuals across the geographical distribution range of a species can be broadly divided into current environmental conditions within particular habitats and historical processes and phylogenesis (Thorpe, 1987; Peppe et al., 2011). Plant populations of the same species growing under different environmental conditions respond to different selection pressures, producing genetic and phenotypic divergence between populations (Ramsey, Cairns & Vaughton, 1994; Fenster & Stenøien, 2001; Albarrán-Lara et al., 2019).

Plants have developed particular adaptations to the surrounding local climate that allow them to be better fitted to their environment (Chevin, Lande & Mace, 2010; Valladares et al., 2014). The leaf is the structure in which changes in morphology in response to their environment are more readily acquired by plants (Malhado et al., 2009a; Yang et al., 2015) because leaves are the organs that perform essential functions, such as photosynthesis and regulation of water content (Givnish, 1979; Wright et al., 2004; Adams & Ichiro, 2018; Tsukaya, 2018).

Latitudinal and altitudinal variations in leaf size and shape are the result of plastic and adaptive responses of plants to varying environmental conditions, with differences in plant physiological responses also present among populations (Rico-Gray & Palacios-Ríos, 1996; Niinemets, 2001; Uribe-Salas et al., 2008; Frenne et al., 2013; Moles et al., 2014). The correlation between the shape and size of leaves and the surrounding habitat has been interpreted as the result of an evolutionary response of plants to varying environmental conditions (Givnish, 1987; Westoby et al., 2002; Peppe et al., 2011). For instance, leaf size has been shown to decrease with increasing altitude because of the differences in precipitation and with the decrease of soil nutrient content (McDonald et al., 2003; Nicotra et al., 2011). Additionally, smaller leaves appear to be better adapted to dry environments because the smaller size reduces the hydraulic vulnerability of leaves and makes the plants more tolerant to drought (Scoffoni et al., 2011). Light intensity also plays a key role in the adjustment of leaf size and shape in later stages of development, promoting the expansion of the leaf petiole and inhibiting the growth of the leaf blade (Tsukaya, 2005).

Several environmental factors have been shown to play key roles in the evolution of plant species by selecting for phenotypic variation (Pfennig et al., 2010), especially variation related to leaf traits. Thus, the study of foliar morphology in plant populations can help us to identify the environmental factors that have potentially influenced the process of species diversification and phenotypic variability (Aschcroft, French & Chisholm, 2011). The relationships of leaf variation with environmental variables have been focused on the global (Ordoñez et al., 2009; Yang et al., 2015; Wright et al., 2017), regional (e.g., North America) (Royer et al., 2008) and local (e.g., South Australia, Amazonia and Bolivia) (Sokal, Crovello & Unnasch, 1986; Wright & Ladiges, 1997; Gregory-Wodzicki, 2000; Malhado et al., 2009a; Malhado et al., 2009b; Guerin, Wen & Lowe, 2012) scales. However, similar patterns are not always identifiable across spatial scales, and in some cases, contrasting trends can be found (Malhado et al., 2009b; Wright et al., 2017). Studies on how plants respond to environmental variables within regions with a high degree of spatial heterogeneity could be useful for understanding the differential response of plants to climatic gradients (Moeller & Merilä, 2004). In turn, this knowledge would allow us to know the degree and direction of evolutionary divergence between populations.

The genus *Ternstroemia* (Penthaphylacaceae, order Ericales) is a group of plants that is poorly understood taxonomically, with the total number of species accepted in the genus varying from 90–110 species (Stevens, 2001; Weitzman, Dressler & Stevens, 2004; Xiang, 2007) to over 160 species (Weitzman, 1995). The genus is distributed from Sri Lanka to SE and E Asia and exists in tropical and subtropical America and in Africa (two species) (Weitzman, Dressler & Stevens, 2004). In Mexico and Central America, *Ternstroemia* can be found in regions with a great variety of climates and habitats, ranging from 50 m to more than 3,000 m (Luna-Vega, Alcántara-Ayala & Contreras-Medina, 2004). One of the most widely distributed and common species of *Ternstroemia* in Mexico is *Ternstroemia lineata*. In particular, the taxonomic circumscription of *T. lineata* has been difficult and thus is considered a species complex composed of several taxa: *T. lineata* subsp. *chalicophila* (Loes.) B.M. Barthol., *T. dentisepala* B.M. Barthol., *T. lineata* subsp. *lineata* and *T. impressa* Lundell. The *T. lineata* species complex is distributed exclusively in Mesoamerica and is restricted to cloudy conditions at elevations ranging from 1,400 to 3,140 m in habitats characterized by high precipitation (>1,000 mm annually), such as cloud forests and mixed humid forests (Alcántara-Ayala, Luna-Vega & Velázquez, 2002; Luna-Vega, Alcántara-Ayala & Contreras-Medina, 2004). In Mexico and Guatemala, these types of forests occur within a relatively narrow altitudinal zone under humid, temperate climates with continuously foggy conditions. However, different forest patches show local climatic variations that generate heterogeneity in floristic composition. Accordingly, individuals in the *T. lineata* species complex show great variation in leaf shape and size among populations (Kobuski, 1942; Bartholomew & McVaugh, 1997; González-Villarreal, 2001).

In this study, we used the *Ternstroemia lineata* complex as a model to test how climates influence foliar morphology in forest species under environments with high humidity but great geographic heterogeneity. We analyzed how leaf morphology of the *T. lineata* species complex vary in relation to climate variables across its geographic distribution to detect which environmental variables have influenced the leaf morphological differentiation in

this species complex. We also tested the degree of leaf morphological differentiation among the putative species and subspecies complex of *T. lineata*.

## MATERIALS & METHODS

### Taxon sampling and morphological trait analysis

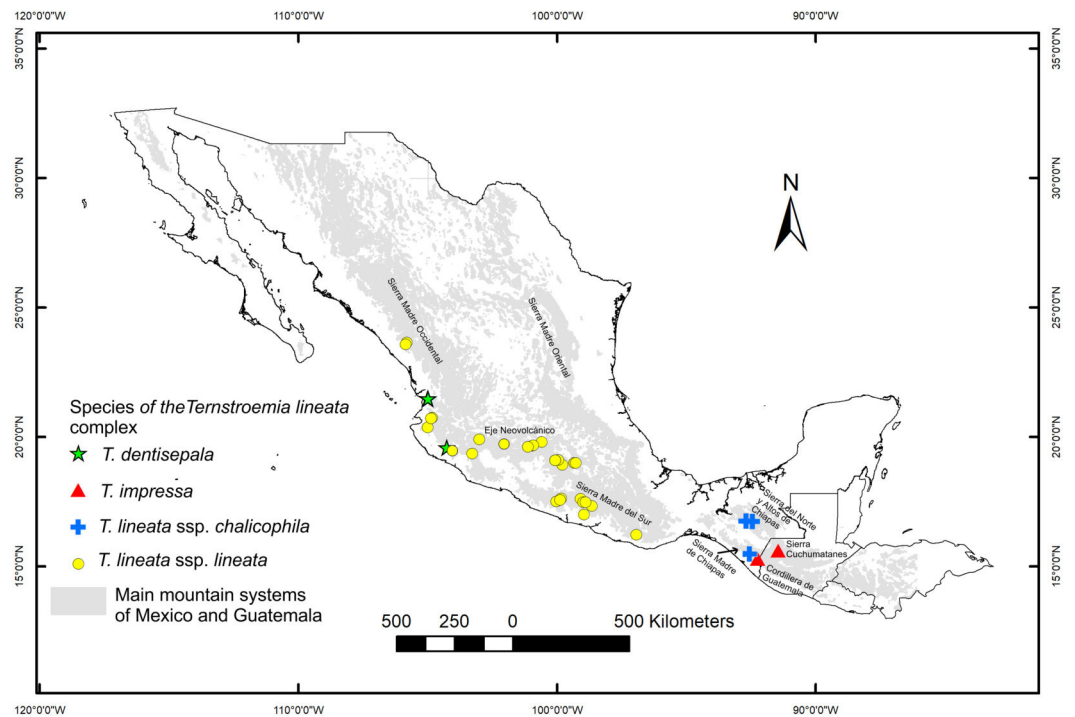
We collected leaves of 270 individuals (8–10 mature leaves per individual) from 32 populations located throughout the distribution range of the species (Fig. 1). A field permit of scientific collection (Official number SGPA/DGVS/12770/16) was issued by the Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, of Mexico. Leaf samples were pressed and dried for further measurements in the lab and for herbarium specimens. For each specimen, we measured nine foliar traits: 1. total length including lamina and petiole (TL); 2. lamina length (LL); 3. maximum width of the lamina (MW); 4. petiole length (PL); 5. distance from the base to the maximum width of the lamina (DW); 6. petiole diameter (PD); 7. angle of the lamina apex (ALA); 8. ratio between MW and LL (WLR); and 9. ratio between DW and LL (DWLR) (Fig. 2A). All variables (except ALA) were measured using a Mitutoyo<sup>®</sup> Vernier caliper (0.05 mm resolution) and are recorded in mm. For ALA, we used a Jeppesen PJ-1 Rotating Azimuth Plotter.

### Variation of morphological traits

We performed a principal component analysis (PCA) with the nine traits using the software Statistica (Statsoft Inc, 2009) to group the variables according to their variability and to select those with the higher values per component to account for most of the morphological variation among individuals (Table 1). With the selected morphological traits (TL, WLR and DWLR), interpolated surface maps were generated in a geographic information system (GIS) (ESRI, 2011) using the Geostatistical Analyst extension (Johnston et al., 2001). The traits DWLR and WLR are descriptors of leaf shape. DWLR refers to the degree to which a leaf is spatulate or elliptical, and WLR is indirect evidence of the foliar area (Nautival et al., 1990; Cittadini & Peri, 2006; Singh, 2007), where high values indicate small foliar areas and low values indicate large areas.

Finally, the interpolated maps were clipped with a map of the selected hydrographic basins of Mexico (INEGI, INE & CONAGUA, 2007) based on the presence of *T. lineata* complex records and the altitudinal range obtained from the herbarium specimens and field collections to eliminate the interpolation areas outside the known distribution of the *T. lineata* complex.

We used an empirical Bayesian kriging method, which is based on a semivariogram estimated from the spatial structure of the data (Oliver & Webster, 1990; Kidd & Ritchie, 2006; Brito et al., 2008). This kriging method is a geostatistical tool that generates an estimated surface from a set of dispersed points with *Z* values. The method is based on statistical models that consider the spatial autocorrelation among data points and provide a measure of precision of the predicted values. We considered the mean error, the square root of the quadratic mean error, the mean standard error, and the square root of the quadratic mean error to evaluate the efficiency of the interpolation (Johnston et al., 2001).



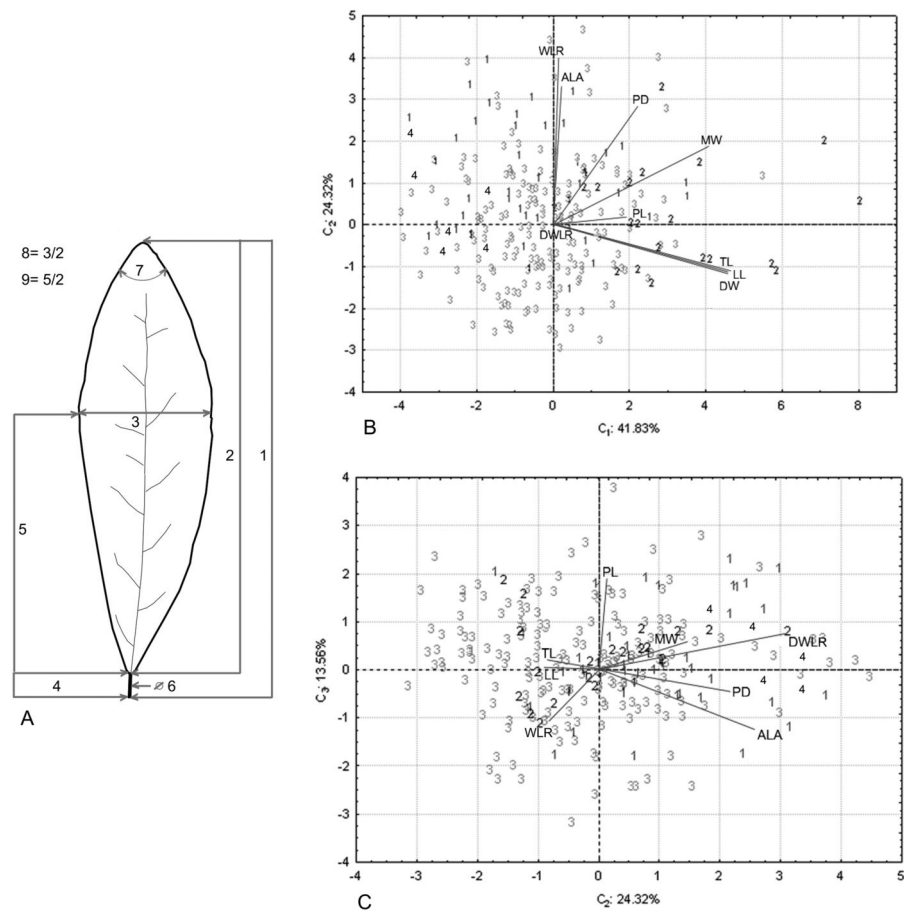
**Figure 1** Location of the sampled populations of the *T. lineata* complex. Distribution of the *Ternstroemia lineata* species complex in the main mountain systems of Mexico (*sensu* INEGI, 2001) and northern Central America (*sensu* Marshall, 2007).

Full-size DOI: [10.7717/peerj.8307/fig-1](https://doi.org/10.7717/peerj.8307/fig-1)

### Geographical areas of morphological homogeneity

The three interpolated maps were used to detect discrete areas delimited by zones of rapid change in the values of morphological traits because the variation inside the area is lower than that among the areas. For this method, we used a boundary delineation method with the BoundarySeer software (settings used: crisp boundary type, top 20% in boundary in threshold(s), thresholds 90 deg. vector-to-vector and 30 deg. vector-to-line gradient angle). Different boundaries are zones of rapid change, and for detection, wobbling methods are used, which estimate the average amount of change in the variable across the space. The locations that have high values of change are referred to as boundaries (*BioMedware, 2013*).

Each map generated by the boundary analysis was vectorized, and all were intersected in a single map using ArcGIS Ver. 10.0 (*ESRI, 2011*). The resulting polygons represented areas of geographical coincidence of the distribution of the three morphological traits: those polygons where the presence of *T. lineata* complex was not corroborated were eliminated based on the records of biodiversity information systems (REMIB, GBIF, specimens of herbaria). To reduce the number of polygons and group them into homogeneous areas, a cluster analysis was carried out based on the mean values of each of the morphological traits present in each polygon. This analysis was performed using NTSYSpc ver 2.11 (*Rohlf, 2000*) with a taxonomic distance coefficient and the UPGMA algorithm, and group formation was taken at a value of 0.88. Finally, the resulting groups were evaluated using



**Figure 2** Nine foliar traits and Principal Component Analysis (PCA) of this variables. Foliar measurements and PCA analysis of the morphological variables. (A) The nine foliar traits measured in each individual: (1) total leaf length (including lamina and petiole, TL); (2) lamina length (LL); (3) maximum width of the lamina (MW); (4) petiole length (PL); (5) distance from the base to the maximum width of the lamina (DW); (6) petiole diameter (PD); (7) angle of the lamina apex (ALA); (8) ratio between MW and LL (WLR); (9) ratio between DW and LL (DWLR). (B–C) We plotted the PCA values of the morphological variables: first component vs. second component (B) and second component vs. third component (C) we show two sets of variables with maximum correlation: LL-TL-DW and ALA-WLR. The number (B and C) corresponds to species of *T. lineata* complex, 1. *T. lineata* ssp. *chalicopila*, 2. *T. dentisepala*, 3. *T. lineata* ssp. *lineata* and 4. *T. impressa*.

Full-size [DOI: 10.7717/peerj.8307/fig-2](https://doi.org/10.7717/peerj.8307/fig-2)

discriminant analysis to identify their differences (Table 2). Finally, the distributions of the values of each of the three variables within each group were represented using boxplots. Discriminant analysis and boxplot were carried out using SPSS Statistics ver. 19 software (IBM Corp. Released, 2010).

### Relationship of morphological traits with climate and geography

To evaluate the relationship of the morphological traits with the climate across the range of the distribution of this species complex, we used the average values of each polygon, considering 19 bioclimatic variables (Hijmans et al., 2005) (Table 1) and three geographical variables. Values were obtained through a zonal analysis in the GIS. We used

**Table 1** Climatic variables used in the redundancy analysis.

Abbreviations	Climatic variable names
BIO1 <sup>a</sup>	Annual Mean Temperature
BIO2	Mean Diurnal Range (Mean of monthly (max temp - min temp))
BIO3	Isothermality (BIO2/BIO7) (* 100)
BIO4 <sup>a</sup>	Temperature Seasonality (standard deviation *100)
BIO5	Max Temperature of the Warmest Month
BIO6	Min Temperature of the Coldest Month
BIO7	Temperature Annual Range (BIO5-BIO6)
BIO8	Mean Temperature of the Wettest Quarter
BIO9	Mean Temperature of the Driest Quarter
BIO10	Mean Temperature of the Warmest Quarter
BIO11	Mean Temperature of the Coldest Quarter
BIO12	Annual Precipitation
BIO13 <sup>a</sup>	Precipitation of the Wettest Month
BIO14 <sup>a</sup>	Precipitation of the Driest Month
BIO15 <sup>a</sup>	Precipitation Seasonality (Coefficient of Variation)
BIO16	Precipitation of the Wettest Quarter
BIO17	Precipitation of the Driest Quarter
BIO18	Precipitation of the Warmest Quarter
BIO19 <sup>a</sup>	Precipitation of the Coldest Quarter

**Notes.**<sup>a</sup>Climatic variables with VIF > 10.**Table 2** Principal Component Analysis of nine morphological variables of the *T. lineata* species complex. Variables: (1) total length of leaf (includes lamina and petiole, TL); (2) lamina length (LL); (3) maximum width of the lamina (MW); (4) petiole length (PL); (5) distance from the base to the maximum width of the lamina (DW); (6) petiole diameter (PD); (7) angle of the lamina apex (ALA); (8) ratio between MW and LL (WLR); and (9) ratio between DW and LL (DWLR).

Contributions	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>	C <sub>4</sub>	C <sub>5</sub>
PL	0.041737	0.000777	0.161636	0.726383	0.016466
PD	0.054816	0.186583	0.009767	0.068551	0.258501
MW	0.189874	0.083223	0.015169	0.012927	0.000201
TL	0.244426	0.029179	0.002038	0.001309	0.011538
LL	0.239342	0.032236	0.000070	0.018755	0.016813
DW	0.228145	0.028064	0.052958	0.000150	0.001161
WLR	0.000166	0.379410	0.026536	0.000723	0.038457
DWLR	0.000956	0.000000	0.663112	0.148503	0.081381
ALA	0.000538	0.260529	0.068714	0.022698	0.575481
% ACUMULATED VARIANCE	41.83	66.15	79.71	94.04	99.59

the redundancy analysis (RDA) implemented in the package ‘vegan’ (Oksanen et al., 2018) in R 3.5.1 software (R Core Team, 2018) to determine the combination of environmental and geographical variables that better explain the morphological variation. This analysis was carried out as follows: first, all the bioclimatic variables (BIO01 to BIO19) were included,



and an iterative analysis was carried out so that the variables showing high collinearity were eliminated according to their values of variance inflation factor (VIF). Then, to evaluate the effects of climate and geography on leaf trait variation, we performed RDA analysis in three phases: (a) an analysis that includes both climatic and geographical variables (RDFull); (b) a partial RDA analysis including only bioclimatic variables without collinearity (pRDA1); and finally, (c) a partial RDA analysis including only geographical variables (pRDA2).

We also conducted linear Pearson correlation analyses between the three morphological traits selected after the PCA and the bioclimatic variables without collinearity after an iterative analysis. We included geographic variables such as latitude, longitude and altitude in these linear correlation analyses to detect patterns of leaf morphological variation through latitudinal, longitudinal or altitudinal gradients.

## RESULTS

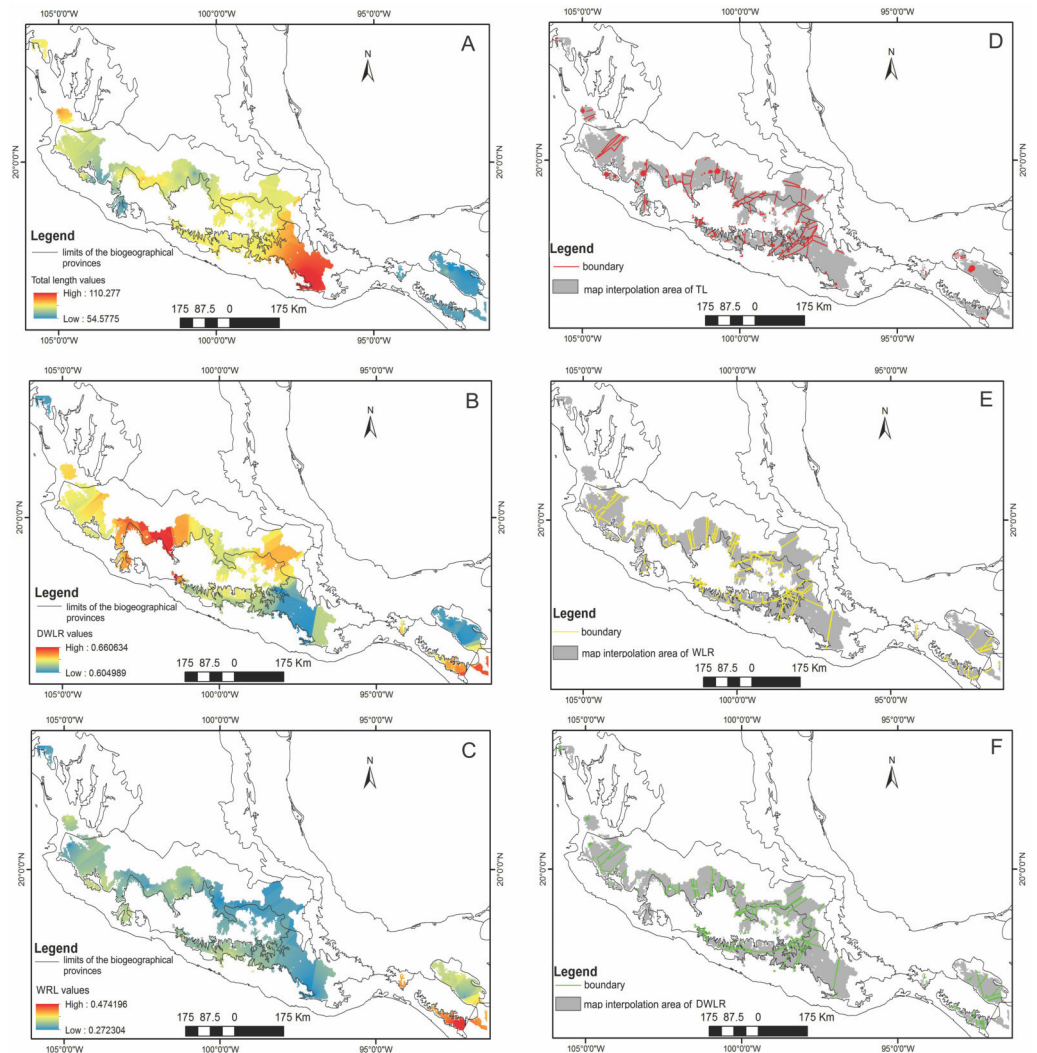
### Leaf morphological variation and interpolation maps

The principal component analysis of the morphological traits showed that the first three components explained 79.71% of the accumulated variance (41.83%, 24.32% and 13.56%). For the first component, the higher loading values were associated with leaf length (TL and LL) and width (DW and MW), and the second and third components were associated with leaf shape (WLR and DWLR, respectively) (Table 2). The relation among the components showed two sets of variables with maximum correlation associated with the leaf length and width (LL, TL and DW) and the lamina angle and leaf shape (ALA and WLR) (Figs. 2B and 2C).

For the three variables identified as important for each component (TL, WLR and DWLR), we obtained the interpolated surface maps (Figs. 3A–3C). We identified a coarse-grain geographical mosaic distribution in the variation of these foliar traits. The longest leaves occurred in southern Mexico (Sierra Madre del Sur), and the plants with the shortest leaves were mainly located in the southernmost region of the distribution (Sierra Norte y Los Altos de Chiapas and Sierra Madre de Chiapas and Cuchumatanes) and a small area in the western part of the Eje Neovolcánico (Fig. 3A). Plants with spatulate leaves (higher values of DWLR) were mainly located in the western part of the Eje Neovolcánico and in the southernmost part of the Sierra Madre de Chiapas and Cuchumatanes. Plants with elliptical leaves (lower values of DWLR) were located mainly in the Sierra Madre del Sur and Sierra del Norte y Altos de Chiapas (Fig. 3B). The regions with plants with the largest foliar area (low values of WLR) were mainly located in the Sierra Madre del Sur, Eje Neovolcánico and Sierra Madre Occidental. The highest WLR values (smaller foliar area) are located in Sierra Madre de Chiapas and Cuchumatanes (Fig. 3C).

### Geographical areas of morphological homogeneity and the morphological delimitation of the *T. lineata* species complex

The boundary analyses and the vectorization of the boundary maps produced 228 polygons for the TL map, 395 polygons for the DWLR, and 270 for the WLR (Figs. 3D–3F). The intersection of these three maps and the subsequent elimination of polygons, using only the records of presence of the *T. lineata* complex, produced a single map with 108 polygons

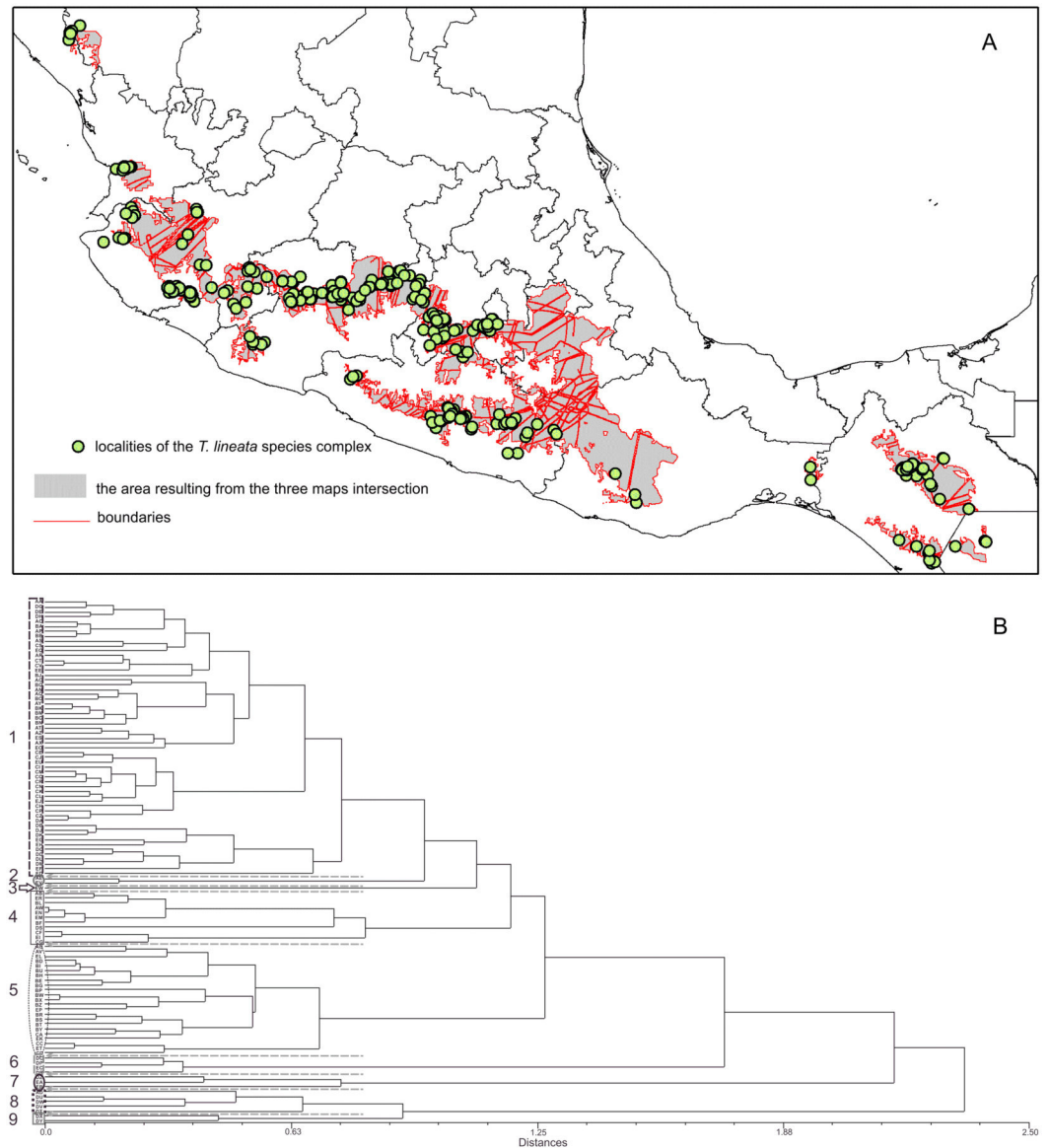


**Figure 3** The interpolated surface maps. Interpolation maps for (A) total leaf length (TL), (B) ratio between the distance from the base to the maximum width of the lamina (DW) and leaf length (LL) (DWLR) and (C) ratio between maximum width of the lamina (MW) and leaf length (LL) (WLR). (D–E) Boundary detection analyses based on the interpolated surface maps of the three leaf traits (TL, DWLR, WLR, respectively).

Full-size DOI: [10.7717/peerj.8307/fig-3](https://doi.org/10.7717/peerj.8307/fig-3)

(Fig. 4A). The cluster analysis with the average values of the three morphological traits in these 108 polygons generated nine clusters (morphological groups) (Fig. 4B). The discriminant analysis showed significant differences among these nine clusters (Table 3) with the eigenvalues of the first two functions discriminated by 92.7% with small Wilks' lambda values, which confirms the high variability among these groups. Finally, the percentage error among the groups was minimal (0.9%) (Fig. 5A). Figure 5B shows the differences of the three morphological traits among the nine morphological groups.

The nine morphological groups have some correspondence with the species and subspecies of the *T. lineata* species complex. *T. lineata* subsp. *lineata* were formed by the



**Figure 4** The intersection of three maps and phenogram resulted from a cluster analysis of the 108 polygons. (A) Map with polygons generated by the intersection of the three maps of morphological variables (see Figs. 3D–3F) after the boundary analysis and the vectorization of the boundary maps using only the records of presence of the *T. lineata* complex (green dots). (B) Phenogram resulted from a cluster analysis of the 108 polygons.

Full-size  DOI: [10.7717/peerj.8307/fig-4](https://doi.org/10.7717/peerj.8307/fig-4)

populations of group 1 but also by populations of groups 3, 7 and 9 and some populations of group 4 (in allopatry) and other populations of groups 4 and 5 (in parapatry). Populations of group 2 belong to *T. dentisepala*, which is distributed in Nayarit state (northwest Mexico), populations of group 6 belong to *T. lineata* subsp. *chalicophila* (Chiapas state in southern Mexico) and populations of group 8 belong to *T. impressa*, which is distributed in Guatemala (Fig. 5C). However, according to the phenogram of the relationships of the

**Table 3** The discriminant analysis showing significant differences among the nine clusters. (A) Eigenvalues of the functions show that the first two functions discriminate by 92.7%. (B) Wilks Lambda values and Chi-square,  $p = 0.05$ .

Function	Eigenvalue	% of variance	Cumulative %	Canonical correlation
(A) Eigenvalue				
1	10.251 <sup>a</sup>	60.3	60.3	.955
2	5.506 <sup>a</sup>	32.4	92.7	.920
3	1.249 <sup>a</sup>	7.3	100.0	.745
Test of functions	Wilks' Lambda	Chi-square	df	Sig
(B) Wilks' Lambda				
1 to 3	0.006	515.478	24	.000
2 to 3	0.068	271.010	14	.000
3	0.445	81.858	6	.000

**Notes.**

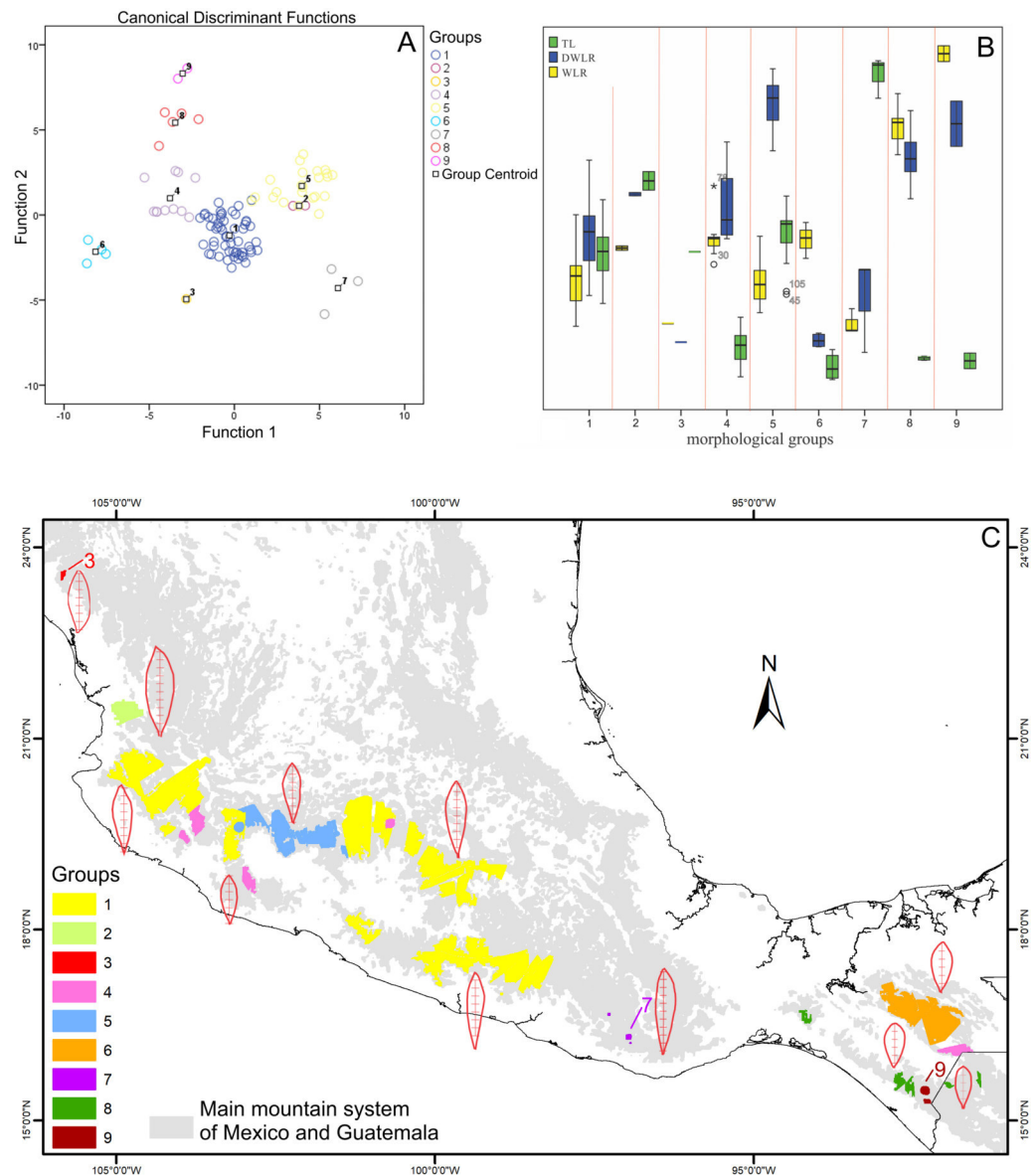
<sup>a</sup>We used the three first canonical discriminant functions in the analysis.

nine morphological groups based on morphological similarity, the putative species and subspecies did not show clear patterns of differentiation. For example, the morphological similarity within morphological group 2 (*T. dentisepala*) was higher and was also higher within the morphological groups of *T. lineata* subsp. *lineata* (groups 1, 3 and 4). Group 5 was an interesting case because the populations of this group were distributed parapatrically and differentiated from the main cluster of *T. lineata* subsp. *lineata*. Populations of the morphological groups 6, 7, 8 and 9 were geographically isolated and differentiated in different clusters, and plants of group 8 that were distributed in Guatemala were described as *T. impressa* (Fig. 5C).

### Relationship of geography and climate to morphological traits

We selected six bioclimatic variables (BIO01, BIO04, BIO13, BIO14, BIO15 and BIO19) based on an iterative analysis. The results of the full redundancy analysis ( $F = 10.037$ ,  $p < 0.001$ ,  $N = 999$  permutations), including geographic and bioclimatic variables, explained 47.79% of leaf variation ( $p < 0.001$ ) with two significant axes RD1 and RD2; the first axis explained 83.72% of the variance, and the second axis explained 13.61%. The most significant variables for the first axis were precipitation of the driest month (BIO14,  $p < 0.001$ ), precipitation seasonality (BIO15,  $p < 0.043$ ), precipitation of the coldest quarter (BIO19,  $p < 0.007$ ) and longitude ( $p < 0.001$ ); for the second axis, the most significant variables were latitude ( $p < 0.001$ ), precipitation of the wettest month (BIO13,  $p < 0.024$ ), temperature seasonality (BIO04,  $p < 0.014$ ) and annual mean temperature (BIO01,  $p < 0.001$ ). The most important morphological variables were total leaf length (TL) and width-length ratio (WLR). The first axis of the full RDA separated those populations mainly located in the south in Sierra del Norte y Los Altos de Chiapas and Sierra Madre de Chiapas and the populations of the Sierra Madre del Sur (in the state of Oaxaca) and the most western area of the Eje Neovolcánico (state of Nayarit) (Fig. 6).

The analysis of leaf trait variation indicated that climate had a higher impact than geography. The percentage of the variance explained only by climate was 31.08%, the

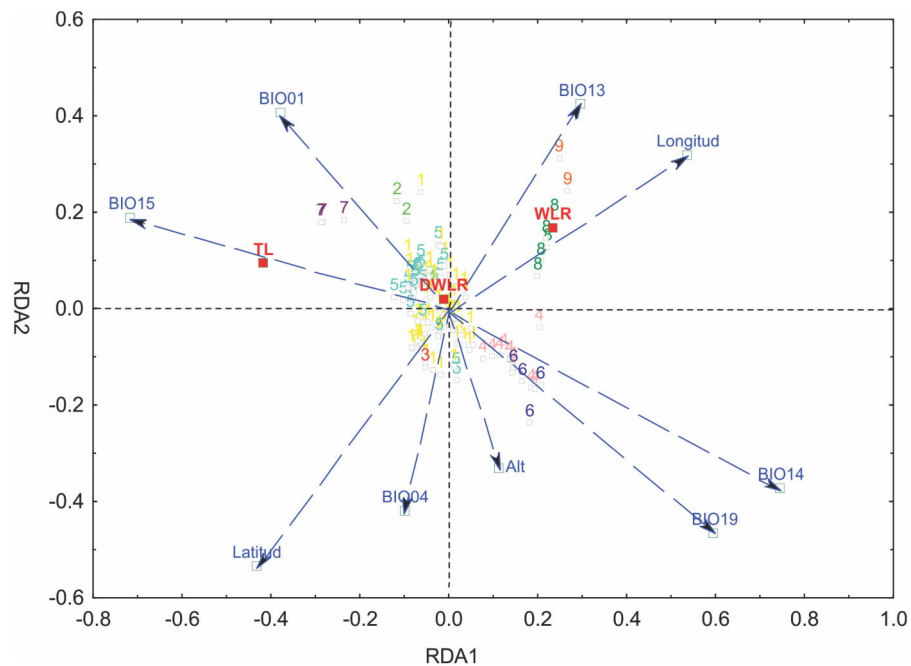


**Figure 5** Biplot discriminant analysis, boxplot of the differences of the three morphological traits among the nine morphological groups and distribution map of this nine morphological groups. (A) Canonical discriminant charts where the integrity of the nine groups was tested; (B) boxplot of the nine morphological groups; (C) distribution map of the nine morphological groups (with a typical leaf sample).

Full-size [DOI: 10.7717/peerj.8307/fig-5](https://doi.org/10.7717/peerj.8307/fig-5)

percentage explained by geography was 13.38% and the joint effect, geography—climate, explained 2.38%.

The partial redundancy analysis using climate as control of geography (pRDA1) was significant only in its first axis ( $p < 0.001$ ), explaining 87.26% of the variation, with precipitation of the coldest quarter (BIO19,  $p < 0.009$ ) as the most important variable. The partial redundancy analysis using geography as a control climate (pRDA2) was only



**Figure 6** Graph of the redundancy analysis that includes both climatic and geographical variables (RDFull). Graph of full redundancy analysis (Full RDA) showing the relationship between response variables (morphological characters) and explanatory variables (bioclimatic and geographic variables). Full-size [DOI: 10.7717/peerj.8307/fig-6](https://doi.org/10.7717/peerj.8307/fig-6)

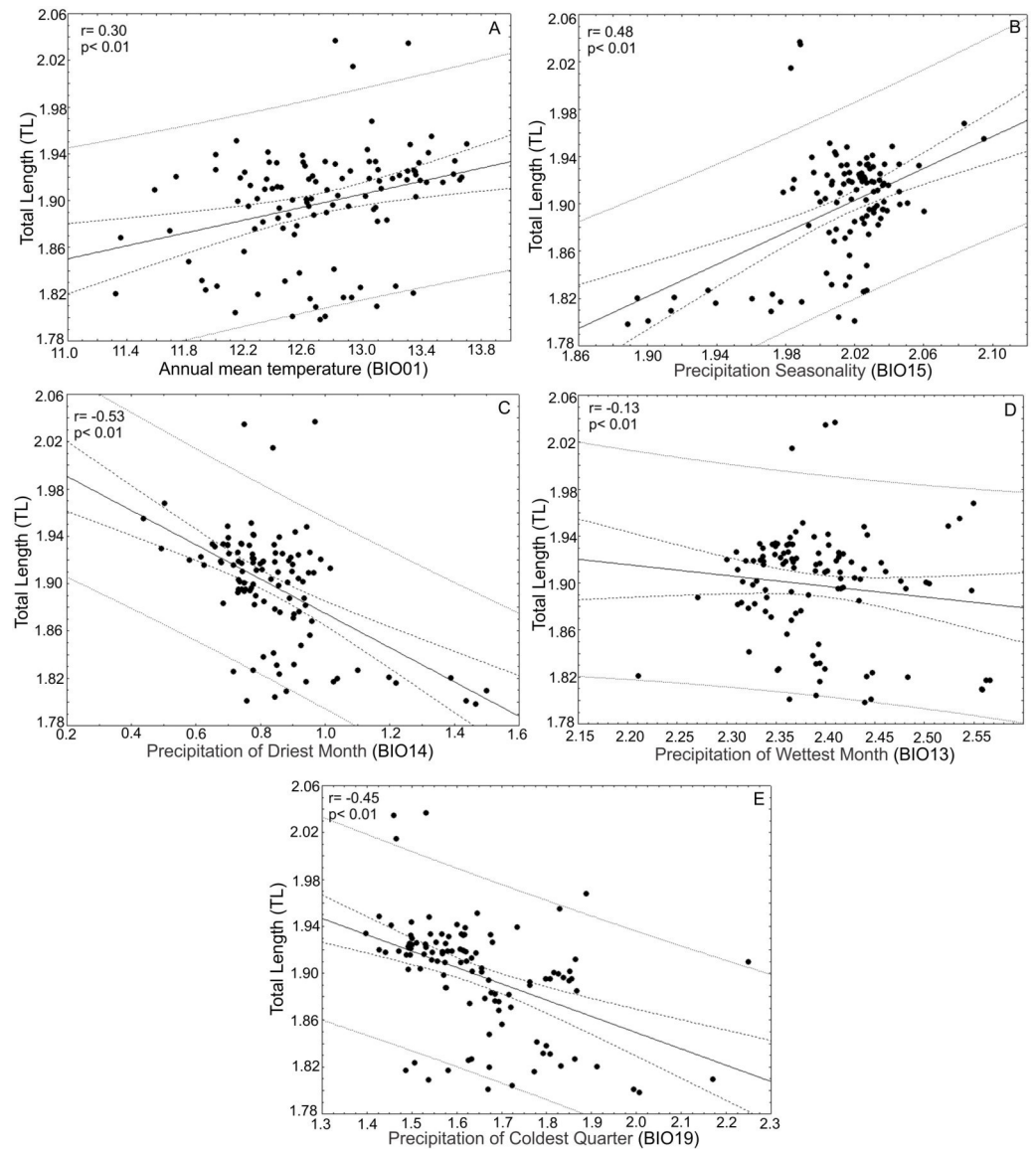
significant in its first axis ( $p < 0.001$ ), which explains 99.45% of the variation, with latitude being the variable of greater importance ( $p < 0.001$ ) (Fig. 6).

### Relationship between morphological traits and environmental and geographic variables

After the principal component analysis defined TL, WRL and DWLR as the morphological traits that explain most of the variance in the *T. lineata* species complex and the iterative analysis selected the climatic variables without collinearity, we conducted linear correlations between both groups of variables. Total leaf length (TL) was positively correlated with annual mean temperature (BIO01) ( $r = 0.30$ ;  $p < 0.01$ ) and precipitation seasonality (BIO15) ( $r = 0.48$ ;  $p < 0.01$ ) and negatively correlated with the precipitation of the driest month (BIO14) ( $r = -0.53$ ;  $p < 0.01$ ), precipitation of the wettest month (BIO13) ( $r = -0.13$ ;  $p < 0.01$ ) and precipitation of the coldest quarter (BIO19) ( $r = 0.45$ ;  $p < 0.01$ ) (Fig. 7).

The ratio between the maximum width of the lamina (MW) and leaf length (LL) (WRL) as a descriptor of leaf shape was positively correlated with the precipitation of the wettest month (BIO13) ( $r = 0.39$ ;  $p < 0.01$ ) and precipitation of the driest month (BIO14) ( $r = 0.31$ ;  $p < 0.01$ ) and was negatively correlated with temperature seasonality (BIO04) ( $r = -0.27$ ;  $p < 0.01$ ) and precipitation seasonality (BIO15) ( $r = -0.37$ ;  $p < 0.01$ ) (Fig. 8).

The ratio between the distance from the base to the maximum width of the lamina (DW) and leaf length (LL) (DWLR) was positively correlated with temperature seasonality

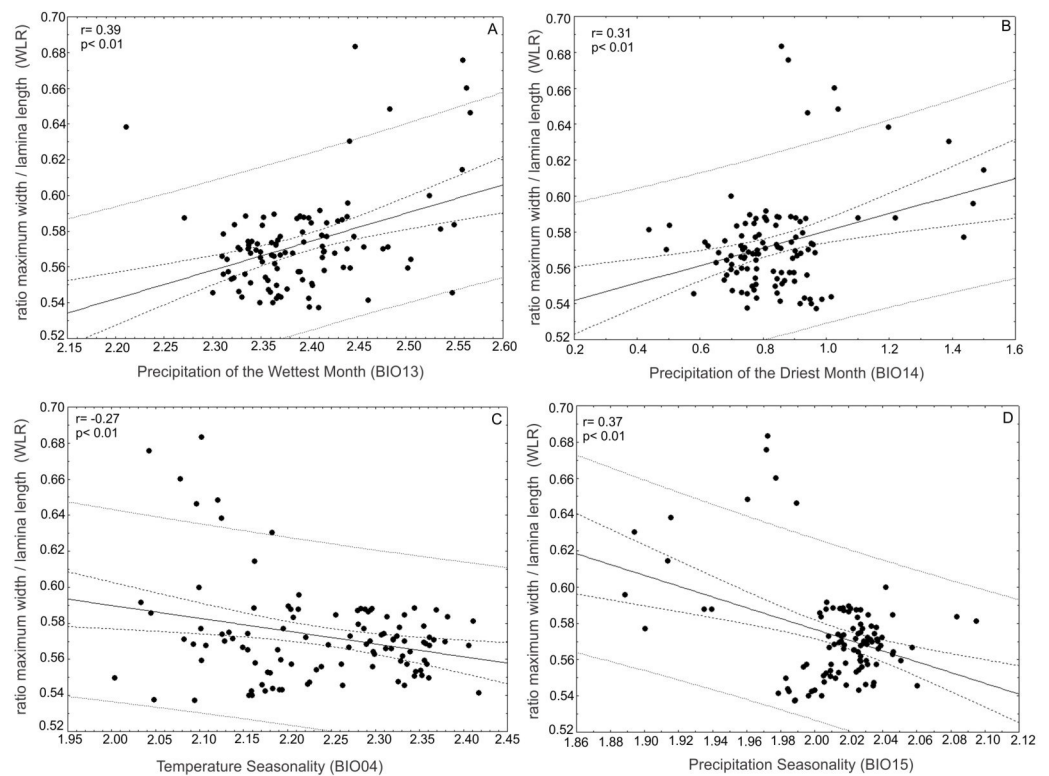


**Figure 7** Correlations between total leaf length and bioclimatic variables. (A) Correlations between total leaf length (TL) and bioclimatic variables were positively correlated with annual mean temperature (BIO01) and (B) precipitation seasonality (BIO15) and (C) negatively correlated with precipitation of the driest month (BIO14), (D) precipitation of the wettest month (BIO13) and (E) precipitation of the coldest quarter (BIO19).

Full-size DOI: [10.7717/peerj.8307/fig-7](https://doi.org/10.7717/peerj.8307/fig-7)

(BIO04) ( $r = 0.40$ ;  $p < 0.01$ ) and precipitation seasonality (BIO15) ( $r = 0.25$ ;  $p < 0.05$ ) and negatively correlated with the precipitation of the wettest month (BIO13) ( $r = -0.21$ ;  $p < 0.05$ ), precipitation of the driest month (BIO14) ( $r = 0.32$ ;  $p < 0.01$ ) and precipitation of the driest quarter ( $r = -0.41$ ;  $p < 0.01$ ) (Fig. 9).

Additionally, TL and DWLR were positively correlated with latitude ( $r = 0.20$ ;  $p < 0.05$ ;  $r = 0.22$ ;  $p < 0.05$ , respectively) and negatively correlated with longitude ( $r = -0.30$ ;  $p < 0.05$ ;  $r = -0.24$ ;  $p < 0.05$ , respectively), but WLR was negatively correlated with



**Figure 8** Correlations of the ratio between maximum width of the lamina/leaf length (WLR) and bioclimatic variables. The ratio between maximum width of the lamina (MW) and leaf length (LL) (WLR) as descriptor of leaf shape was (A) positively correlated with precipitation of the wettest month (BIO13) and (B) precipitation of the driest month (BIO14) and (C) negatively correlated with temperature seasonality (BIO04) and (D) precipitation seasonality (BIO15).

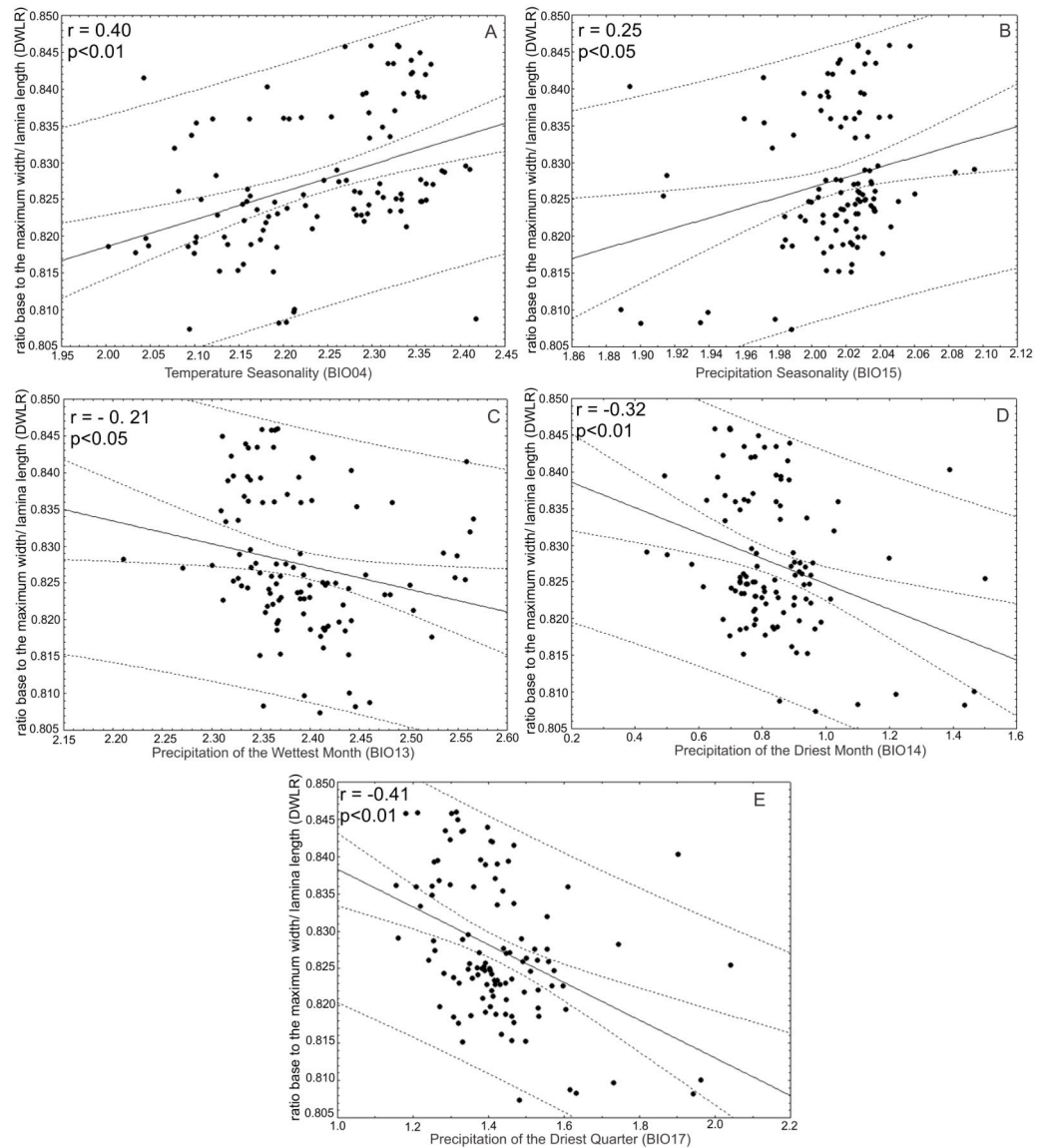
Full-size DOI: [10.7717/peerj.8307/fig-8](https://doi.org/10.7717/peerj.8307/fig-8)

latitude ( $r = -0.53$ ;  $P < 0.01$ ) and positively correlated with longitude ( $r = 0.49$ ;  $p < 0.01$ ). The three morphological traits were not correlated with altitude (TL:  $r = -0.12$ ;  $p > 0.05$ ; WLR:  $r = -0.08$ ;  $p > 0.05$ ; DWLR:  $r = -0.14$ ;  $p > 0.05$ ) (Fig. 10).

## DISCUSSION

Here, we analyzed leaf morphology in the *T. lineata* species complex, a group of plants characteristic of the humid forests of Mesoamerica. To detect the role of environmental factors in morphological population differentiation, we studied the general geographic trends in leaf morphology and their relationships with climatic variables such as temperature and precipitation. The populations of the *T. lineata* species complex show great levels of variation in leaf morphology throughout their distribution range. Accordingly, our analyses allowed us to define nine morphologically homogenous groups within the complex and to define their geographic distributions. In general, the pattern we uncovered is a patchy mosaic geographic distribution with some groups of populations having a continuous distribution along the central and southern mountains of Mexico (Eje Neovolcánico, Sierra Madre del Sur). However, we also detected some morphological

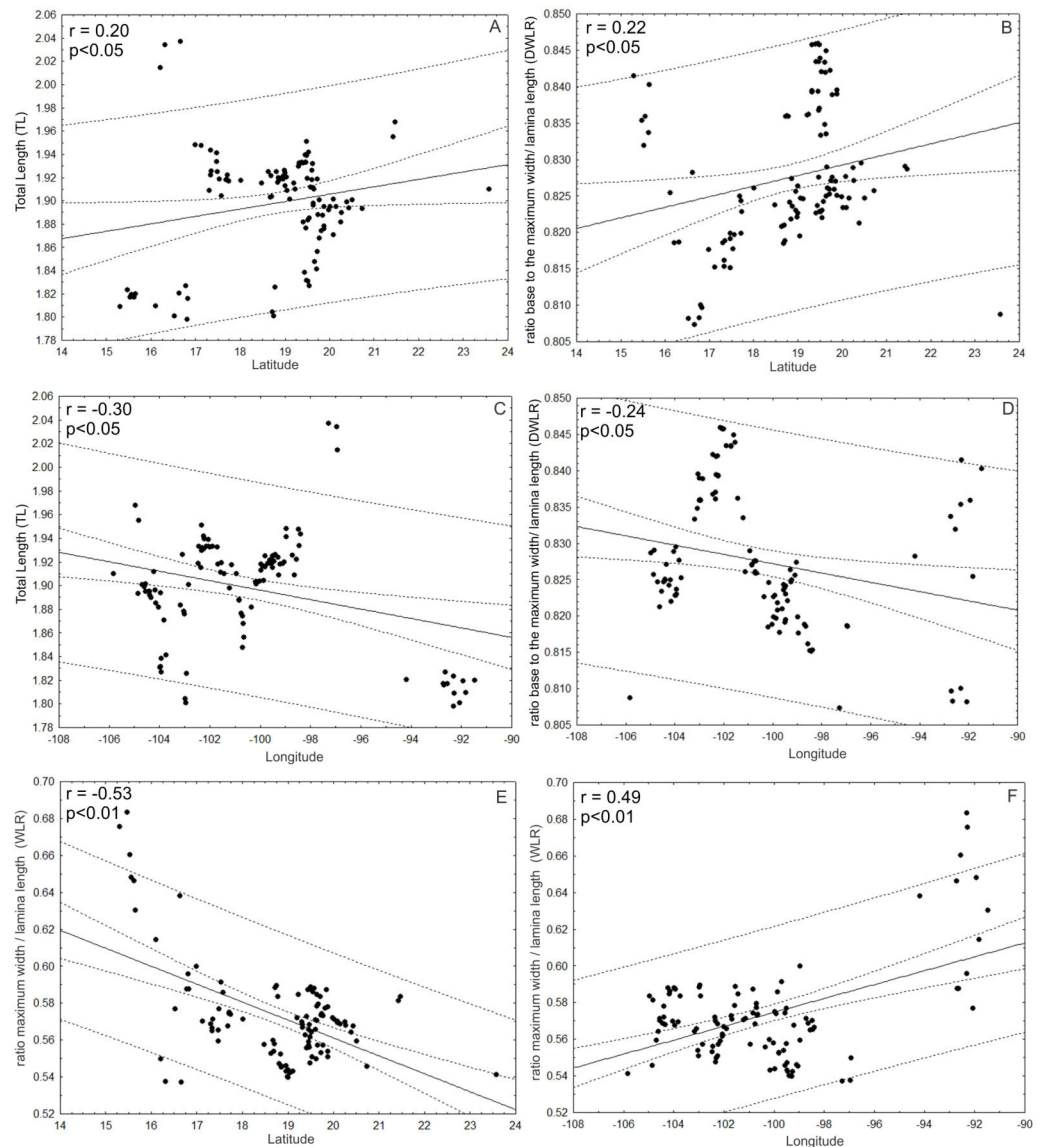




**Figure 9** Correlations between the ratio between the distance from the base to the maximum width of the lamina/leaf length (DWLR) and bioclimatic variables. The ratio between the distance from the base to the maximum width of the lamina (DW) and leaf length (LL) (DWLR) was (A) positively correlated with temperature seasonality (BIO04) and (B) precipitation seasonality (BIO15) and (C) negatively correlated with precipitation of the wettest month (BIO13), (D) precipitation of the driest month (BIO14) and (E) precipitation of the driest quarter.

Full-size DOI: [10.7717/peerj.8307/fig-9](https://doi.org/10.7717/peerj.8307/fig-9)

groups that are distributed parapatrically and others that are isolated at the northern and southern edges of the distribution range of the species complex. Although some groups are consistent with the present-day accepted taxonomic status (Kobuski, 1942; Bartholomew & McVaugh, 1997), such as the populations identified as *T. dentisepala* in the north and *T. impressa* in the south, other groups do not have a clear association with the currently accepted taxonomic circumscription.



**Figure 10** Correlations between morphological variables and latitude and/or longitude. (A and B) TL and DWLR were positively correlated with latitude and (C and D) negatively correlated with longitude, (E) WLR was negatively correlated with latitude and (F) positively correlated with longitude.

Full-size DOI: [10.7717/peerj.8307/fig-10](https://doi.org/10.7717/peerj.8307/fig-10)

Since the 19th century, biogeographers have found that wet tropics harbor plants with larger leaves than those observed in temperate regions, suggesting that small leaves are more frequently found at high latitudes and elevations. Recently, some authors (e.g., [Jones, 2014](#); [Michaletz et al., 2016](#); [Wright et al., 2017](#)) have attempted to explain the global climatic drivers of leaf size and shape. In general, morphological variation in plants follows changes in environmental variables along latitudinal, longitudinal and altitudinal gradients at different geographic scales ([Rico-Gray & Palacios-Ríos, 1996](#); [Niinemets, 2001](#); [Chalcoff, Ezcurra & Aizen, 2008](#); [Uribe-Salas et al., 2008](#); [Frenne et al., 2013](#); [Moles et al., 2014](#)). In

particular, complex leaf morphology in the *T. lineata* species showed clear patterns of latitudinal and longitudinal variation, but no patterns in morphology were detected across altitude. However, we uncovered strong correlations between leaf morphology and environmental variables. More specifically, leaf area showed a close association with environmental variables, where leaves with lower surface area were found in regions with higher precipitation throughout the year (i.e., high precipitation during the wettest and driest months), whereas leaves with higher surface area were found in regions with pronounced temperature and precipitation seasonality. Interestingly, this pattern does not follow the general trend observed in plants at a global scale, in which smaller leaves tend to occur in drier sites (Wright *et al.*, 2017).

Variation in leaf shape along environmental gradients has been tied to the response of plant populations to environmental factors (Givnish, 1987; Malhado *et al.*, 2009a; Malhado *et al.*, 2009b; Werger & Ellenbroek, 1978). Accordingly, longer leaves in *T. lineata* were found in regions with higher temperatures and with strong precipitation seasonality, whereas the shortest leaves were found in regions with higher levels of rainfall. In general, longer, narrower and more spatulate leaves were located in regions with lower precipitation and higher precipitation seasonality, following a northwest—southeast direction. However, populations of the *T. lineata* species complex also show differentiation in leaf shape (i.e., narrow spatulate vs elliptical and obovate leaves) within similar mixed cloud forest habitats but still followed significant latitudinal and longitudinal gradients.

The relationship we observed between the length and the surface area of leaves with precipitation seasonality is difficult to explain. Traditionally, a reduction in leaf size has been reported for many species as aridity increases, which represents an adaptive advantage because small leaves have low evapotranspiration (Chalcoff, Ezcurra & Aizen, 2008). In contrast, our results show that individuals of the *T. lineata* complex with the longest leaves and with the largest leaf areas are found in regions with the lowest extreme rainfall. We believe that the pattern we are observing is due to the habitats in which these plants live. These habitats are characterized by high levels of humidity in the form of cloud, which is more persistent precisely in the driest and coldest periods of the year. In this case, the constant presence of cloud tends to form a thin layer of water on the surface of the leaf, which reduces transpiration and therefore growth (Leigh, 1975; Lightbody, 1985). In addition, this water film reflects sunlight, causing a reduction in photosynthetic activity and therefore affecting the growth rate of the leaves (Lightbody, 1985).

The adaptive value of having more spatulate or elliptical leaves with respect to varying environments is also difficult to explain. Recently, Kidner & Umbreen (2010) argued that leaf shape is extremely variable between and within species, with great levels of variation in leaf shape among populations and individual plants. The shape of the leaf has been related to the capacity to capture light within distinct habitats and to the regulation of water balance and temperature. In this case, a detailed study of microclimatic variation among populations and analyses of leaf vascular patterns are needed to determine the factors that drive the variation of leaf shape in the *T. lineata* complex.

Variation in leaf traits is due to phenotypic plasticity in response to environmental gradients, and the observed morphological variation is frequently strongly associated

with climate (Givnish, 1987; Westoby et al., 2002; Gratani, 2014). In this context, the recognition of geographical and morphological groups along the distribution range of the *T. lineata* species complex helped us identify regions where environmental variation mirrored the observed morphological variation across populations. There is a clear mosaic-type geographical pattern of variation in some foliar traits, but there is also evidence of correspondence between environmental gradients and leaf size and shape. These results indicate that environmental factors play a relevant role in the observed variation in foliar traits in the *T. lineata* species complex. However, this trait variation is clustered within discrete groups of populations, which are well differentiated geographically. Interestingly, the observed patterns suggest that several groups of populations are morphologically differentiated as a result of geographic isolation. However, there is evidence of significant differentiation in leaf morphology among geographically contiguous populations, suggesting that factors other than climate might influence variation in leaf morphology in *Ternstroemia*.

## CONCLUSIONS

We analyzed the relationship between environmental variables and variation in leaf morphology among populations throughout the distribution range of the *T. lineata* species complex in Mexico and Guatemala. We found that the effect of climate varies among populations and different morphological trends lead to varying patterns of geographic differentiation. The results indicate that converging leaf morphologies can be observed among individuals from different populations, which appears to be a parallel response to similar environmental factors rather than to geographical proximity. Although the climate-morphology association may eventually lead to adaptive evolution in this species complex, the observed patterns should be corroborated with analyses of genetic structure among populations.

The combination of multivariate statistical and geographic analyses of leaf morphology allowed us to establish variability patterns that are a fundamental first step to understanding the process of population differentiation in this group of closely related species. In turn, the integration of genetic data with morphological variation in vegetative and reproductive structures can lead to a better understanding of the reproductive barriers and the processes of species formation in these species. Our research highlights the key role of the environment in molding morphological variation among plant populations at the local and regional scales. Last, a formal taxonomic treatment that includes morphological traits of the leaf, flowers and fruits, together with molecular markers, is needed to evaluate the degree of differentiation among species and subspecies of the *T. lineata* complex.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This paper is a requirement for O. Alcántara-Ayala in the graduate program of Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). We acknowledge Andrés Torres-Miranda and Hernán Alvarado-Sizzo for field assistance and their critical suggestions on the final version of this manuscript. We thank to Celia

Sanginés, Rito Vega, Antonio Solís, Francisco Maradiaga, Armando Ponce, Mario Véliz, Dagoberto Alavez and Andrés González for field assistance. We also thank to Ramón Cuevas for the facilities to access the Manantlán Biosphere Reserve.

## ADDITIONAL INFORMATION AND DECLARATIONS

### Funding

This work was supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (PhD grant for Othón Alcántara-Ayala No. 245683) and the Dirección General de Asuntos del Personal Académico-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (No. IV201015 and No. IN215914). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

### Grant Disclosures

The following grant information was disclosed by the authors:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología: 245683.

Dirección General de Asuntos del Personal Académico-Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica: IV201015, IN215914.

### Competing Interests

The authors declare there are no competing interests.

### Author Contributions

- Othón Alcántara-Ayala conceived and designed the experiments, performed the experiments, analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the paper, approved the final draft.
- Ken Oyama conceived and designed the experiments, analyzed the data, contributed reagents/materials/analysis tools, authored or reviewed drafts of the paper, approved the final draft.
- César A. Ríos-Muñoz and Santiago Ramirez-Barahona analyzed the data, authored or reviewed drafts of the paper, approved the final draft.
- Gerardo Rivas analyzed the data, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the paper, approved the final draft.
- Isolda Luna-Vega conceived and designed the experiments, performed the experiments, contributed reagents/materials/analysis tools, prepared figures and/or tables, authored or reviewed drafts of the paper, approved the final draft.

### Field Study Permissions

The following information was supplied relating to field study approvals (i.e., approving body and any reference numbers):

A field permit of scientific collection (Official number SGPA / DGVS / 12770/16) was issued by the Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, of Mexico.

## Data Availability

The following information was supplied regarding data availability:

The raw data are available in the [Supplemental Files](#).

## Supplemental Information

Supplemental information for this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.7717/peerj.8307#supplemental-information>.

## REFERENCES

- Adams WW, Ichiro III. 2018. *The leaf: a platform for performing photosynthesis*. Cham: Springer International Publishing DOI 10.1007/978-3-319-93594-2.
- Albarrán-Lara AL, Petit RJ, Kremer A, Caron H, Dávila P, Gruger PF, Peñaloza Ramírez JM, Oyama K. 2019. Limited genetic differentiation between two morphologically and ecologically distinct giant-leaved Mexican oaks. *Plant Systematics and Evolution* 305:89–101 DOI 10.1007/s00606-018-1554-8.
- Alcántara-Ayala O, Luna-Vega I, Velázquez A. 2002. Altitudinal distribution patterns of Mexican cloud forests based upon preferential characteristic genera. *Plant Ecology* 161:167–174 DOI 10.1023/A:1020343410735.
- Aschcroft MB, French KO, Chisholm LA. 2011. An evaluation of environmental factors affecting species distributions. *Ecological Modelling* 222:524–531 DOI 10.1016/j.ecolmodel.2010.10.003.
- Bartholomew B, McVaugh R. 1997. Identification and typification of *Ternstroemia lineata* de Candolle (Theaceae). *Novon* 7:14–16 DOI 10.2307/3392066.
- BioMedware. 2013. BoundarySeer: software for the detection and analysis of geographic boundaries. User manual version 1.5. BioMedware, Inc.
- Brito JC, Santos X, Pleguezuelos JM, Sillero N. 2008. Inferring evolutionary scenarios with geostatistics and geographical information systems for the viperid snakes *Viper alatastei* and *Viper amonticola*. *Biological Journal of the Linnean Society* 95:790–806 DOI 10.1111/j.1095-8312.2008.01071.x.
- Chalcoff VR, Ezcurra C, Aizen MA. 2008. Uncoupled geographical variation between leaves and flowers in a South-Andean Proteaceae. *Annals of Botany* 102:79–91 DOI 10.1093/aob/mcn057.
- Chevin LM, Lande R, Mace GM. 2010. Adaptation, plasticity and extinction in a changing environment: towards a predictive theory. *PLOS Biology* 8:e1000357 DOI 10.1371/journal.pbio.1000357.
- Cittadini ED, Peri PL. 2006. Estimation of leaf area in sweet cherry using a non-destructive method. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 35:143–150.
- ESRI. 2011. ArcGIS desktop: release 10. Redlands: Environmental Systems Research Institute.
- Fenster CB, Stenøien HC. 2001. Clines and ecotypes. In: Robinson R, ed. *Plant Sciences 1*. Macmillan Reference USA, 161–163.

- Frenne P, Graae BJ, Rodríguez-Sánchez F, Kolb A, Chabrierie O, Decocq G, De Kort H, Schrijver A, Diekmann M, Eriksson O, Gruwez R, Hermy M, Lenoir J, Plue J, Coomes DA, Verheyen P. 2013. Latitudinal gradients as natural laboratories to infer species' responses to temperature. *Journal of Ecology* **101**:784–795 DOI [10.1111/1365-2745.12074](https://doi.org/10.1111/1365-2745.12074).
- Futuyma DJ. 1998. *Evolutionary biology*. 3rd edition. Sunderland: Sinauer Associates.
- Givnish TJ. 1979. On the adaptive significance of leaf form. In: Solbrig OT, Jain S, Johnson GB, Raven PH, eds. *Topics in plant population biology*. New York: Columbia University Press, 375–407.
- Givnish TJ. 1987. Comparative studies of leaf form: assessing the relative roles of selective pressures and phylogenetic constraints. *New Phytologist* **106**:131–160 DOI [10.1111/j.1469-8137.1987.tb04687.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1987.tb04687.x).
- González-Villarreal L. 2001. *La familia Theaceae en el estado de Jalisco, México*. Guadalajara, Jalisco: Universidad de Guadalajara, 41.
- Gratani L. 2014. Plant phenotypic plasticity in response to environmental factors. *Advances in Botany* **2014**:1–17 DOI [10.1155/2014/208747](https://doi.org/10.1155/2014/208747).
- Gregory-Wodzicki KM. 2000. Relationships between leaf morphology and climate, Bolivia: implications for estimating paleoclimate from fossil floras. *Paleobiology* **26**:668–688 DOI [10.1666/0094-8373\(2000\)026](https://doi.org/10.1666/0094-8373(2000)026).
- Guerin GR, Wen H, Lowe AJ. 2012. Leaf morphology shift linked to climate change. *Biology Letters* **8**:882–886 DOI [10.1098/rsbl.2012.0458](https://doi.org/10.1098/rsbl.2012.0458).
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *The International Journal of Climatology* **25**:1965–1978 DOI [10.1002/joc.1276](https://doi.org/10.1002/joc.1276).
- IBM Corp. Released. 2010. IBM SPSS statistics for windows, version 19.0. Armonk: IBM Corp.
- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). 2001. Conjunto de datos vectoriales Fisiográficos. Continuo Nacional. Escala 1:1 000 000. Serie I. Available at [http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/Productos/prod\\_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/geografia/tematicas/FISIOGRAFIA/702825267575\\_s.zip](http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/Productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/geografia/tematicas/FISIOGRAFIA/702825267575_s.zip).
- Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI), Instituto Nacional de Ecología (INE), Comisión Nacional de Agua (CONAGUA). 2007. Mapa de cuencas hidrográficas de México. Scale 1:250000. Mexico City.
- Johnston K, Ver Hoef JM, Krivoruchko K, Lucas N. 2001. *Using ArcGIS geostatistical analyst*. Redlands: ESRI.
- Jones HG. 2014. *Plants and microclimate. A quantitative approach to environmental plant physiology*. 3rd edition. Cambridge: Cambridge University Press DOI [10.1017/CBO9780511845727](https://doi.org/10.1017/CBO9780511845727).
- Kidd DM, Ritchie MG. 2006. Phylogeographic information systems: putting the geography into phylogeography. *Journal of Biogeography* **33**:1851–1865 DOI [10.1111/j.1365-2699.2006.01574.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2006.01574.x).

- Kidner C, Umbreen S. 2010.** Why is leaf shape so variable? *International Journal of Plant Developmental Biology* 4:64–75.
- Kobuski CE. 1942.** Studies in the Theaceae—XIII. Notes on the Mexican and Central American species of *Ternstroemia*. *Journal of the Arnold Arboretum* 23:464–478 DOI 10.5962/bhl.part.18685.
- Leigh EG. 1975.** Structure and climate in tropical rain forest. *Annual Review of Ecology and Systematics* 6:67–86 DOI 10.1146/annurev.es.06.110175.000435.
- Lightbody JP. 1985.** Distribution of leaf shapes of *Piper* sp. in a tropical cloud forest: evidence for the role of drip-tips. *Biotropica* 17:339–342 DOI 10.2307/2388599.
- Luna-Vega I, Alcántara-Ayala O, Contreras-Medina R. 2004.** Patterns of diversity, endemism and conservation: an example with Mexican species of Ternstroemiaceae Mirb. ex DC. (Tricolpates: Ericales). *Biodiversity and Conservation* 13:2723–2739 DOI 10.1007/s10531-004-2145-2.
- Malhado ACM, Malhi Y, Whittaker RJ, Ladle RJ, Ter Steege H, Phillips OL, Butt N, Aragão LEOC, Quesada CA, Araujo-Murakami A, Arroyo L, Peacock J, López-González G, Baker TR, Anderson LO, Almeida S, Higuchi N, Killeen TJ, Monteagudo A, Neill D, Pitman N, Prieto A, Salomão RP, Vásquez-Martínez R, Laurance WF. 2009b.** Spatial trends in leaf size of Amazonian rainforest trees. *Biogeosciences* 6:1563–1576 DOI 10.5194/bg-6-1563-2009.
- Malhado ACM, Whittaker RJ, Malhi Y, Ladle RJ, Ter Steege H, Butt N, Aragão LEOC, Quesada CA, Murakami-Araujo A, Phillips OL, Peacock J, López-González G, Baker TR, Anderson LO, Arroyo L, Almeida S, Higuchi N, Killeen TJ, Monteagudo A, Neill DA, Pitman NCA, Prieto A, Salomão RP, Vásquez MR, Laurance WF, Ramírez H. 2009a.** Spatial distribution and functional significance of leaf lamina shape in Amazonian forest trees. *Biogeosciences* 6:1577–1590 DOI 10.5194/bg-6-1577-2009.
- Marshall JS. 2007.** Geomorphology and physiographic provinces. In: Bundschuh J, Alvarado GE, eds. *Central America: geology, resources and hazards*. Vol. 1. London: Taylor & Francis Group plc, 618.
- McDonald PG, Fonseca CR, Overton JM, Westoby M. 2003.** Leaf-size divergence along rainfall and soil-nutrient gradients: is the method of size reduction common among clades? *Functional Ecology* 17:50–57 DOI 10.1046/j.1365-2435.2003.00698.x.
- Michaletz ST, Weiser MD, McDowell NG, Zhou J, Kaspari M, Helliker BR, Enquist B. 2016.** The energetic and carbon economic origins of leaf thermoregulation. *Nature Plants* 2:1–9 DOI 10.1038/nplants.2016.129.
- Moeller AP, Merilä J. 2004.** Analysis and interpretation of long-term studies investigating responses to climate change. *Advances in Ecological Research* 35:111–130 DOI 10.1016/S0065-2504(04)35006-3.
- Moles AT, Perkins SE, Laffan SW, Flores-Moreno H, Awasthy M, Tindall ML, Sack L, Pitman A, Kattge J, Aarssen LW, Anand M, Bahn M, Blonder B, Cavender-Bares J, Hans J, Cornelissen C, Cornwell WC, Díaz S, Dickie JB, Freschet GT, Griffiths JG, Gutierrez AG, Hemmings FA, Hickler T, Hitchcock TD, Keighery M, Kleyer M, Kurokawa H, Leishman MR, Liu K, Niinemets U, Onipchenko**



- V, Onoda Y, Peñuelas J, Pillar VD, Reich PB, Shiodera S, Siefert A, Sosinski Jr EE, Soudzilovskaia NA, Swaine EK, Swenson NG, Van Bodegom PM, Warman L, Weiher E, Wright IJ, Zhang H, Zobel M, Bonser SP. 2014. Which is a better predictor of plant traits: temperature or precipitation? *Journal of Vegetation Science* 25:1167–1180 DOI 10.1111/jvs.12190.
- Nautival BM, Singh PK, Sukla RN, Prakash S, Kumar A. 1990. Correcting leaf area measurement by conventional methods: a new approach for apple (*Malus domestica* Borkh). *Journal of Horticultural Science* 65:15–18 DOI 10.1080/00221589.1990.11516022.
- Nicotra AB, Leigh A, Boyce CK, Jones CS, Niklas KJ, Royer DL, Tsukaya H. 2011. The evolution and functional significance of leaf shape in the angiosperms. *Functional Plant Biology* 38:535–552 DOI 10.1071/FP11057.
- Niinemets U. 2001. Global-scale climatic controls of leaf dry mass per area, density, and thickness in trees and shrubs. *Ecology* 82:453–469 DOI 10.1890/0012-9658(2001)082[0453:GSCCOL]2.0.CO;2.
- Oksanen J, Blanchet FG, Friendly M, Kindt R, Legendre P, McGlenn D, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Szoecs E, Wagner H. 2018. Vegan: community ecology package. R package version 2.5-3. Available at <https://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Oliver MA, Webster R. 1990. Kriging: a method of interpolation for geographical information systems. *International Journal of Geographical Information Systems* 4:313–332 DOI 10.1080/02693799008941549.
- Ordoñez JC, Van Bodegom PM, Witte JPM, Wright IJ, Reich PB, Aerts R. 2009. A global study of relationships between leaf traits, climate and soil measures of nutrient fertility. *Global Ecology and Biogeography* 18:137–149 DOI 10.1111/j.1466-8238.2008.00441.x.
- Peppe DJ, Royer DL, Cariglino B, Oliver SY, Newman S, Leight E, Enikolopov G, Fernandez-Burgos M, Herrera F, Adams JM, Correa E, Currano ED, Erickson JM, Hinojosa LF, Hoganson JW, Iglesias A, Jaramillo CA, Johnson KR, Jordan GJ, Kraft NJB, Lovelock EC, Lusk CH, Niinemets U, Peñuelas J, Rapsom G, Wing SL, Wright IJ. 2011. Sensitivity of leaf size and shape to climate: global patterns and paleoclimatic applications. *New Phytologist* 190:724–739 DOI 10.1111/j.1469-8137.2010.03615.x.
- Pfennig DW, Wund MA, Snell-Rood EC, Cruickshank T, Schlichting CD, Moczek AP. 2010. Phenotypic plasticity impacts on diversification and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 25:459–467 DOI 10.1016/j.tree.2010.05.006.
- R Core Team. 2018. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Available at <https://www.R-project.org/>.
- Ramsey MW, Cairns SC, Vaughton GV. 1994. Geographic variation in morphological and reproductive characters of coastal and tableland populations of *Blandfordia grandiflora* (Liliaceae). *Plant Systematics and Evolution* 192:215–230 DOI 10.1007/BF00986253.

- Rico-Gray V, Palacios-Ríos M. 1996.** Leaf area variation in *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae). *Global Ecology and Biogeography Letters* 5:30–35 DOI 10.2307/2997468.
- Rohlf FJ. 2000.** NTSYSpc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.11x. Nueva York: Applied Biostatistics Inc.
- Royer DL, McElwain JC, Adams JM, Wilf P. 2008.** Sensitivity of leaf size and shape to climate within *Acer rubrum* and *Quercus kelloggii*. *New Phytologist* 179:808–817 DOI 10.1111/j.1469.
- Scoffoni C, Rawls M, McKown A, Cochard H, Sack L. 2011.** Decline of leaf hydraulic conductance with dehydration: relationship to leaf size and venation architecture. *Plant Physiology* 156:832–843 DOI 10.1104/pp.111.173856.
- Singh A. 2007.** Approximation of leaf area by using leaf dimensions in guava. I International Guava Symposium. *Acta Horticulturae* 735:321–324 DOI 10.17660/ActaHortic.2007.735.44.
- Sokal RR, Crovello TJ, Unnasch RS. 1986.** Geographic variation of vegetative characters of *Populus deltoides*. *Systematic Botany* 11:419–432 DOI 10.2307/2419078.
- Statsoft Inc. 2009.** Statistica 7.0. Tulsa: StatSoft Inc.
- Stevens PF. 2001.** Angiosperm phylogeny website. Version 14, 2017 (and more or less continuously updated since). Available at <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> (accessed on 21 November 2018).
- Thorpe RS. 1987.** Geographic variation: a synthesis of cause, data, pattern and congruence in relation to subspecies, multivariate analysis and phylogenesis. *Bolletino Di Zoologia* 54:3–11 DOI 10.1080/11250008709355549.
- Thorpe RS. 2002.** Geographic variation. In: Pagel M, ed. *Encyclopedia of evolution*. Oxford University Press, 430–435 DOI 10.1093/acref/9780195122008.001.0001.
- Tsukaya H. 2005.** Leaf shape: genetic controls and environmental factors. *The International Journal of Developmental Biology* 49:547–555 DOI 10.1387/ijdb.041921ht.
- Tsukaya H. 2018.** A consideration of leaf shape evolution in the context of the primary function of the leaf as a photosynthetic organ. In: Adams WW, Terashima I, eds. *The leaf: a platform for performing photosynthesis*. Cham: Springer, 1–26 DOI 10.1007/978-3-319-93594-2\_1.
- Uribe-Salas D, Sáenz-Romero C, González-Rodríguez A, Téllez-Valdez O, Oyama K. 2008.** Foliar morphological variation in the white oak *Quercus rugosa* Née (Fagaceae) along a latitudinal gradient in Mexico: potential implications for management and conservation. *Forest Ecology and Management* 256:2121–2126 DOI 10.1016/j.foreco.2008.08.002.
- Valladares F, Matesanz S, Guilhaumon F, Araújo MB, Balaguer L, Benito-Garzón M, Cornwel W, Gianoli E, Van Kleunen M, Naya DE, Nicotra AB, Poorter H, Zavala MA. 2014.** The effects of phenotypic plasticity and local adaptation on forecasts of species range shifts under climate change. *Ecology Letters* 17:1351–1364 DOI 10.1111/ele.12348.

- Weitzman AL. 1995.** Diversity of Theaceae and Bonnetiaceae in the Montane Neotropics. In: Churchill SP, Balslev H, Forero E, Luteyn JL, eds. *Biodiversity and conservation of neotropical montane forests*. New York: The New York Botanical Garden, 365–375.
- Weitzman AL, Dressler S, Stevens PF. 2004.** Ternstroemiaceae. In: Kubitzki K, ed. *Flowering Plants Dicotyledons. The families and genera of vascular plants*. Vol. 6. Berlin, Heidelberg: Springer.
- Werger MJA, Ellenbroek GA. 1978.** Leaf size and leaf consistence of a riverine forest formation along a climatic gradient. *Oecologia* **34**:297–308 DOI [10.1007/BF00344908](https://doi.org/10.1007/BF00344908).
- Westoby M, Falster DS, Moles AT, Vesk PA, Wright IJ. 2002.** Plant ecological strategies: some leading dimensions of variation between species. *Annual Review of Ecology and Systematics* **33**:125–159 DOI [10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150452](https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.33.010802.150452).
- Wright IJ, Dong N, Maire V, Prentice IC, Westoby M, Díaz S, Gallagher RV, Jacobs BF, Kooyman R, Law EA, Leishman MR, Niinemets Ü, Reich PB, Sack L, Villar R, Wang H, Wilf P. 2017.** Global climatic drivers of leaf size. *Science* **357**:1–5 DOI [10.1126/science.aal4760](https://doi.org/10.1126/science.aal4760).
- Wright IJ, Ladiges PY. 1997.** Geographic variation in *Eucalyptus diversifolia* (Myrtaceae) and the recognition of new subspecies *E. diversifolia* subsp. *hesperia* and *E. diversifolia* subsp. *megacarpa*. *Australian Systematic Botany* **10**:651–680 DOI [10.1071/SB96019](https://doi.org/10.1071/SB96019).
- Wright IJ, Reich PB, Westoby M, Ackerly DD, Baruch Z, Bongers F, Cavender-Bares J, Chapin T, Cornelissen JHC, Diemer M, Flexas J, Garnier E, Groom PK, Gulias J, Hikosaka K, Lamont BB, Lee T, Lee W, Lusk C, Midgley JJ, Navas ML, Niinemets U, Oleksyn J, Osada N, Poorter H, Poot P, Prior L, Pyankov VI, Roumet C, Thomas SC, Tjoelker MG, Veneklaas EJ, Villar R. 2004.** The worldwide leaf economics spectrum. *Nature* **428**:821–827 DOI [10.1038/nature02403](https://doi.org/10.1038/nature02403).
- Xiang HP. 2007.** *Ternstroemia*. In: Zhengyi W, Raven PH, Deyuan H, eds. *Flora of China, Volume 12: Hippocastanaceae through Theaceae*. St. Louis: Science Press & Missouri Botanical Garden, 475.
- Yang J, Spicer RA, Spicer TEV, Arens NC, Jacques FMB, Su T, Kennedy EM, Herman AB, Steart DC, Srivastava G, Mehrotra RC, Valdes PJ, Mehrotra NC, Zhou Z-K, Lai JS. 2015.** Leaf form-climate relationships on the global stage: an ensemble of characters. *Global Ecology and Biogeography* **24**:1113–1125 DOI [10.1111/geb.12334](https://doi.org/10.1111/geb.12334).

## Capítulo II

### **Estructura genética, variación geográfica y delimitación de especies en el complejo de especies *Ternstroemia lineata* DC. (Pentaphylacaceae)**

Cita completa:

Othón Alcántara-Ayala, Hernán Alvarado-Sizzo, Helga Ochoterena Booth, Ken Oyama, César Ramiro Martínez-González and Isolda Luna-Vega. 2020. Estructura genética, variación geográfica y delimitación de especies en el complejo de especies *Ternstroemia lineata* DC. (Pentaphylacaceae). En proceso.

ESTRUCTURA GÉNÉTICA, VARIACIÓN GEOGRÁFICA Y DELIMITACIÓN DE  
ESPECIES EN EL COMPLEJO DE ESPECIES *Ternstroemia lineata* DC.  
(PENTAPHYLACACEAE)

Othón Alcántara-Ayala<sup>1,2</sup>, Hernán Alvarado-Sizzo<sup>1</sup>, Helga Ochoterena Booth<sup>3</sup>, Ken  
Oyama<sup>4</sup>, César Ramiro Martínez-González<sup>1</sup> e Isolda Luna-Vega<sup>1\*</sup>.

1 Departamento de Biología Evolutiva, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional  
Autónoma de México (UNAM), Mexico City, México.

2 Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av.  
Universidad 3000, Mexico City, México.

3 Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-  
367, Mexico City 04510, México.

4 Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES), Unidad Morelia, Antigua carretera a  
Pátzcuaro 8701, Morelia, Michoacán, México.

\*Corresponding author, [luna.isolda@gmail.com](mailto:luna.isolda@gmail.com)

## INTRODUCCIÓN

Actualmente el género *Ternstroemia* se ubica dentro de la familia Pentaphragaceae (APG III, 2009; APG IV, 2016). Cuenta con aproximadamente 90-110 especies (Stevens, 2001; Weitzman et al., 2004; Xiang, 2007) que se distribuyen principalmente en las zonas tropicales de ambos hemisferios, desde Sri Lanka hasta el sureste y este de Asia y los trópicos y subtropicos de América, pocas en África (dos especies) (Weitzman et al., 2004).

Este género ha sido estudiado especialmente por Kobuski (1942, 1943, 1961, 1963) para América, África y Asia; por Urban (1896) para las Antillas; Wawra (1866) para Brasil; y Xiang (2007) para China. El primer autor logró una excelente monografía del género. Kobuski (1942) observó que existe mayor abundancia de especies en el Hemisferio Sur con caracteres que permiten su clara delimitación específica, mientras que las especies Mesoamericanas son poco divergentes, por lo que muchas veces se han separado con base en un sólo carácter, lo que le llevó a pensar que han derivado de un ancestro muy reciente.

Existen pocos trabajos taxonómicos del género *Ternstroemia* en México (y los que hay son muy viejos), y según el autor, se reconocen diferentes números de especies de *Ternstroemia* para el país, por ejemplo, Rose and Collins (1903-1905) reconocieron siete especies bajo el nombre de *Taonabo*, Standley (1926) aceptó seis y una especie dudosa también bajo *Taonabo*, y Kobuski (1942) citó seis, una dudosa y tres exclusiones bajo el nombre de *Ternstroemia*.

Tomando como base la clasificación de Kobuski (1942), autor que realiza el trabajo a nivel nacional más completo, los trabajos de Rose and Collins (1903-1905) y Standley (1926) sólo incluirían cuatro especies aceptadas por él, ya que las demás serían sinónimos.

En años recientes, se describieron dos nuevas especies para México por Bartholomew (1988). Poco después se llevó a cabo la tipificación de *T. lineata* por Bartholomew y McVaugh (1997), en la cual se recombinaron y corrigieron los nombres de *T. pringlei* y *T. chalicophila*, quedando como *T. lineata* subsp. *lineata* y *T. lineata* subsp. *chalicophila* respectivamente. De esta forma, se puede decir que existen para México un total de ocho especies.

En un estudio areográfico de las Ternstroemiaceae de México, Luna-Vega et al. (2004) sustentaron que en el país existen aproximadamente ocho especies de este género, cinco de ellas endémicas (v. gr. *Ternstroemia dentisepala*, *T. huasteca*, *T. lineata* subsp. *lineata*, *T. oocarpa* y *T. sylvatica*) y tres rebasan su frontera al sur hasta Honduras y Panamá (*T. lineata* subsp. *chalicophila*, *T. seemanii* y *T. tepezapote*).

La taxonomía del género en México es muy compleja y está poco entendida. Por lo anterior, es necesario llevar a cabo estudios de diferente índole para poder separar a las especies mexicanas, que no se basen exclusivamente en la mera descripción de los caracteres de morfología externa, los cuales son muy escasos en los ejemplares de herbario. Con base en un estudio previo acerca del efecto del cambio climático en *Ternstroemia lineata* (Luna-Vega et al., 2012), pudimos comprobar la dificultad que presenta delimitar plenamente a esta especie de otras especies afines lo cual nos llevó a pensar en la existencia de un complejo de especies al que denominamos complejo de especies de *T. lineata* (Alcántara et al., 2020) formado por las dos subespecies de *T. lineata*. *T. lineata* subsp. *lineata* y *T. lineata* subsp. *chalicophila*, además de *Ternstroemia dentisepala* y *Ternstroemia impressa*.

El presente estudio del complejo representa un buen modelo para poder entender los patrones de variación geográfica mediante estudios de DNA para delimitar a los linajes integrantes del mismo.

De acuerdo con Sites y Marshall (2003), existen varios métodos empleados en el análisis de los datos moleculares que van desde análisis filogenéticos, análisis multivariados, análisis de subdivisión de poblaciones empleando el estadístico  $F$  de Wright (y sus análogos), análisis de agregación de poblaciones, patrones de bandas específicas a especies y métodos basados en agrupamientos de marcadores genéticos.

Los análisis filogenéticos se basan en el principio de que existe una correspondencia entre el árbol de genes y el árbol de especies, sin embargo, la evolución reticulada y la hibridación son procesos evolutivos que representan problemas para este supuesto (Edwards, 2009). Dentro de los análisis multivariados, el análisis de componentes principales es uno de los más utilizados, ya que hace posible agrupar individuos con base en la información de múltiples caracteres, que incluso pueden ser tanto morfológicos como moleculares al mismo tiempo. Los grupos derivados de estos análisis pueden ser asignados a diferentes especies, aunque este tipo de análisis con frecuencia se utiliza sólo para caracteres morfológicos (Sites y Marshall, 2003).

Los métodos que basados en el análisis de subdivisión de poblaciones toman en cuenta cómo se distribuye la diversidad genética entre los individuos. Si la mayoría de la diversidad genética entre dos poblaciones es precisamente entre poblaciones, esto apoya el hecho de que las dos poblaciones están compuestas de individuos de diferentes especies. Estos resultados deben ser tomados como información adicional, ya que por sí solos no deberían ser una prueba válida y confiable para delimitar especies. El análisis de agregación



de poblaciones se basa en el criterio de fijación de caracteres alternos en diferentes sistemas poblacionales (Davis y Nixon, 1992).

El método de patrones de bandas especie-específicas está basado en la existencia de alelos exclusivos dentro de un linaje o en las diferencias en las frecuencias alélicas entre linajes. El uso de alelos exclusivos para delimitar especies se basa en las mismas suposiciones que el código de barras (Miller, 2007). Los métodos de agrupamiento basados en genotipos multiloci fueron por algún tiempo muy empleados en los estudios de delimitación de especies. Basándose en sus genotipos multiloci, los individuos se agrupan en diferentes grupos cada uno caracterizado por un conjunto de frecuencias alélicas en cada locus (Pritchard et al., 2000; Corander et al., 2003; Francois et al., 2006).

En los últimos años se ha incrementado drásticamente el uso de marcadores moleculares como una herramienta para delimitar especies. En un principio se ha utilizado DNA nuclear, mitocondrial y de cloroplasto, sin embargo, en tiempos recientes se ha visto que el genoma mitocondrial es insuficientemente polimórfico entre los individuos para ser informativo. Los genomas nuclear y de cloroplasto son más comúnmente empleados en los análisis de delimitación de especies (Duminil et al., 2002, 2009), aunque con limitantes principales como una baja transferibilidad de oligonucleótidos y una relativa baja diversidad nucleotídica (Small et al., 1999, Shaw et al., 2005, 2007), respectivamente. Así como repetidos eventos de transferencia horizontal que ocultan la señal filogenética (Richardson y Palmer, 2007)

La premisa básica al usar marcadores moleculares para delimitar especies es que el “árbol de especies” puede ser inferido de los “árboles de genes” (Maddison, 1997). En otras palabras, la historia evolutiva de una especie se deduce de la historia evolutiva de uno o

varios fragmentos de ADN. Sin embargo, en la realidad esto no es tan fácil sobre todo si tomamos en cuenta que en el proceso evolutivo se puede presentar evolución reticulada, duplicación de genes e introgresión (Edwards, 2009), entre muchos otros procesos que pueden provocar que la historia evolutiva de cada una de las regiones genómicas nos pueda dar una información (señal) diferente. Por ello es recomendable utilizar tantos loci como sea posible y que estos pertenezcan a diferentes compartimentos regiones del genoma, es decir, nucleares y organelares, así como separadores intergénicos e intrones. Aunque algunos de estos estudios que utilizan una combinación de diferentes marcadores han demostrado que existe una fuerte correlación entre las características morfológicas y los marcadores nucleares, además de que en general los marcadores citoplásmicos, en particular el cpDNA, resultan poco efectivos para delimitar especies (Duminil et al., 2012).

Se ha observado que los marcadores de organelos que se heredan por vía materna (DNA de cloroplasto [cpDNA] o DNA mitocondrial [mtDNA]), que se dispersan sólo por semilla pueden ser más frecuentemente introgresados y por tanto de un valor taxonómico más limitado que los marcadores nucleares (Petit y Excoffier, 2009), excepto en coníferas donde se ha observado que los límites de especies son más congruentes con los patrones de variación del cpDNA que con los patrones de variación del mtDNA (Du et al., 2009).

También es necesario señalar que generalizar el patrón matrilineal de herencia para los organelos puede llevar a conclusiones erróneas en los numerosos casos donde existen excepciones a dicho mecanismo (Greiner et al., 2015), por lo que es recomendable realizar análisis exploratorios considerando información de diversos compartimientos genómicos.

No hay estudios de hibridación de especies de este género en México, por lo cual no puede saberse que tan frecuente es, sin embargo, se ha propuesto la presencia de

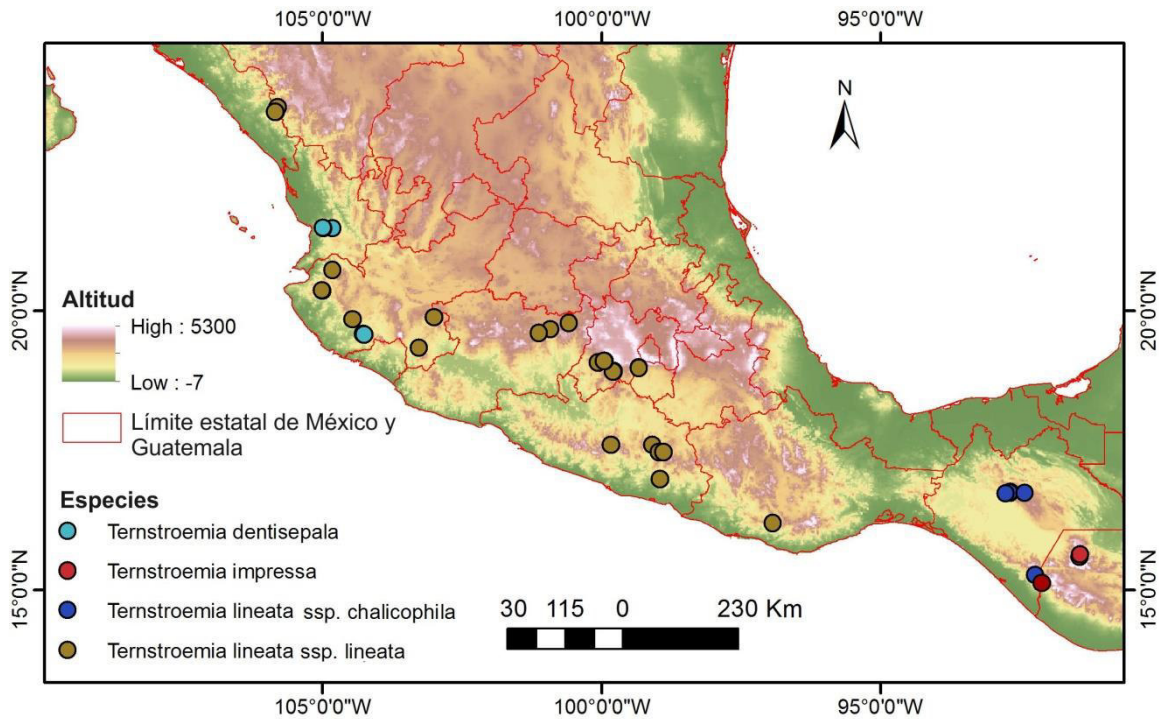
hibridación entre las especies *T. lineata* subsp. *lineata* y *T. dentisepala* (González-Villarreal, 2001). Además, está documentada la presencia de transferencia horizontal de genes en especies del género *Ternstroemia*, como una forma de introgresión (Hao et al., 2010).

El objetivo de este estudio es delimitar las especies de complejo de *Ternstroemia lineata* utilizando métodos basados en DNA, como una filogenia multiloci y un análisis filogeográfico basado en DNA nuclear ribosomal. Nuestra hipótesis es que el complejo *T. lineata* está formado por más de tres especies, que son más de las que tradicionalmente se aceptan en la actualidad.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Colecta de muestras

Se recolectaron hojas de las especies pertenecientes al complejo de 192 individuos (5 a 10 hojas por individuos) de 25 poblaciones localizadas a lo largo del área de distribución de las especies (Figura 1). Para su colecta se utilizó el permiso de colecta científica (SGPA/DGVS/12770/16), emitido por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales de México. Las hojas fueron colocadas en bolsas resellables con sílica gel y los ejemplares de referencia fueron secados y prensados para ejemplares de herbario.



**Figura 1. Distribución de las tres especies y una subespecie del complejo.**

### Métodos moleculares

El DNA se obtuvo a partir de 50 hasta 100 mg de tejido foliar. El DNA genómico se extrajo utilizando el método CTAB con algunas modificaciones (Martínez-González et al., 2017) y se cuantificó con un Nanodrop 2000c (Thermo, EE. UU.). Se prepararon diluciones de cada muestra a 20 ng para amplificar los genes.

Para llevar a cabo los análisis filogenéticos, se consideraron 18 individuos representativos de cuatro especies del complejo. Se realizó la amplificación de dos regiones nucleares: el segundo intrón del gen de copia única *LEAFY* mediante los oligonucleótidos *LFY-F* y *LFY-R* (Zhang et al., 2014), así como toda la región del espaciador transcrito interno (ITS1, 5.8s e ITS2) usando los oligonucleótidos 17SE y 26SE (Sun et al., 1994). La

amplificación del gen mitocondrial *matR* se llevó a cabo utilizando los oligonucleótidos *matR3'R* y *matR5'F* (Anderberg et al., 2002), mientras que el espaciador intergénico plastídico *trnL-trnF* requirió los oligonucleótidos universales “e” y “f” (Taberlet, 1991). Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Multigene Optimax (Labnet International, EUA) usando el kit de polimerasa Kapa3G (Kapa Biosystems, Sudáfrica) y siguiendo las condiciones del fabricante, excepto por la temperatura de alineamiento (*T<sub>m</sub>*), que se determinó para cada región mediante una prueba de gradiente (*LEAFY*= 56 °C, ITS= 60 °C, *matR*= 54 °C y *trnL-trnF* = 60 °C). Los amplificados fueron secuenciados por Macrogen USA (EUA).

#### Análisis filogenéticos

A partir de las secuencias se realizaron las siguientes particiones: el intrón *LEAFY* completo, la región ITS se consideró como espaciador 1, gen ribosomal 5.8S y espaciador 2, el gen mitocondrial se dividió en las regiones 3' y 5', mientras que el espaciador plastídico *trnL-trnF* también se mantuvo íntegro como una sola partición. Las particiones se analizaron en JModeltest 2.1.10 (Darriba et al., 2012) para determinar sus respectivos modelos de evolución molecular (Tabla 1).

Todas las particiones se concatenaron formando una supermatriz de 2959 pb y se analizaron mediante el algoritmo de Máxima Verosimilitud en el programa RAxML-NG (Kozlov et al., 2019) usando modelos de evolución molecular individuales para cada partición.

## Métodos filogeográficos

El alineamiento de las secuencias se realizó mediante el software Geneious (Biomatters Ltd, Nueva Zelanda) usando el alineamiento automático refinado manualmente. Las bases ambiguas se codificaron siguiendo el código de nomenclatura para bases nitrogenadas de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (Cornish-Bowden, 1985). Los haplotipos de las secuencias con sitios heterocigotos se reconstruyeron mediante el algoritmo PHASE (Stephens et al., 2001) en el programa DnaSP 5.10.01 (Librado y Rozas, 2009) que adicionalmente se empleó para los cálculos de los índices de fijación para diversidad genética ordenada y no ordenada ( $N_{st}$  y  $G_{st}$ , respectivamente). La red de haplotipos se contruyó mediante el software PopART (Leigh y Bryant, 2015) usando el método TCS (Clement et al., 2000). La visualización espacial de las frecuencias haplotípicas se realizó mediante ArcGIS 10.5 (ESRI, 1998).

## RESULTADOS

### Análisis filogenéticos

#### Secuencias

El intrón *LEAFY* amplificó una región de alrededor de 490 pb que, si bien fue visible en la electroforesis, solo proporcionó secuencias legibles en ocho individuos. Adicionalmente su talla es relativamente pequeña comparada con la talla reportada en Theaceae (Zhang et al., 2014). Su identidad como parte del gen *LEAFY* fue comprobada mediante la herramienta BLAST, sin embargo, el producto corresponde en su mayor parte al extremo 5' del exón 2, lo que sugiere que la talla reducida es producto de una gran delección con respecto a otras

especies del orden Ericales, mientras que su baja diversidad puede ser debida a que la mayor parte de la secuencia corresponde a una región codificante. La región nuclear ribosomal completa de los espaciadores transcritos internos 1 y 2 así como el gen ribosomal 5.8S (ITS) se constituyó de 380 pb, 299 pb y 160 pb (839 pb en total), respectivamente, obteniéndose completa para 13 individuos y con una variación total del 20.57%, constituyendo la región más variable en este trabajo. El gen mitocondrial *matR*, a pesar de constituir la región más grande (1231 pb considerando ambas partes) posee la menor variación, presentando apenas un sitio variable en la región 3'. El espaciador plástido *trnT-trnL*, por su parte, presentó un 5.01% de sitios variables, que en una secuencia corta de 399 pb constituyen 20 sitios variables. Por lo tanto, las regiones de utilidad filogenética se reducen a esta última más la región ribosomal completa.

## **Filogenias**

Las filogenias basadas en solo el espaciador plástido *trnT-trnL* recuperó a un individuo de *T. dentisepala* (FP2) y otro de *T. lineata* (OAA7071) como taxones hermanos, y estrechamente relacionados con un par de individuos de *T. ineata ssp. chalicophila* (OAA6974, OAA6978). A su vez, todos ellos están relacionados con otra especie de Pentaphylacaceae de origen asiático: *Eurya acuminata*. Dicha relación está completamente soportada (BS = 100). El segundo grupo soportado contiene una serie de individuos pertenecientes a las cuatro especies del complejo. Sin embargo, las relaciones al interior de dicho grupo no están soportadas (Figura 2, izquierda).

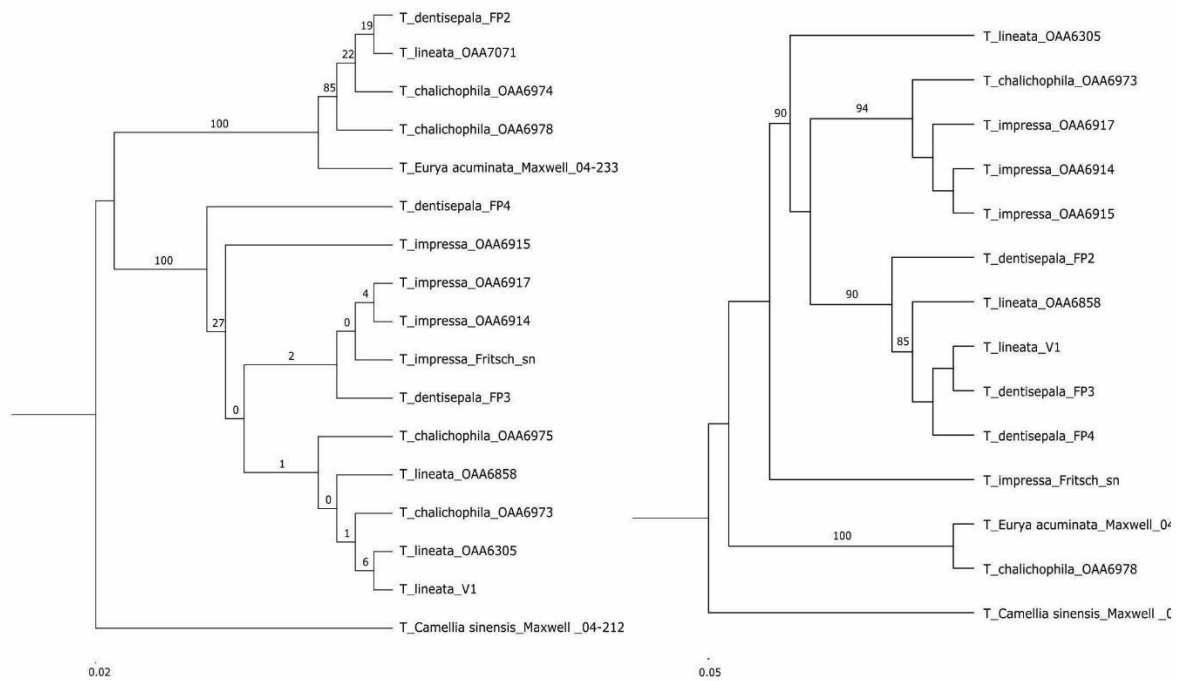
En cuanto al árbol basado en el ITS (Figura 2, derecha) se recupera fuertemente la hermandad entre un individuo de *T.lineata* subsp. *chalicophila* (OAA6974) con *Eurya acuminata* (BS=100). Por otra parte, se muestran altamente soportadas (BS=90) las relaciones entre individuos de *T. lineata* subsp. *lineata* (OAA6858 y V1) y *T. dentisepala* (FP2, FP3 y FP4). Otro grupo con alto soporte (BS=94) contiene a la mayoría de individuos de *T. impressa* (OAA6914, 6915 y 6917) y un individuo de *T.lineata* subsp. *chalicophila* (OAA6973). Con respecto a la filogenia basada en cloroplasto los datos nucleares son incongruentes con las solas excepciones de la relación *T.lineata* subsp. *chalicophila* (OAA6974) con *Eurya acuminata* (BS=100), así como la tendencia de agrupamiento por parte de los individuos OAA6914, 6915 y 6917 de *T. impressa*.

Tabla 1: Estadísticas de resumen de las secuencias empleadas.

Marcador	Origen	Tipo	n	Talla (pb)	V (%)	Pi (%)	$\pi$	Modelo
<i>LEAFY</i>	nuclear	copia única	8	490	6 (1.22%)	0(0%)	0.0039 2	TPM3 uf
ITS1	nuclear ribosomal	espaciador intergénico	1 4	53 380	53 (13.94%)	8 (2.1%)	0.0356 2	TN93
5.8S	nuclear ribosomal	gen ribosomal	1 4	160	1 (0.63%)	0(0%)	0.0008 6	JC
ITS2	nuclear ribosomal	espaciador intergénico	1 4	98 299	98 (32.76%)	41 (13.71%)	0.0384 6	TPM3 uf
Todo ITS			1 4	152 839	152 (20.57%)	49 (6.63%)		
<i>matR</i> 3'	mitocondrial	gen mitocondrial	8	645	1 (0.16%)	0(0%)	0.0006 1	JC
<i>matR</i> 5'	mitocondrial	gen mitocondrial	8	586	0 (0)	0(0%)	0	HKY
<i>trnL-trnF</i>	cloroplasto	espaciador intergénico	1 5	399	20 (5.01%)	19 (4.7%)	0.0247 6	HKY

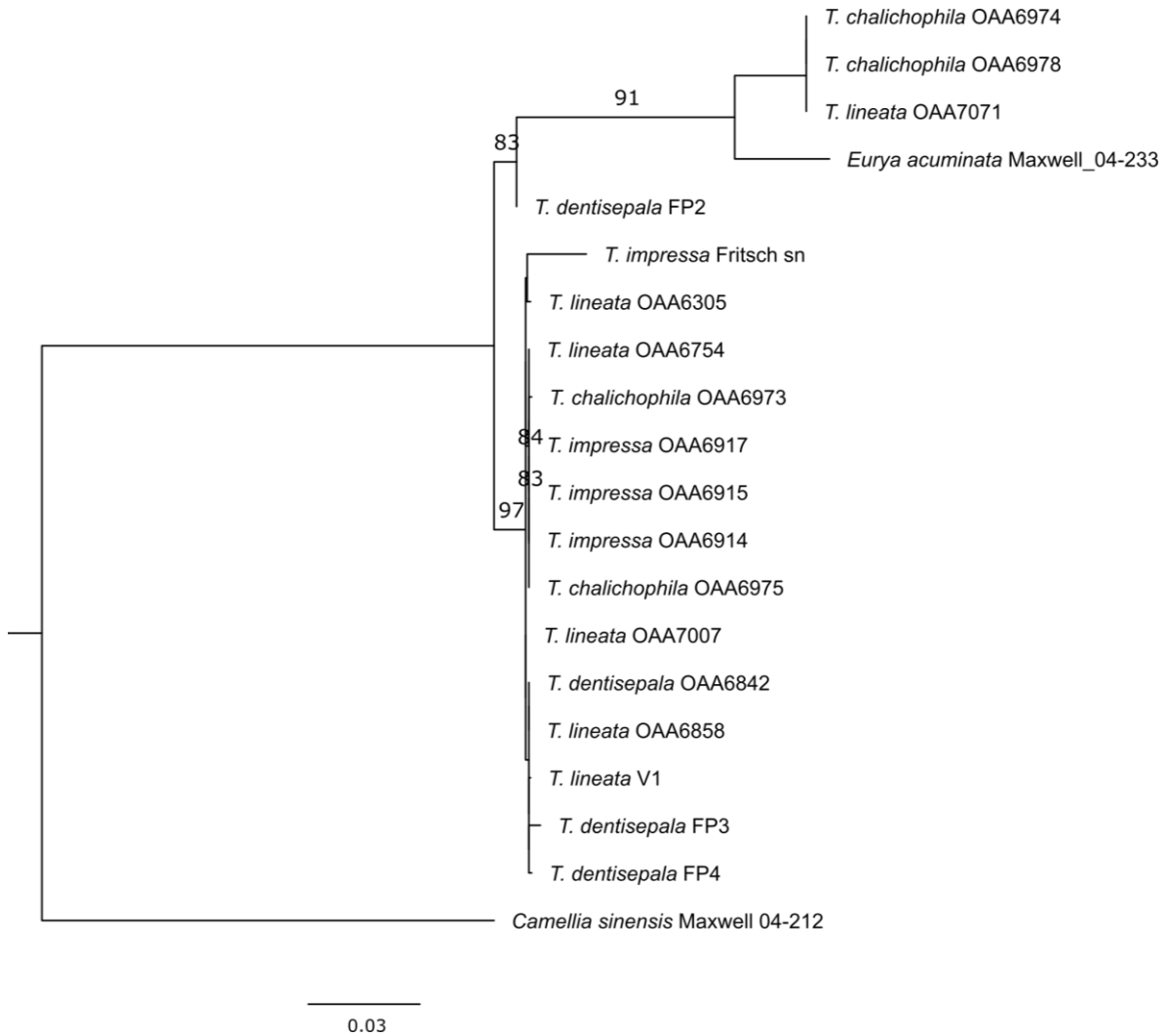
n= número de secuencias, V= número de sitios variables, Pi= Sitios parsimoniosamente informativos,  $\pi$ = diversidad nucleotídica





**Figura 2.** Filogenia del complejo de especies de *Ternstroemia lineata* obtenida mediante el algoritmo de Máxima Verosimilitud basado en el espaciador plástidico *trnL-trnF* (izq.) y la región del espaciador transcrito interno (ITS) (der.). Los números sobre las ramas representan los valores de soporte calculados mediante bootstrap.

En cuanto al análisis concatenado, predomina la señal filogenética del cloroplasto, específicamente en el mantenimiento del grupo *T. lineata* subsp. *chalicophila* (OAA6974, OAA6978) + *Eurya acuminata* (BS=91), así como la existencia de un gran grupo dentro del cual no se definen relaciones claras entre las cuatro especies del complejo, con excepción del grupo de *T. impressa* (OAA6914, 6915 y 6917) (Figura 3).



**Figura 3.** Filogenia del complejo de especies de *Ternstroemia lineata* obtenida mediante el algoritmo de Máxima Verosimilitud basado en la concatenación del espaciador plasmídico *trnL-trnF*, la región del espaciador transcrito interno (ITS), el gen nuclear de copia única *LEAFY* y el gen mitocondrial *matR*. Los números sobre las ramas representan los valores de soporte calculados mediante bootstrap.

## Análisis filogeográfico

### Estimadores básicos de diversidad

A partir de 700 pb de toda la región del ITS, se obtuvieron un total de 306 secuencias, distribuidas entre *T.lineata* subsp. *chalicophila* (34), *T. dentisepala* (32), *T. impressa* (24) y *T. lineata* subsp. *lineata* (216), dichas secuencias se clasificaron en 38 haplotipos. La especie con mayor diversidad haplotípica ( $Hd$ ) fue *T. lineata* subsp. *chalicophila* ( $Hd=0.84$ ), seguida de *T. dentisepala* ( $Hd=0.61$ ) y *T. lineata* subsp. *lineata* ( $Hd=0.51$ ), mientras que *T. impressa* se caracterizó por su baja diversidad ( $Hd=0.34$ ). Otros estimadores de diversidad como diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), mantienen dicho patrón (Tabla 2).

**Tabla 2: Parámetros de diversidad haplotípica**

Estimador	<i>T.lineata</i> subsp. <i>chalicophila</i>	<i>T.</i> <i>dentisepala</i>	<i>T.</i> <i>impressa</i>	<i>T. lineata</i> subsp. <i>lineata</i>
Número de secuencias	34	32	24	216
Sitios segregantes	25	9	1	25
Haplotipos	14	10	2	25
Diversidad haplotípica ( $Hd$ )	0.89	0.61	0.34	0.51
Diversidad nucleotídica ( $\pi$ )	0.00654	0.00154	0.00049	0.00213

### Índices de diferenciación filogeográfica

En cuanto a los valores de diferenciación globales, estimados a través de los índices de fijación para alelos ordenados ( $N_{st}$ ) fue de 0.46 y no ordenados ( $G_{st}$ ) fue de 0.16. De manera específica, la especie que mostró los mayores niveles de diferenciación fue *T. impressa*

( $N_{st}=0.82$ ,  $G_{st}=0.34$ ), con respecto a *T. dentisepala* y  $N_{st}=0.76$ /  $G_{st}=0.18$  con respecto a *T. lineata* subsp. *lineata*), *T. lineata* subsp. *chalicophila* mantiene niveles de diferenciación altos y más o menos comparables con respecto a las otras tres especies del complejo ( $N_{st}=0.2-0.37$ ,  $G_{st}=0.06-0.17$ ), mientras que *T. lineata* subsp. *lineata* y *T. dentisepala* presentan baja diferenciación ( $N_{st}=0.05$ ,  $G_{st}=0.01$ ) (Tabla 3).

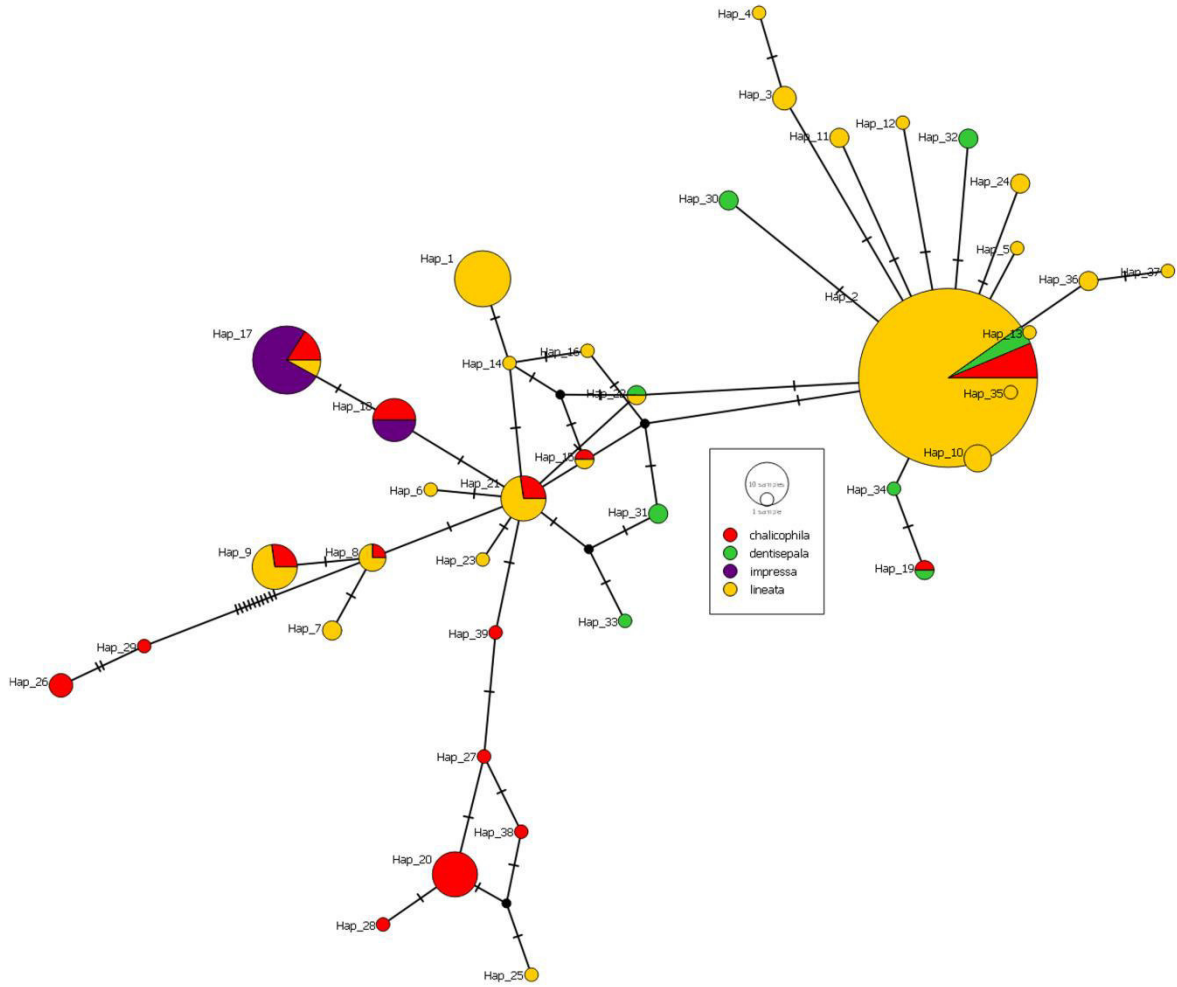
Tabla 3: Índices de fijación pareados estimados como análogos del *Fst* de Wright para Alelos ordenados ( $N_{st}$ , arriba de la diagonal) y No ordenados ( $G_{st}$ , debajo de la diagonal).

Especie	<i>Ternstroemia</i>			
	<i>lineata</i> subsp. <i>lineata</i>	<i>T. impressa</i>	<i>T. dentisepala</i>	<i>T. lineata</i> subsp. <i>chalicophila</i>
<i>T. lineata</i>	-	0.76	0.05	0.2
<i>T. impressa</i>	0.18	-	0.82	0.37
<i>T. dentisepala</i>	0.01	0.34	-	0.29
<i>T. chalicophila</i>	0.05	0.17	0.06	-

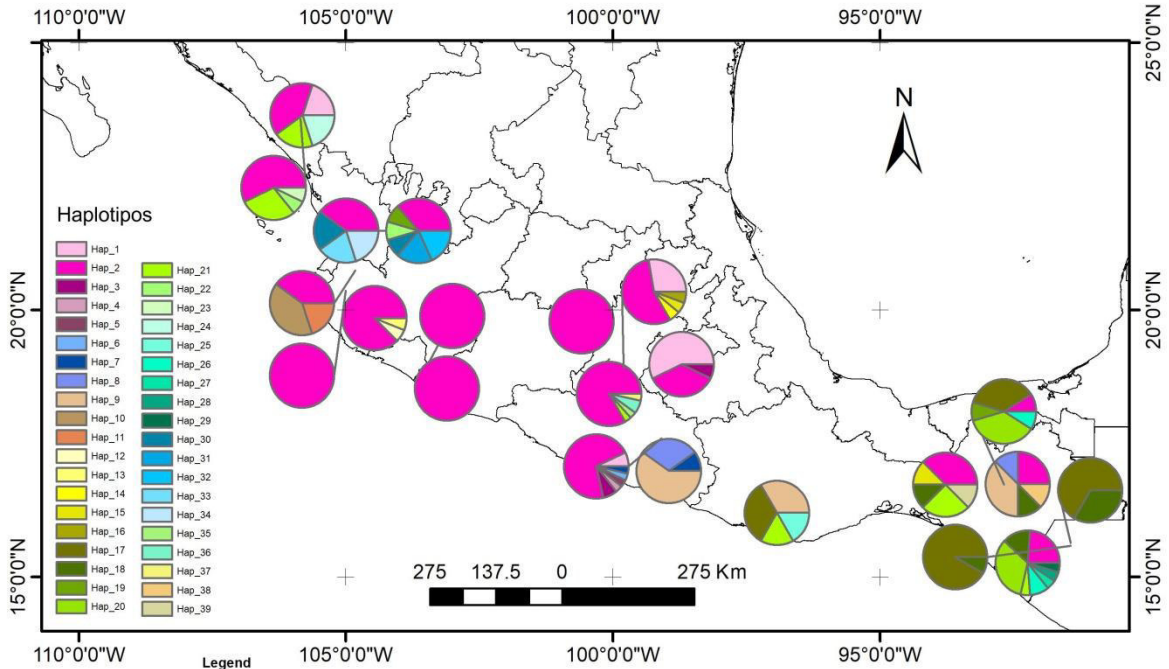
#### Red de haplotipos y distribución espacial

La red de haplotipos muestra un patrón principal de estrella, (Figura 4) cuyo haplotipo central (haplotipo 2) se encuentra predominantemente en *Ternstroemia lineata* subsp. *lineata* aunque es compartido en menor frecuencia con *T. lineata* subsp. *chalicophila* y *T. dentisepala*. Por otra parte, *T. dentisepala* se caracteriza por la presencia de haplotipos únicos a un paso mutacional del haplotipo central (haplotipos 30, 32 y 34) así como haplotipos también privados pero sin afinidad clara (31 y 33). *T. lineata* subsp. *chalicophila* se caracteriza por poseer un gran número de haplotipos privados, tales como 20, 26, 27, 28, 29, 38 y 39; adicionalmente los haplotipos 29 y 26 que son altamente divergentes con

respecto al haplotipo 8 al estar separados de éste por 10 y 12 pasos mutacionales, respectivamente, son a su vez fases de los haplotipos 20 y 28 ubicados en zonas distantes de la red. El caso de *T. impressa* se caracteriza una alta estructura filogeográfica, traducida como la presencia de solo dos haplotipos (17 y 18) a un paso mutacional entre sí y compartidos principalmente con *T. lineata* subsp. *chalicophila*. En cuanto a la distribución espacial de los haplotipos, la figura 5 muestra una bipolaridad en la diversidad: mientras el centro del país, principalmente asociado con las poblaciones de *Ternstroemia lineata* subsp. *lineata* del Faja Volcánica Transmexicana se caracteriza por la predominancia del haplotipo 2 y haplotipos derivados (mediante un paso mutacional), a tal grado que cuatro poblaciones de dicha región presentan exclusivamente dicho haplotipo. Hacia la Sierra Madre Occidental, donde se encuentran *T. dentisepala* y *Ternstroemia lineata* subsp. *lineata* se observa un aumento súbito de diversidad haplotípica. Mientras que hacia el este del Istmo de Tehuantepec, donde de manera regional coinciden *Ternstroemia lineata* subsp. *lineata*, *T. impressa* y *T. lineata* subsp. *chalicophila* el aumento de diversidad haplotípica es aún mayor.



**Figura 4.** Red de haplotipos obtenida mediante el algoritmo TCS indicando la distribución de los mismos entre las especies.



**Figura 5. Distribución de los haplotipos totales a lo largo de toda la distribución del complejo.**

## DISCUSION

Limitantes de los métodos filogenéticos para delimitar especies en el complejo de *Ternstroemia lineata*.

Si bien los métodos tradicionales de delimitación de especies se basaban mayormente en hipótesis filogenéticas cuyo principal criterio delimitador era la monofilia recíproca (Sites y Marshall, 2004), existen al menos tres fenómenos que impiden que dicha condición se cumpla: duplicación de genes, transferencia horizontal y coalescencia profunda (Edwards, 2009). En el caso particular de las plantas el escenario se complica debido a que la mayoría de los marcadores empleados en tratamientos filogenéticos proceden de marcadores

plastídicos, los cuales presentan una baja diversidad (Small et al., 2004; Ilut y Doyle, 2012) y un alto grado de coalescencia profunda (persistencia de haplotipos compartidos entre especies) (Jakob y Blattner, 2006).

La filogenia basada en el espaciador plastídico *trnT-trnL*, sugiere que a) existe una baja diversidad nucleotídica interespecífica, visible en el gran clado que contiene de manera polifilética a las cuatro especies del complejo y que b) el grupo divergente de *T. lineata ssp. chalicophila* y *Eurya acuminata* representa un escenario de coalescencia profunda, en el cual *T. lineata* subsp. *chalicophila* conserva tanto variantes plastídicas muy antiguas como variantes compartidas o relacionadas con el resto de las especies del complejo.

En el caso de los marcadores nucleares, si bien los marcadores de copia única se consideran una alternativa en cuanto a variabilidad y tiempos de coalescencia (Small et al., 2004; Shaw et al., 2005, 2007), en este caso el marcador *LEAFY* mostró un tasa de transferibilidad muy baja (pocos amplificadores legibles) y, al corresponder a una región codificante, presentó apenas un 1.22% de sitios variables lo cual es sumamente inferior al reportado en Theaceae (30.63%) por Zhang et al., (2014) y es, insuficiente para proporcionar informatividad filogenética. Adicionalmente, la escasa legibilidad de los electroferogramas de este marcador no debe descartar la existencia de duplicaciones o multicopias.

La región de ADN nuclear ribosomal ITS, que presentó la mayor variabilidad, así como grupos bien soportados (*T. lineata* subsp. *lineata* + *T. dentisepala* y un grupo discreto de *T. impressa* + *T. lineata* subsp. *chalicophila*) aún muestra ausencia de monofilia recíproca total, limitando su utilidad para delimitar especies con métodos filogenéticos. No obstante, su nivel de variación es adecuado para analizar la distribución espacial de los



linajes mediante técnicas filogeográficas. Adicionalmente, la coincidencia entre la alta divergencia de algunos individuos de *T. lineata* subsp. *chalicophila* tanto con los datos nucleares como plastídicos sugieren la presencia de especies crípticas (Bickford et al., 2007; Carstens y Satler, 2013).

## Filogeografía

### Análisis filogeográfico

Los valores globales de diferenciación muestran valores altos entre las especies, adicionalmente los índices calculados a partir de alelos ordenados ( $N_{ST}$ ) fue mucho mayor que el basado en alelos y no ordenados ( $G_{ST}$ ), lo cual es indicativo de estructura filogeográfica. Es decir, la prevalencia de haplotipos no sigue un patrón aleatorio sino que está asociada con la relación entre los mismos y su coexistencia en el espacio geográfico (Pons y Pétit, 1996).

De manera específica, la baja diferenciación entre *T. lineata* subsp. *lineata* y *T. dentisepala*, así como la presencia de haplotipos compartidos entre ambas, pero también de haplotipos privados para la segunda sugieren conexiones históricas que deben reevaluarse mediante escenarios de flujo génico, es decir, mediante una aproximación basada en genética de poblaciones usando como hipótesis de trabajo la posición de *T. dentisepala* como una subpoblación de *T. lineata* subsp. *lineata*.

A pesar de tener un bajo número muestral, *T. lineata* subsp. *chalicophila* muestra haplotipos privados en posiciones muy distantes de la red, estos haplotipos representan fases, es decir, alelos reconstruidos a partir de las secuencias heterocigas de un solo

individuo y constituye la primera evidencia de que el *pool* genético de esta especie atravesó por un escenario peripátrico temprano que aislaría haplotipos no cercanamente relacionados que actualmente coexisten, a diferencia de los resultados filogenéticos en los cuales se podría interpretar como cripticismo. El caso particular de *T. lineata* subsp. *chalicophila* requiere una aproximación histórico-demográfica que considere las variaciones de hábitat de los bosques templados durante el pasado (Ramírez-Barahona y Eguiarte, 2013) así como la evaluación del papel del flujo génico reciente (principalmente con *T. impressa*) contra coalescencia profunda mediante métodos como la computación bayesiana aproximada (Beaumont et al., 2002).

La especie *T. impressa*, por su parte, mantiene los mayores niveles de estructura filogeográfica dados principalmente por la retención de dos haplotipos en una distribución reducida lo cual permite diferenciarse del resto de las especies del complejo. Esta evidencia es congruente con los tratamientos filogenéticos en los cuales se recuperaba el grupo de *T. impressa*.

## CONCLUSIONES

El enfoque multiloci empleado, a pesar de integrar evidencias de diferentes compartimentos genómicos (núcleo, mitocondria y cloroplasto) no es suficientemente informativo para concluir sobre los límites específicos del complejo. Por otra parte, esta aproximación evidencia la existencia de linajes comunes a varias especies del complejo.

La aproximación filogeográfica, al emplear un mayor número de individuos permite vislumbrar escenarios históricos comunes entre *T. lineata* subsp. *lineata* y *T. dentisepala*,

sin embargo, el umbral que define a la segunda como subespecie de la primera necesita el empleo de otros marcadores que proporcionen una mayor informatividad filogenética así como la puesta a prueba de escenarios demográficos explícitos.

La formación de grupos soportados de *T. impressa* y *T. lineata* subsp. *chalicophila* con los métodos tanto filogenéticos como filogeográficos evidencian su estatus de especies. Adicionalmente, el método filogeográfico permitió determinar que *T. lineata* subsp. *chalicophila* se compone tanto de linajes muy divergentes entre sí más linajes comunes en el complejo y no de especies crípticas.

## LITERATURA CITADA

- Alcántara-Ayala, O., Oyama, K., Ríos-Muñoz, C.A., Rivas, G., Ramirez-Barahona, S., Luna-Vega, I. (2020). Morphological variation of leaf traits in the *Ternstroemia lineata* species complex (Ericales: Pentaphragaceae) in response to geographic and climatic variation. *PeerJ* 8:e8307 <https://doi.org/10.7717/peerj.8307>
- Anderberg, A. A., Rydin, C., y Källersjö, M. (2002). Phylogenetic relationships in the order Ericales s.l.: analyses of molecular data from five genes from the plastid and mitochondrial genomes. *American Journal of Botany* 89(4): 677-687.
- APG (THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP). (2009). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161, 105–121.
- APG (THE ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP) (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 (1): 1–20, doi:10.1111/boj.12385
- Bartholomew, B. (1988). New species and a new combination of Mexican Theaceae. *Phytologia*, 64: 457–458
- Bartholomew, B., and McVaugh, R. 1997. Identification and typification of *Ternstroemia lineata* de Candolle (Theaceae). *Novon*, 7: 14-16.
- Beaumont, M. A., Zhang, W., y Balding, D. J. (2002). Approximate Bayesian computation in population genetics. *Genetics*, 162(4), 2025-2035.

- Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K., Meier, R., Winker, K., ... y Das, I. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in ecology & evolution*, 22(3), 148-155.
- Carstens, B. C., y Satler, J. D. (2013). The carnivorous plant described as *Sarracenia alata* contains two cryptic species. *Biological Journal of the Linnean Society*, 109(4), 737-746.
- Clement, M., Posada, D. C. K. A. y Crandall, K. A. (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular ecology* 9(10): 1657-1659.
- Cornish-Bowden, A. (1985). Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences: recommendations 1984. *Nucleic Acids Research* 13(9): 3021.
- Cui, L., y Su, Y. (2015). SSR markers for a critically endangered species *Euryodendron excelsum* and a distantly related species *Ternstroemia gymnanthera* (Ternstroemiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* 58: 288-292.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., y Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8): 772-772.
- Davis, J.I. and Nixon, K.C. (1992) Populations, genetic variation, and the delimitation of phylogenetic species. *Systematic Biology*, 41: 421-435.
- Du, FK. Petit, RJ. Liu, JQ. 2009. More introgression with less gene flow: chloroplast versus mitochondrial DNA in the *Picea asperata* complex in China, and comparison with other conifers. *Mol. Ecol.* 18, 1396-1407

- Duminil, J., y Di Michele, M. (2009). Plant species delimitation: a comparison of morphological and molecular markers. *Plant Biosystems* 143(3) 528-542.
- Edwards, S. V. (2009). Is a new and general theory of molecular systematics emerging? *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 63(1), 1-19.
- ESRI. 2014. ArcGis Desktop: release 10.3. Redlands, California; Environmental systems research institute.
- González-Villarreal, L. 2001. *La familia Theaceae en el estado de Jalisco*, México. Guadalajara, Jalisco: Universidad de Guadalajara. 41 p. Available at <http://floradejalisco.cucba.udg.mx/12theaceae.pdf> (accessed March 22 2018).
- Greiner, S., Sobanski, J., y Bock, R. (2015). Why are most organelle genomes transmitted maternally? *Bioessays*, 37(1), 80-94.
- Hao, W., Richardson, A.O., Zheng, Y., Palmer. 2010. JD: Gorgeous mosaic of mitochondrial genes created by horizontal transfer and gene conversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 107: 21576-21581. 10.1073/pnas.1016295107.
- Ilut, D. C., y Doyle, J. J. (2012). Selecting nuclear sequences for fine detail molecular phylogenetic studies in plants: a computational approach and sequence repository. *Systematic Botany*, 37(1), 7-14.
- Jakob, S. S., y Blattner, F. R. (2006). A chloroplast genealogy of *Hordeum* (Poaceae): long-term persisting haplotypes, incomplete lineage sorting, regional extinction, and the consequences for phylogenetic inference. *Molecular Biology and Evolution*, 23(8), 1602-1612.

- Kobuski, C.E. (1942). Studies in the Theaceae. XIII. Notes on the Mexican and Central American species of *Ternstroemia*. *Journal of the Arnold Arboretum*, 23: 464–478.
- Kobuski, C.E., (1943). Studies in the Theaceae. XIV. Notes on the West Indian species of *Ternstroemia*. *Journal of the Arnold Arboretum*, 24: 60–76.
- Kobuski, C.E., (1961). Studies in the Theaceae. XXXII. A review of the genus *Ternstroemia* in the Philippine Islands. *Journal of the Arnold Arboretum*, 42: 263–275.
- Kobuski, C.E., 1963. Studies in the Theaceae. XXXIV. Some Asiatic taxa of *Ternstroemia*. *Journal of the Arnold Arboretum*, 44: 421–434.
- Kozlov, A. M., Darriba, D., Flouri, T., Morel, B., y Stamatakis, A. (2019). RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics* 35(21): 4453-4455.
- Leigh, J. W., y Bryant, D. (2015). Popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 6(9): 1110-1116.
- Librado, P., y J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Luna-Vega, I., Alcántara, O., and Contreras-Medina, R. (2004). Patterns of diversity, endemism and conservation: an example with Mexican species of Ternstroemiaceae Mirb. ex DC. (Tricolpates: Ericales). *Biodiversity and Conservation*, 13:2723–2739.  
doi:10.1007/s10531-004-2145-2

- Luna-Vega, I., O. Alcántara-Ayala, R. Contreras-Medina y C.A. Ríos-Muñoz. 2012. Ecological niche modeling on the effect of climatic change and conservation of *Ternstroemia lineata* DC. (Ternstroemiaceae) in Mesoamerica. *Botany* 90:637- 650.
- Ma, J. Q., Ma, C. L., Yao, M. Z., Jin, J. Q., Wang, Z. L., Wang, X. C., y Chen, L. (2012). Microsatellite markers from tea plant expressed sequence tags (ESTs) and their applicability for cross-species/genera amplification and genetic mapping. *Scientia horticulturae* 134: 167-175.
- Maddison, W. P. (1997). Gene trees in species trees. *Systematic biology*, 46(3), 523-536.
- Martínez-González, C. R., Gallegos-Vázquez, C., Luna-Vega, I., & García-Sandoval, R. (2015). *Opuntia leiascheinvariana*, una nueva especie de Cactaceae del Estado de Hidalgo, México. *Botanical Sciences* 93(3): 517-529.
- Petit, R., Excoffier, L. (2009). Gene flow and species delimitation. *Trends in Ecology & Evolution*, 24: 386-393. 10.1016/j.tree.2009.02.011.
- Richardson, A. O., Palmer, J. D. (2007). Horizontal gene transfer in plants. *Journal of experimental botany*, 58(1), 1-9
- Shaw, J., Lickey, E. B., Schilling, E. E., & Small, R. L. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American journal of botany*, 94(3), 275-288.
- Shaw, J., Lickey, E. B., Beck, J. T., Farmer, S. B., Liu, W., Miller, J., ... & Small, R. L. (2005). The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast



- DNA sequences for phylogenetic analysis. *American journal of botany*, 92(1), 142-166.
- Shi, X., Wu, H., Xie, H., Zheng, Y., Huang, Y., & Yu, S. (2017). Development of microsatellite markers for *Eurya acuminatissima* (Theaceae). *Applications in Plant Sciences* 5(7): 1700037.
- Sites Jr, J. W., y Marshall, J. C. (2004). Operational criteria for delimiting species. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 35, 199-227.
- Small, R. L., Cronn, R. C., & Wendel, J. F. (2004). Use of nuclear genes for phylogeny reconstruction in plants. *Australian Systematic Botany*, 17(2), 145-170.
- Stephens, M., Smith, N. J., y Donnelly, P. (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *The American Journal of Human Genetics* 68(4): 978-989.
- Sun, L., Meng, K., Liao, B., Li, C., Zhang, Y., Liao, W., y Chen, S. (2017). Development and characterization of genomic SSR markers for *Anneslea fragrans* (Pentaphylacaceae) 1. *Applications in Plant Sciences* 5(10): 1700086.
- Sun, Y., Skinner, D. Z., Liang, G. H., y Hulbert, S. H. (1994). Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 89(1): 26-32.
- Wang, Z., Hu, Z., y Huang, L. (2015). Development and characterization of genomic microsatellite markers in *Apterosperma oblata* (Theaceae) and cross-amplification in *Euryodendron excelsum* (Ternstroemiaceae). *Conservation Genetics Resources* 7(1): 119-120.

Xiang HP. 2007. *Ternstroemia*. In: Zhengyi W., Raven P.H. & Deyuan H. (eds.). Flora of China, Volume 12: Hippocastanaceae through Theaceae. Science Press & Missouri Botanical Garden. St. Louis, Missouri, USA. 475 pages ISBN: 1930723792.

Zhang, W., Kan, S. L., Zhao, H., Li, Z. Y., y Wang, X. Q. (2014). Molecular phylogeny of tribe Theae (Theaceae s.s.) and its implications for generic delimitation. *PloS One* 9(5): e98133.

## Capítulo III

### **Morphological differentiation among populations of *Ternstroemia tepezapote* Schltl. & Cham. (Ericales: Pentaphylacaceae)**

Cita completa:

Othón Alcántara-Ayala, Andrés Torres-Miranda, Isolda Luna-Vega and Ken Oyama (2020)  
Morphological differentiation among populations of *Ternstroemia tepezapote*  
Schltl. & Cham. (Ericales: Pentaphylacaceae). En revisión

**Morphological differentiation among populations of *Ternstroemia tepezapote* Schldl. & Cham. (Ericales: Pentaphylacaceae)**

Othón Alcántara-Ayala<sup>1</sup>, Andrés Torres-Miranda<sup>2</sup>, Isolda Luna-Vega<sup>1\*</sup> and Ken Oyama<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Biogeografía y Sistemática, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología Evolutiva, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Apartado Postal 70-399, Ciudad Universitaria, México 04510, D.F.

<sup>2</sup> Laboratorio Nacional de Análisis y Síntesis Ecológica para la Conservación de los Recursos Genéticos. Escuela Nacional de Estudios Superiores (ENES) Unidad Morelia, UNAM. Antigua carretera a Pátzcuaro 8701, Col. Ex-Hacienda de San José de la Huerta, 58190, Morelia, Michoacán, México.

\*Correspondence author: luna.isolda@gmail.com

**Abstract:** The aim of this study was to characterize environmentally and morphologically the populations of *T. tepezapote s.s.* (a Mesoamerican species with problematic taxonomic delimitation) from *T. tepezapote s.l.* and to examine if there are morphological breaks among and within them based in their environmental differences. We tested and identified the environmental segregation of these populations based on their fundamental niches through multivariate ordination methods. The degree of morphological differentiation in leaves, flowers (sepals) and fruits was quantified in each environmental group defined as *T. tepezapote s.l.* along its geographic distribution in Mexico. Three Mexican environmental groups of populations were identified. The analyses of fruit morphometry showed an evident discrimination among the three environmental groups. Similar results were obtained from the analyses of leaves and flowers (sepals) morphometry but with less statistical power. The analysis of fruit morphometry detected the five environmental sub-groups previously identified. Similar results were obtained with the morphological analyses strengthening our results. We conclude that only the populations from northern Veracruz (Tepetzintla, Chontla and vicinities) from low altitudes should be considered as *Ternstroemia tepezapote s.s.* These populations need to be renamed, so it is necessary to reconsider some of the earlier proposed synonymies as valid taxonomic entities.

Key words: multivariate analyses, geometric morphometry, morphological analysis, fundamental niche, environmental characterization.

## **Introduction**

The concept of ecological niche has been widely used in ecology to assess the divergence among populations and species in both evolutionary ecology (Schulter 2000; Nosil and Sandoval 2008) and ecological biogeography (Contreras-Medina et al. 2010; Luna-Vega et al. 2012). Species are sets of organisms sharing morphological discontinuous exclusive characters (without character overlapping with other species) (Dai et al. 2020). These sets of organisms are circumscribed to certain population in the geographic space (Mayr 1942; Zapata and Jiménez 2012). The morphological characters are essential in species delimitation, but some processes as cryptic and plastic phenotypes can difficult the limits among them (Hong-Wa and Besnard 2013).

Phenotypic variation is a consequence of the environmental heterogeneity found in the areas of distribution of the species, as a response to changes in their habitat. Plasticity refers to the phenotypic and functional diversity caused by the environment, generating variation within and among the populations of one species (Pfennig et al. 2010). Phenotypic plasticity promotes the population divergence across an adaptative landscape, which in turn promotes the emergence of new traits that lead to speciation and sometimes to evolutionary radiations (Schluter 2000; Ackerman and Doebelli 2004; Diniz-Filho et al. 2010; Pfennig et al. 2010). The loss of plasticity is the result of the phenotypes fixation in different environments in the populations of one species, which in turn causes its morphological and evolutionary divergence (Pfennig et al. 2010).

Zapata and Jiménez (2012) proposed that a clear delimitation of populations circumscribed to different species can only be done when there is not an overlap in phenotypic variation between populations. In this case, it is possible to recognize a discrete

phenotype. However, the morphological discontinuities between populations should not be an exclusive consequence of environmental differences along latitude or altitude gradients (Zapata and Jiménez 2012). These discontinuities may also be explained through geographical isolation by distance between populations in similar environments (de Queiroz 2007). Nosil and Sandoval (2008) argued that populations occupying different environments drive phenotypic divergence and/or speciation, but the evolutionary divergence may precede through stages as polymorphism, population differentiation, ecotype and race formation and speciation.

Gravilet and Losos (2009) identified some processes involved in speciation from the combined analyses of ecological niches and morphological variation: a) a rapid morphological divergence occurring before the adaptative radiation process, that gradually is reduced across the time; b) the initial divergence seems to be associated to the macro-habitat of the species, followed by the differentiation involved to the micro-habitat of the species. In this case, a macro-habitat is defined at a global scale by the plant communities or life zones; on the other hand, the micro-habitat is understood as the environmental heterogeneity within a community in a smaller scale (Morris 1987; Stevens and Tello 2009); c) population divergence is favored in taxa with wide distributional ranges.

The geometric morphometry is a powerful tool to delimit plant entities difficult to define taxonomically, this method allowed to recognize the form how an important features in the characterization of taxonomical entities as species, subspecies and varieties (Möller et al. 2007; Peruzzi and Passalacqua 2008; de la Estrella et al. 2009; Kaplan and Marhold 2012; Silva et al. 2012; Viscosi et al. 2012; Hong-Wa and Besnard 2013). Most of these studies focused in the differentiation of leaf shape, but some of them considered the

analysis of other kind of characters (as flower and fruit attributes), allowing to strengthen the hypotheses of morphological divergence.

The genus *Ternstroemia* Mutis ex L.f. comprises approximately 130 species distributed mainly in tropical regions, including the Neotropics, Southeast Asia and tropical Africa (Stevens 2001). Urban (1896) and Wawra (1886) undertook the first taxonomic studies on species from the Antilles and Brazil. Kobuski (1942, 1943, 1961, 1963) published detailed monographs on *Ternstroemia* species from America, Africa and Asia. Kobuski (1942) observed that South American species have a conspicuous morphological divergence between them, which allowed the delimitation of species. On the contrary, this author noticed a lack of morphological differentiation between Mesoamerican species, which has led to many species being recognized based on single morphological traits. In most cases, these traits (e.g., bracteoles, caduceus petals) show extreme variability and are commonly not observable in herbarium specimens which make them unrecognizable (Kobuski 1942; González-Villarreal 2001) and often misidentified. Moreover, Standley (1920-1926) proposed that Mexican *Ternstroemia* is a complex of closely related species that are the result of recent events of divergence (Kobuski 1942). These problems caused doubts on the taxonomic validity of *Ternstroemia* species currently recognized for Mexico and Central America.

In their study of Pentaphylacaceae (= Ternstroemiaceae), Luna-Vega *et al.* (2004) recognized eight species for Mexico, five of them endemic species with a restricted distribution [*Ternstroemia dentisepala* B.M. Barthol., *T. huasteca* B.M. Barthol., *T. lineata* DC. ssp. *lineata*, *T. oocarpa* (Rose) Melch. y *T. sylvatica* Schltdl. & Cham.]. The other three species are considered widespread, with a distribution reaching Central America [*T.*



*lineata* DC. ssp. *chalicophila* (Loes.) B.M. Barthol., *T. seemannii* Triana & Planch. and *T. tepezapote* Schltdl. & Cham.]. The most widespread of these species is *T. tepezapote*, which is found throughout Mesoamerica, from Mexico to Panama.

*Ternstroemia tepezapote* has been considered one of the most controversial and complex species. This has been reflected in the vast number of synonyms assigned to this species (Kobuski 1942; Robyns 1967; Pool 2001; tropicos.org 2010). Kobuski (1942) listed nine synonyms (i.e., *Mokof tepezapote* (Schltdl. & Cham.) Kuntze, *Taonabo tepezapote* Szyszył., *T. oocarpa* Rose, *T. sphaerocarpa* Rose, *Ternstroemia hemsleyi* Hochr., *T. hemsleyi* var. *dentobracteata* Hochr., *T. oocarpa*, *T. seleriana* Loes. and *T. sphaerocarpa* Melch.), whereas the Missouri Botanical Garden's online database (Tropicos) has listed 13 synonyms (i.e., *Mokofua seemannii* (Triana & Planch.) Kuntze, *M. tepezapote*, *Taonabo oocarpa*, *T. seemannii*, *T. tepezapote*, *Ternstroemia hemsleyi*, *T. hemsleyi* var. *dentobracteata*, *T. impressa* Lundell, *T. oocarpa*, *T. peduncularis* DC., *T. seemanni*, *T. seleriana* and *T. sphaerocarpa*). In this study, we only considered as *T. tepezapote s.s.* to those populations described from northern Veracruz (Tepetzintla, Chontla and vicinities), and *T. tepezapote s.l.* to the rest of them (occurring in the main montane systems and lowlands of the Atlantic coast, see Figure 1).

It is possible to propose and test hypotheses to delimit problematic species and their morphological differentiation gathering environmental data throughout its entire distribution (Peterson et al. 2011; Hong-Wa and Besnard 2013). In this respect, the objective of this study was to characterize environmental and morphologically the populations of *T. tepezapote s.s.* from *T. tepezapote s.l.* to examine if there are morphological breaks among and within them based in their environmental differences.

For it, all populations were analyzed to test the environmental segregation based on their fundamental niches. We used multivariate ordination methods to identify groups of populations based on environmental data. Once defined the environmental segregation, the degree of morphological differentiation was quantified within each environmental group defined as *T. tepezapote s.l.* along its geographic distribution in Mexico. All the foliar, floral and fruit morphological evidence was integrated to characterize each group of individuals with morphological discontinuities. We estimated the phenotypic variation of morphological traits of the leaves, flowers and fruits using morphometry analyses (traditional and geometric). With this procedure we confirmed if there is congruence between environmental and morphological divergence of populations, allowing us to characterize *T. tepezapote s.s.* from the groups of *T. tepezapote s.l.* Finally, we evaluated the effect of latitudinal and altitudinal gradients over the populations, as well as the influence of precipitation and temperature in the phenotypic variation of the populations (Luna-Vega et al. 2012). To accomplish this, we performed multiple correlation tests among the morphological and morphometric variables with the environmental variables used in the analyses.

## **Materials and methods**

### **Geographical and environmental data**

We compiled an initial database of 660 herbarium specimens of *Ternstroemia tepezapote*, which included specimens once considered as *T. tepezapote* based on morphology (*e.g.*, specimens identified as *T. huasteca*, *T. oocarpa* and *T. seemannii*). The database was

compiled from field specimens, herbaria (MEXU, ENCB, XAL, IEB, FCME, MO, ZEA, SERBO, OAX, F and GH) and online databases [Global Biodiversity Information Facility (GBIF), <http://www.gbif.org/>; Tropicos®, <http://www.tropicos.org/>; Red Mundial de Información sobre Biodiversidad (REMIB), [http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/remib\\_esp.html](http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/remib_esp.html)]. After depurating the initial database and gathering geographical references for all specimens, we obtained a final database consisting of 556 records in the following physiographic provinces throughout Mexico and Central America: Sierra Madre Oriental (SMO), Sierra Norte de Oaxaca (SNO), Sierra Madre del Sur (SMS), Serranías Transísmicas (STI), Planicie Costera del Golfo (PCG), Planicie Costera del Pacífico (PCP), Petén (PET) and Cordillera de Talamanca (TAL) (Figure 1).

To analyze environmental differences among populations of *T. tepezapote*, we extracted climatic data for each presence record. We used data for 19 climatic variables with a 0.08° resolution available through the WorldClim database (Hijmans et al. 2006; <http://www.worldclim.org/>).

### **Environmental divergence**

A Principal Component Analysis (PCA) was performed with a matrix of 556 records (from Mexico and Central America) and 19 environmental variables using the MASS package in R. To minimize co-linearity, we identified and dismissed variables with high correlation coefficients, keeping eight environmental variables: mean annual temperature (BIO 01); isothermality (BIO 03); temperature seasonality (BIO 04); mean diurnal range (BIO 07);

minimum temperature of the coldest quarter (BIO 11); annual precipitation (BIO 12); precipitation seasonality (BIO15); and precipitation of the driest quarter (BIO 17). In order to identify groups of localities within environmental space, we conducted a second PCA on the eight selected variables. Subsequently, a Discriminant Analysis (DA) was used to test the statistical significance of group differences and to identify those variables associated with the environmental differentiation of populations.

For groups composed of at least ten geographic localities, we conducted independent PCAs for each group to increase the resolution of the spatial aggregation patterns. In addition, we used the eigenvectors for the first three components to perform an Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA) based on the Euclidean distances between pairs of localities. The sub-groups identified in both analyses were considered to be environmentally distinct. A DA was used to identify the variables responsible for the discrimination between groups and sub-groups. Finally, the ranges of environmental tolerances were defined for each group and sub-group.

### **Morphological discontinuities**

We used a similar procedure to the one proposed by Zapata and Jiménez (2012) to recognize the morphological discontinuities among the populations based on the environmental divergence hypotheses mentioned above. This procedure allowed the recognition of different groups supported with different morphological and environmental traits within *T. tepezapote*. For this, we selected and photographed at least three herbarium specimens for each group recognized by environmental differences (74 specimens) inside

*T. tepezapote s.l.*. Unfortunately, only Mexican specimens were analyzed, because Central American ones were not available. For each selected specimen we digitized photographs of leaves, sepals and fruits using the software TPS Dig (Rohlf 2010).

We used two different methodologies to undertake the morphological differentiation analysis, following the proposals of Viscosi *et al.* (2012), Innangi and Izzo (2015) and Mijnsbrugge (2015): 1) a geometric morphometry analysis to directly assign the landmarks of leaves, flowers (sepals) and fruits and 2) a morphological analysis (traditional morphometry), using the distance between two pair of selected landmarks, apex and base of leaves, flowers (sepals) and fruits, as well as other qualitative characters (i.e. impression of leaf veins or leaf margin).

### **Geometric morphometry**

We digitized 364 leaf photographs from 74 populations and identified 37 landmarks (Figure 2a). For the flowers (sepals), we digitized 208 photographs, identified 13 landmarks (Figure 2b). Finally, we digitized 88 fruit photographs and identified 19 landmarks (Figure 2c). With this information, we conducted PCAs on the covariance matrices of the symmetric and asymmetric harmonic coefficients using the software MorphoJ ver 1.06 (Klingenberg 2011). The morphometric variation inside each subgroup was evaluated through additional PCAs. Notwithstanding, these analyses do not have the power to differentiate the groups when the phenotypic plasticity is too high. At this point, Viscosi and Fortini (2011) proposed that Canonical Variance Analysis (CVA) should help to find morphological differences among groups of populations. We undertook a CVA to increase the power of

morphological discrimination. At the same time, we quantified the level of correct assignment of organisms within each group of populations ecologically identified through its morphology using cross-validation test.

### **Morphological analysis ( = traditional morphometry)**

We obtained three morphological matrices (leaves, sepals (flowers) and fruits) based on: a) the distance between some pairs of landmarks, b) the angle formed among them, and c) qualitative characters. With this, it was possible to generate three new matrices composed of 29 variables of leaves, 12 variables of flowers (sepals) and 15 variables of fruits.

Independent PCAs were performed with each morphological matrices using the MASS package in R to identify and remove highly correlated (with  $r^2 > 80\%$ ) morphological variables. We compiled a database of 27 morphological traits (Table 1) to perform the morphological analyses, using 15 leaf traits, seven floral traits and five fruit traits, which are listed below.

Leaf traits: 1. mean length of the leaf lamina (MLL), 2. angle of the lamina apex (ALA), 3. mean angle of the lamina base (MAL), 4. distance from the base to the maximum width of the lamina (DBM), 5. petiole length (PL), 6. total leaf length (including lamina and petiole, TLL), 7. width of the base (WB), 8. 1/4 lamina width (LW1), 9. 2/4 lamina width (LW2), 10. 3/4 lamina width (LW3), 11. maximum width of the lamina (MWL), 12. lamina length/maximum width ratio (LWR), 13. lamina/petiole length ratio (LPR). Additionally, two qualitative leaf traits were considered: 14. leaf margin -entire or crenate- (LM) and 15. adaxial vein impression -impressed or not impressed- (AVI).

Sepals traits: 1. mean length of the sepal (MLS), 2. angle of the sepal apex (ASA), 3. angle of the sepal base (ASB), 4. pedicel length (PDL), 5. basal width of the pedicel (BWP), 6. width at 1/5 of the sepal length (WS1) and 7. width at 3/5 of the sepal length (WS2).

Fruit traits: 1. mean length of the fruit (MLF), 2. angle of the fruit apex (AFA), 3. angle of the fruit base (AFB), 4. width at 4/9 of the fruit length (WF1) and 5. width at 2/9 of the fruit length (WF2).

Finally, DAs were conducted to test if the identified groups in the environmental PCA could also be recognized with morphological variables. The variation inside each group was evaluated through additional PCAs. These analyses allowed us to identify which variables are the most important for characterizing the morphological discontinuities among populations.

### **Environmental influence on morphological divergence**

Zapata and Jiménez (2012) proposed that morphological divergence between populations might be the result of geographical gradients (*e.g.*, latitude, altitude), and not necessarily associated with environmental variables. The isolation by distance should be an important factor influencing the population divergence, notwithstanding the populations could be environmentally similar. The analyses of the delimitation of taxonomic entities should be performed based on parallel patterns of morphological and environmental divergence between populations. In this respect, we investigated how the morphological and environmental variables correlated with the corresponding discriminant functions from the

DAs. In order to propose a robust taxonomic separation of groups within *T. tepezapote*, we tested whether environmental exclusion can explain the observed morphological divergence. We conducted multiple correlations between the environmental discriminant functions, the morphological discriminant functions and the morphometric canonical correspondences.

Finally, we identified morphological and environmental variables most useful for group discrimination. We carried out multiple correlations between the discriminant functions and the eight environmental variables. We included latitude, longitude and altitude as additional variables. In the same way, we investigated the correlation between the discriminant functions and the morphological variables (14 foliar traits, seven floral traits and five fruit traits).

## **Results**

### **Environmental differentiation**

*Ternstroemia tepezapote* occurs in tropical (evergreen and deciduous), cloud, oak and mixed pine-oak forests. *Ternstroemia tepezapote* has a wide altitudinal range from 0 to 2800 m in elevation (Table 2). Five environmental groups of populations were identified, three in Mexico and two in Central America (Figure 3a). The first two principal components explain 70.8% of the variance among populations (PC1 40.2%, PC2 30.6%). The first group (group 1) is the most widespread, occupying areas within the temperate forests of the Sierra Madre Oriental, the Sierra Madre del Sur and the Serranías Transístmicas. The second group (group 2) is restricted to tropical evergreen lowland



forests in northern Veracruz (PCG), corresponding to the area where *T. tepezapote* was originally described. The third group (group 3) is distributed throughout the lowland evergreen and deciduous tropical forests of the PCG, from central Veracruz to northern Guatemala, and includes most of the populations from Honduras. The fourth group (group 4) is located throughout the semi-deciduous disturbed forests and pine savannas of Nicaragua, Costa Rica and Panama (PCP). Lastly, the fifth group (group 5) is a small group distributed in the oak forests of the TAL in Costa Rica and Panama. Seven environmental variables are involved in the discrimination between these five groups of populations. The first discriminant function explained 63% of the variance (Wilk's  $\lambda = 0.022$ ,  $\chi^2 = 2055.99$ , d.f. = 28,  $p < 0.001$ ) and showed a strong positive association with the mean annual temperature and a negative association with the precipitation seasonality.

Particularly, for the two most widespread Mexican groups (1 and 3) we were able to identify several subgroups with additional PCAs. For the temperate group 1, the first three components explained 81.5% of the variance. From these we identified five sub-groups (Figure 3b): 1.1) populations from cloud forests and oak forests of the Sierra Madre Oriental (1600-2000 m); 1.2) populations from cloud forests and tropical evergreen forests of the Sierra Norte de Oaxaca and the Macizo Central de Oaxaca from the Sierra Madre del Sur (1400-2500 m); 1.3) populations from tropical evergreen forests of Oaxaca and Chiapas from Sierra Madre del Sur and Serranías Transístmicas (500-1200 m); 1.4) populations from cloud forests, oak forests and mixed pine-oak forests of the Sierra Madre del Sur, the Sierra Madre de Chiapas and highlands of Guatemala and Honduras from the Serranías Transístmicas (900-2000 m); 1.5) populations from cloud forests and mixed pine-oak forests of the Chiapas highlands and the Cordillera Volcánica highlands in Guatemala from

the Serranías Transístmicas (1500-3000 m). The DA detected six variables that correctly assigned 95.3% of the populations. The first discriminant function explained 74.3% of the variance (Wilk's  $\lambda = 0.026$ ,  $\chi^2 = 721.09$ , d.f. = 20,  $p < 0.001$ ) and was positively associated with isothermality and negatively associated with temperature seasonality.

For the tropical group 3, the first three principal components explained 79.8% of the variance. We identified four sub-groups (Figure 3c): 3.1) populations located in central Veracruz and the Sierra de los Tuxtlas (500-2200 m); 3.2) populations mainly distributed throughout the PCG and the PET (0-500 m); 3.3) populations from the region of Uxpanapa, Veracruz (PCG), at altitudes near sea level; 3.4) populations distributed in the Lacandona region in Mexico, Belice and Honduras from PCG (0-400 m). The DA detected seven variables that were useful for the correct assignment of 98.4% of the populations. The first discriminant function explained 63.5% of the variance (Wilk's  $\lambda = 0.03$ ,  $\chi^2 = 424.6$ , d.f. = 24,  $p < 0.001$ ) and was positively associated with isothermality and negatively associated with temperature seasonality.

### **Morphological differentiation**

*Geometrical morphometry.* The PCA obtained from the morphometric analyses did not clearly separate the three environmental groups identified in Mexico. Despite this, we observed that the first component did not allow separating the three Mexican environmental groups, whereas the second component only allowed separating a temperate group from the tropical ones. The third principal component was useful to distinguish the tropical population in northern Veracruz from the rest of the tropical populations along the Planicie

Costera del Golfo. Similar results were obtained with the PCAs performed with floral and fruit morphometry. Accordingly, the independent PCAs for the tropical and temperate groups did not identify the observed environmental subgroups.

The Canonical Variance Analyses (CVAs) allowed us to identify morphometric differences between groups of populations. Morphometric variation among the three environmental groups and subgroups is shown in Figure 5. For foliar morphometry, the first canonical variable distinguished between the temperate (group 1) and the tropical groups (groups 2 and 3). The second canonical variable allowed separating the individuals from the group 2 and group 3. Similar results were obtained from the analyses of floral morphometry. However, the proportion of correct assignment of populations was moderate for foliar (66.67%) and low for floral morphometry (57.72%). On the other hand, the analyses of fruit morphometry allowed for an evident discrimination among the three environmental groups (Figure 4a). This analysis resulted in a moderate proportion of correct assignment of populations (74.37%). The DAs showed the discrimination between the temperate group and populations from northern Veracruz, with a moderate to high proportion of correct assignment for leaf (69.38%) flower (65.57%) and fruit (82.5%).

Group 1 was divided into four sub-groups based on foliar and floral morphometry. The analysis of fruit morphometry detected the five environmental sub-groups previously identified (Figure 4b). However, the morphometric analyses showed a moderate proportion of correct assignment (leaf: 63.1%; flower: 66.1%; fruit: 60.4%). The cross-validation is low in the discrimination of sub-groups 1.1 and 1.5 (<60%), whereas the rest of the populations had a moderate discrimination (70%). In the case of the tropical group, the CVAs based on foliar and fruit morphometry distinguished between two sub-groups:

montane populations at mid-elevations (500-1200 m) and coastal populations at low elevations. The variance in floral morphometry was not useful for the discrimination between groups (Figure 4c). The proportion of correct assignment of populations was moderate for foliar (66.67%) and low for fruit morphometry (57.72%), and low for floral morphometry (51.7%). The tropical sub-group 3 presented moderate proportion of correct assignment for foliar (76.6%) and fruit morphometry (66.1%).

**Morphological analysis.** The three main environmental groups of *T. tepezapote s.l.* in Mexico were also identified based on leaf morphology (Figure 4a). Seven foliar traits are involved in the differentiation between groups: leaf margin (LM); angle of the lamina apex (ALA); 3/4 lamina width (LW3); mean angle of the lamina base (MAL); distance from the base to the maximum width of the lamina (DBM); adaxial vein impression (AVI); lamina/petiole length ratio (LPR). The DA resulted in a moderate correct assignment of 70.4% of populations, with leaf margin (LM) being the most useful trait for group discrimination.

The temperate populations (group 1) were divided using leaf morphology into five sub-groups, which correspond with the environmental sub-groups. Four foliar traits are involved in the discrimination between sub-groups: angle of the lamina apex (ALA); petiole length (PL); adaxial vein impression (AVI); and lamina/petiole length ratio (LPR). However, the DA resulted in a low correct assignment of 54.5% due to overlap between sub-groups 1.3, 1.4 and 1.5. On the other hand, the tropical populations (group 3) were divided into three sub-groups. Six foliar traits are involved in the differentiation between sub-groups: type of leaf margin (LM); adaxial vein impression (AVI); mean angle of the lamina base (MAL); width of the base (WB); distance from the base to the maximum width

of the lamina (DBM); maximum width of the lamina (MWL). The DA resulted in a moderate proportion of correct assignments (71.8%). However, the environmental sub-groups 3.2 and 3.4 could not be differentiated using leaf morphology.

The analyses of floral (sepals) morphology allowed the discrimination of two of the three environmental groups occurring in Mexico: the temperate group (group 1) and the tropical group that includes the group of northern Veracruz (groups 2 and 3). The DA resulted in moderate proportion of correct assignment (76.5%), with the width at 3/5 of the sepal length (WS2) and the basal width of the pedicel (BWP) being the most useful traits for group discrimination (Figure 4a). Regarding the temperate group, the analysis allowed the separation of the five environmental sub-groups based on two traits (Figure 4b): mean length of the sepal (MLS) and pedicel length (PDL). The DA between these two sub-groups showed moderate levels of correct assignment (60.8%), which results from the overlap of sub-groups 1.1, 1.3 and 1.5. For the tropical group, the four environmental sub-groups were discriminated based on three floral traits (Figure 4c): mean length of the sepal (MLS); pedicel length (PDL) and width at 3/5 of the sepal length (LW1). These sub-groups also show moderate levels of correct assignment (67.2%) because of the overlap of sub-groups 3.2, 3.3 and 3.4.

Fruit morphology allowed the discrimination of the three environmental groups (Figure 4a) based on two traits: angle of the fruit apex (AFA) and width at 4/9 of the fruit length (WF1). The DA showed a moderate proportion of correct assignment (69.3%) due to problems in the discrimination between the tropical group 3 and group 2. Five sub-groups were distinguished within the temperate group (Figure 4b) based on the same two fruit traits. However, these five sub-groups showed a moderate proportion of correct assignment

(60.6%) because of the overlap between sub-groups 1.1 and 1.4, and between sub-groups 1.2 and 1.3. For the tropical group, only two environmental groups could be discriminated (Figure 4c) based on the mean length of the fruit (MLF). Furthermore, the DA showed a lowest proportion of correct assignment (45.8%).

### **Environmental, morphological and morphometric differentiation**

The correlation analyses showed a close relationship between climatic variables and the discrimination power of the environmental analyses. The most important environmental variables for group discrimination were isothermality, temperature seasonality, minimum temperature of the coldest quarter and precipitation seasonality (Table 3). The analyses showed a clear environmental separation between the temperate and tropical groups (Figure 6). Populations from northern Veracruz are located in areas with a mean annual temperature and precipitation seasonality similar to other tropical populations. However, these northern populations showed reduced isothermality and increased temperature seasonality (Figure 6). For each of the two main environmental groups of populations, the temperature variables were the most relevant for sub-group discrimination. For the tropical group, precipitation seasonality was also important for the segregation of sub-groups of populations.

The correlation analyses allowed for the identification of the most important morphological variables for group discrimination. The morphological distinction between groups was achieved using different foliar variables. The three main groups differ in their foliar morphology, particularly in the leaf margin and the adaxial vein impression.

However, the angle of the apex and base of the lamina were important for the separation of the tropical and temperate groups (Table 4). The morphological distinction between temperate sub-groups was based on the angle of the apex, the lamina length/maximum width ratio and the length of the petiole. For the tropical sub-groups, the most important variables were leaf margin, 2/4 lamina width and the angle of the base of the lamina.

The floral traits, particularly the width at 3/5 of the sepal length, were also useful for the differentiation between the temperate and tropical groups. However, the populations from northern Veracruz could not be distinguished based on floral morphology. The differentiation of temperate sub-groups was achieved mainly by the length of the sepals and the length of pedicel (Figure 4, Table 4). For the tropical sub-groups, the most important variables were the width of the sepals and the length of the pedicel, which explains the weak differentiation among sub-groups. Regarding fruit morphology, the temperate and tropical groups could be differentiated by the length and width of the fruits. For the temperate sub-groups, the angle of the apex and the length of the fruits explained the morphological differentiation (Figure 6, Table 4). For the tropical group, the length of the fruit was the only variable associated to the differentiation between sub-groups.

The correlation analyses showed that (Table 5): 1) the discriminative power of the environmental analyses was highly correlated to the discrimination of the three main Mexican groups based on foliar morphology; 2) in all cases, the correlation between the morphological and morphometric analyses was high ; 3) the correlation between the environmental and floral discrimination was high, except for the tropical subgroups; 4) there was a high correlation between the morphological and morphometric discrimination based on floral traits; 5) the discriminative power of the environmental analyses was highly

correlated to the discrimination of the three main Mexican groups based on fruit morphology; 6) there was a high correlation between the discrimination of groups based on fruit morphology and morphometry.

## **Discussion**

Previous taxonomic studies of *Ternstroemia* in Mexico have suggested that *T. tepezapote* has a wide geographical distribution, inhabiting different types of tropical and temperate forests from sea level up to 3000 m (e.g., Standley, 1920-1926; Rose and Collins, 1903-1905; Kobuski 1942, 1943; Luna-Vega et al. 2004). The ambiguous taxonomic delimitation of this species has been mainly attributed to a great phenotypic variation and a high environmental tolerance. In this study, we found that within the distributional range of *T. tepezapote* in Mexico, there are three main groups mainly defined by differences in mean annual temperature and rain seasonality, as well as other factors such as temperature seasonality and isothermality.

### **Environmental and morphological differentiation**

Based on morphological and environmental evidences, in this study we propose the existence of eight different morphological entities (morphotypes) that was earlier identified as *T. tepezapote*. A morphotype is defined in this study as the group of organisms sharing environmental and morphological traits. As we said above, only the tropical populations located in northern Veracruz (on the vicinities of Chiconquiaco) corresponds to the original



description of the species (*T. tepezapote* s.s.). Other five morphotypes correspond to temperate populations and two to tropical morphological entities. There is a sharp morphological differentiation between the temperate and tropical morphotypes.

There is a clear break between the temperate morphotypes. The characterization of each entity includes characters of the shape of the leaf, fruit, and in some cases of the flower (sepals). Added to this, the effect of isolation by distance plays a central role, since three of these entities are clearly allopatric to the rest. In the case of the mountain systems in northern Chiapas, there are two entities morphologically different and geographically close, occurring at different vegetation types and elevations. In the case of the temperate morphotypes, isolation by distance is not the unique factor explaining their morphological divergence.

In the case of the tropical environmental groups, there is an overlap in the morphospace in three of the four originally groups proposed, so we could only recognize two morphotypes. The effect of isolation is not completely obvious, since some populations located at different sites are morphologically similar. It is necessary to state that the three original entities live in areas geographically close without significant geographical barriers. The correlation analyzes performed show that there is a significant correlation of the PCA eigenvectors with the precipitation gradients, so we can assume that adaptative processes are still emerging in these entities, and that the recorded variation can be explained consistently with environmental precipitation gradients, and even with temperature. However, we must consider that qualitative characteristics, such as impressed veins in the upper part of the leaf (allowing having a larger exposition surface to absorb nutrients from

the environment) could help discriminate the populations near Uxpanapa (Veracruz) from the rest.

Based on biogeographical evidences, we can suggest some differentiation hypotheses of the populations associated with *T. tepezapote* in Central America, that should be subject to morphological and morphometrical analyses. The Cuchumatanes populations may consist of a common entity with those present in the Altos de Chiapas, while the populations of the Pacific slopes of the volcanic mountains of Guatemala should form a continuum with those of the Sierra Madre de Chiapas. Moreover, those populations inhabiting the mountains of Honduras could form an independent entity, as well as the populations located in the Cordillera de Talamanca in Costa Rica. The tropical populations of the coastal plain of the Atlantic and Pacific extending from Nicaragua to Panama would form a separate group.

### ***Ternstroemia tepezapote s.s.***

*Ternstroemia tepezapote* was originally described from specimens collected in northern Veracruz at altitudes of 50-100 m. The group of populations of northern Veracruz can be considered the morphological and ecological representatives of the nomenclatural type of the species. In northern Veracruz, there is a low isothermality and a high temperature seasonality than in the rest of the tropical lowlands (Figure 6). This lowland tropical group is here considered as *T. tepezapote s.s.* (Figure 7a).

The morphological differences between *T. tepezapote s.s.* and the rest of the tropical populations are: the type of leaf margin (crenate) and the adaxial vein impression, possibly

to enlarge the exposition surface of the leaves to guarantee their water and light absorption. Foliar morphometry clearly separates *T. tepezapote s.s.* from the temperate group, but not from the tropical group. However, the leaves of *T. tepezapote s.s.* are elliptic and slenderer than the leaves observed in rest of the tropical populations. Furthermore, the angles of the apex and base of the lamina are more acute in *T. tepezapote s.s.* (60-80°) than in the rest of the tropical group (40-55°). The discrimination between *T. tepezapote s.s.* and the tropical group was difficult to assess for the tropical populations of lowland areas in the north of Chiconquiaco, Veracruz. In this area, individuals have a crenate leaf margin and a conspicuous vein impression, which means that these individuals might belong to populations of *T. tepezapote s.s.* The floral morphology analyses showed clear differences between *T. tepezapote s.s.* and the temperate groups, but not so clear with the tropical ones, but *T. tepezapote s.s.* have slightly longer sepals with a more acute apex. The analyses of fruit morphology showed a similar pattern of differentiation between *T. tepezapote s.s.* and the temperate group. However, there is clear morphometric differentiation between *T. tepezapote s.s.* and the tropical group, mainly resulting from differences in the fruit apex and other characters discussed above. As with foliar morphology, the discrimination between *T. tepezapote s.s.* and the tropical group was also difficult to assess for the tropical populations in the north of Chiconquiaco, Veracruz.

### **Temperate group morphotypes**

Four out of five environmental groups could be identified using morphological and morphometric analyses of leaf, flower (sepals) and fruit (Figure 7b). Individuals from subgroup 1.1 are located in the Sierra Madre Oriental (1600-2000 m) and are characterized by

elliptic and slender leaves with an acute apex (50-70°), vaguely noticeable vein impressions and long petioles (> 7 mm). The flowers have ovoid sepals with a length of 8-10 mm, acute apices and long pedicels (> 40 mm). The fruits have an elongated (6-10 mm width) and very acute apex. This sub-group corresponds to populations sometimes described as *T. huasteca* B.M. Barthol. (Bartholomew 1988). The morphotype refers to misidentified herbarium specimens that were corrected in Herbaria as *T. huasteca*.

Populations from sub-group 1.2 are distributed along the Sierra Norte de Oaxaca (1400-2500 m) and are characterized by individuals with slightly obovate leaves with acute apices (55-120°) and short petioles (4-6 mm) (Figure 7b). These individuals have flowers with semi-circular small sepals (5-8 mm), obtuse apices and pedicels with a length of 20-35 mm. The fruits are round and have a short apex (12-15 mm in width). The morphology of individuals from this sub-group resembles that of individuals described as *T. hemsleyi* Hochr. (Hochreutiner 1917), suggesting the existence of a different species, that should be validated with complementary studies, such as genetic and molecular ones.

Populations from sub-group 1.3 are located throughout the ecotone between humid montane forests and evergreen tropical forests of Oaxaca and Chiapas, at an altitude of 500-1200 m (Figure 7b). This sub-group is characterized by widely obovate leaves with obtuse apices (110-150°), cuneate bases, imperceptible vein impressions and long petioles (6-10 mm). The flowers have ovoid sepals with acute apices (10-12 mm) and short pedicels (15-18 mm). The fruits are ovoid, with short apices and a width of 15-22 mm. The morphology of individuals from this sub-group resembles the morphology of specimens described as *T. oocarpa* (Rose) Melch. (Melchior 1935). The morphology of *T. oocarpa* also resembles, albeit partially, that of populations of sub-group 1.4. This sub-group is distributed in cloud

forests and oak forests of the Sierra Madre de Chiapas (900-2000 m). The members of this sub-group are characterized by having slightly obovate leaves (Figure 7b) with acute to obtuse apices (80-135°), imperceptible vein impressions and long petioles (6-11 mm). The flowers have widely elliptical sepals, elongated (7-11 mm), obtuse apices and short pedicels (10-18 mm). The fruits are piriform with elongated and acute apices and a width of 15-23 mm.

Finally, sub-group 1.5 is localized throughout mixed pine-oak forests and cloud forests of the Chiapas highlands, at an altitude of 1500-3000 m. These individuals have obovate leaves, slightly spatulate, with acute to obtuse apices (110-130°) and long petioles (5-10 mm). The flowers have circular and big sepals (12-25 mm), obtuse apices and pedicels with a length 11-23 mm. The fruits are rounded with a slightly elongated apex and a width of 20-30 mm. The members belonging to this sub-group can also be partially identified as *T. oocarpa*.

### **Tropical group morphotypes**

The tropical sub-groups have a low morphological differentiation. Populations of sub-group 3.1 are distributed in Chiconquiaco, Veracruz, at an elevation of 0-1200 m. The morphological and morphometric analyses show that this sub-group is different from the rest of the tropical populations. However, if we consider qualitative foliar traits, individuals below 500 m, which have a crenate margin, belong to *T. tepezapote* s.s., whereas individuals located at an altitude of 800-1200 m belong to the temperate group. In this

respect, individuals from this sub-group were the most difficult to be differentiated using the discriminant analyses.

No evident morphological or morphometric differences could be detected between environmental sub-groups 3.2 and 3.3, which are localized throughout the Planicie Costera del Golfo and the Lacandona region respectively, at altitudes of 50 to 700 m. These two environmental sub-groups form a unique morphological group characterized by elliptic leaves with acute apices (50-70°), no apparent vein impressions and entire margins. The flowers have widely elliptical sepals, with a length of 5.8-9.5 mm, acute apices and pedicels with a length of 10-30 mm. The fruits are piriform and have elongated and acute apices. The morphology of individuals from these two sub-groups corresponds to that of specimens described as *T. seemannii* Triana & Planch. (Triana and Planchon 1862).

Finally, subgroup 3.4 is localized in the region of Uxpanapa, Veracruz, at an altitude near sea level. This subgroup is composed by individuals with weak foliar differentiation and minimal differences in floral and fruit morphology. The leaves are obovate with an acute apex (50-70°), conspicuous vein impressions and entire margins. Individuals from this sub-group partially resemble specimens described as *T. seemannii*, located in different localities from subgroups 3.2 and 3.3.

## **Conclusions**

Our morphometrical and environmental results allow to suggest that only the populations from northern Veracruz (Tepetzintla, Chontla and vicinities), inhabiting at lower altitudes, should be considered as *Ternstroemia tepezapote* s.s. The other populations from temperate

and tropical localities inhabiting different places in central and southern Mexico do not match with the type species. These populations need to be renamed, so it is necessary to reconsider some of the earlier proposed synonymies as valid taxonomic entities. This is the case of *T. hemsleyi*, *T. oocarpa*, *T. seemanii* and *T. sphaerocarpa*, taxonomic entities that were grouped in *T. tepezapote s.l.*. On the other hand, *T. huasteca* has been sometimes misidentified as *T. tepezapote*, but never considered as a synonymy of this latter species. We consider that temperate populations are more morphologically dissimilar between each other, meanwhile the tropical populations have a higher phenotypic plasticity and a lower morphological differentiation. We consider that the tropical populations are more taxonomically problematic because their differentiation is less evident, so it is mandatory to undertake genetic and phylogeographic researches.

## **Acknowledgements**

We thank the curators of the herbaria for their help during the revision of specimens. This project was supported by DGAPA-PAPIIT RN215914, IA204615 and IV201015. Helga Ochoterena and Rafael Lira Saade made constructive suggestions to different versions of this manuscript. OOA thanks the Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM and Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) for the doctorate scholarship (245683).

## References

- Ackerman, M., and Doebeli, M. 2004. Evolution of niche width and adaptive diversification. *Evolution*, **58**(12): 2599-2612. doi:10.1111/j.0014-3820.2004.tb01614.x.
- Bartholomew, B.M. 1988. New species and a new combination of Mexican Theaceae. *Phytologia*, **64**(6): 457-458.
- Contreras-Medina, R., Luna-Vega, I., and Ríos-Muñoz, C.A. 2010. Distribución de *Taxus globosa* (Taxaceae) en México: modelos ecológicos de nicho, efectos del cambio del uso de suelo y conservación. *Revista Chilena Hist. Nat.* **83**(3): 421-433. doi:10.4067/S0716-078X2010000300009.
- Dai, C, Dong, F., Yang, X. 2020. Morphotypes or distinct species? A multilocus assessment of two East Asian scimitar babblers (Aves, Timaliidae). *Zool Scr.* 49: 265– 279.
- de la Estrella, M., Aedo, C., and Velayos, M. 2009. A morphometric analysis of *Daniellia* (Fabaceae - Caesalpinioideae). *Bot. J. Linn. Soc.* **159**(2): 268-279. doi: 10.1111/j.1095-8339.2008.00894.x.
- de Queiroz, K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Syst. Biol.* **56**(6): 879-886. doi: 10.1080/10635150701701083.
- Diniz-Filho, J.A.F., Nabout, J.C., Bini, M., Dias-Loyola, R., Rangel, T.F., Nogues-Bravo, D., Araújo, M.B. 2010. Ensemble forecasting shifts in climatically suitable areas for



- Tropidacris cristata* (Orthoptera: Acridoidea: Romaleidae). *Insect Conservation and Diversity*, **3**(3): 213-221. doi: 10.1111/j.1752-4598.2010.00090.x
- González-Villareal, L.M. 2001. La familia Theaceae en el estado de Jalisco, México. *Flora de Jalisco* No. 12. Instituto de Botánica, Universidad de Guadalajara, Guadalajara, México.
- Gravilets, S., Losos, J.B. 2009. Adaptive radiation: contrasting theory with data. *Science*, **323**(5915): 732-737. doi: 10.1126/science.1157966.
- Hijmans, R.J., and Graham, C.H. 2006. The ability of climate envelope models to predict the effect of climate change on species distributions. *Global Change Biology*, **12**(12): 2272-2281. doi: 10.1111/j.1365-2486.2006.01256.x.
- Hochreutiner, B.P.G., 1917. Theaceae Novae. *Annuaire du Conservatoire et Jardin Botaniques de Genève*, **20**: 190-194.
- Hong-Wa, C., and Besnard, G. 2013. Species limits and diversification in the Madagascar olive (Noronhia, Oleaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* **174**(1): 141-161. doi: 10.1111/boj.12112.
- Innangi, M., and Izzo, A. 2015. *Pingiicola lavalvae* (Lentibulariaceae), a new endemic butterwort from southern Italy diagnosed with the aid of geometric morphometrics. *Plant Biosystems*, **149**(6): 990-999. doi:10.1080/11263504.2014.920426.
- Kaplan, Z., and Marhold, K. 2012. Multivariate morphometric analysis of the *Potamogeton compressus* group (Potamogetonaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* **170**(1): 112-130. doi: 10.1111/j.1095-8339.2012.01270.x.

- Klingenberg, C.P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol. Ecol. Resour.* **11**(2): 353-357. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x.
- Kobuski, C.E. 1942. Studies in the Theaceae. XIII. Notes on the Mexican and Central American species of *Ternstroemia*. *J. Arnold Arbor.* **23**: 464-478. doi: <http://dx.doi.org/10.5962/bhl.part.18685>
- Kobuski, C.E. 1943. Studies in the Theaceae. XIV. Notes on the West Indian species of *Ternstroemia*. *J. Arnold Arbor.* **24**: 60-76. doi: <http://dx.doi.org/10.5962/bhl.part.12281>
- Kobuski, C.E. 1961. Studies in the Theaceae. XXXII. A review of the genus *Ternstroemia* in the Philippine Islands. *J. Arnold Arbor.* **42**: 263-275.
- Kobuski, C.E. 1963. Studies in the Theaceae. XXXIV. Some Asiatic taxa of *Ternstroemia*. *J. Arnold Arbor.* **44**: 421-434.
- Luna-Vega, I., and Ochoterena, H. 2004. Phylogenetic relationships of the genera of Theaceae based on morphology. *Cladistics*, **20**(3): 223-270. doi: 10.1111/j.1096-0031.2004.00024.x
- Luna-Vega, I., Alcántara-Ayala, O., and Contreras-Medina, R. 2004. Patterns of diversity, endemism and conservation: an example with Mexican species of Ternstroemiaceae Mirb. ex DC. (Tricolpates: Ericales). *Biodivers. Conserv.* **13**(14): 2723-2739. doi:10.1007/s10531-004-2145-2.
- Luna-Vega, I., Alcántara-Ayala, O., Contreras-Medina, R., Ríos-Muñoz, C.A., 2012. Ecological niche modeling on the effect of climatic change and conservation of

- Ternstroemia lineata* DC. (Ternstroemiaceae) in Mesoamerica. *Botany*, **90**(7): 637-650. doi: 10.1139/B2012-019
- Luna-Vega, I., Tejero-Diez, J.D., Contreras-Medina, R., Heads, M., and Rivas, G. 2012. Biogeographical analysis of two *Polypodium* species complexes (Polypodiaceae) in Mexico and Central America. *Biol. J. Linn. Soc.* **106**(4): 940–955. doi: 10.1111/j.1095-8312.2012.01921.x.
- Mayr, E. 1942. Systematics and the origin of the species. Columbia University Press. New York.
- Melchior, H. 1935. *Ternstroemia sphaerocarpa*. Die natürlichen Pflanzenfamilien, Zweite Auflage 21. In Engler, A. & K. Prantl. Berlin. p. 142.
- Mijnsbrugge, K.V. 2015. Morphological dissection of leaf, bud and infructescence traits of the interfertile native *A. glutinosa* and non-native *A. incana* in Flanders (northern part of Belgium). *Trees* **29**(6): 1661-1672. doi: 10.1007/s00468-015-1247-7
- Möller, M., Gao, L.M., Mill, R.R., Li, D.Z., Hollingsworth, M., and Gibby, M. 2007. Morphometric analysis of the *Taxus wallichiana* complex (Taxaceae) based on herbarium material. *Bot. J. Linn. Soc.* **155**(5): 307-335. doi: 10.1111/j.1095-8339.2007.00697.x.
- Morris, D.W. 1987. Ecological scale and habitat use. *Ecology*, **68**(2):362–369. doi:10.2307/1939267.
- Nosil, P., and Sandoval, C.P. 2008. Ecological niche dimensionality and the evolutionary diversification of stick insects. *PLOSOne*, **3**(4): 1-11. doi:10.1371/journal.pone.0001907

- Peruzzi, L., and Passalacqua, N.G. 2008. Taxonomy of the *Onosma echioides* (L.) L. complex (Boraginaceae) based on morphometric analysis. *Bot. J. Linn. Soc.* **157**: 763-774. doi: 10.1111/j.1095-8339.2008.00827.x.
- Peterson, A.T., Soberón, J., Pearson, R.G., Anderson, R.P., Martínez-Meyer, E., Nakamura, M., and Araújo, M.B. 2011. Ecological niches and geographic distribution. Princeton University Press. Princeton and Oxford. USA.
- Pfennig, D.W., Wund, M.A., Snell-Rood, E.C., Cruickshank, T., Schlichting, and C.D., Moczek, A.P. 2010. Phenotypic plasticity's impacts on diversification and speciation. *Trends Ecol. Evol.* **25(8)**: 459-467. doi: 10.1016/j.tree.2010.05.006.
- Pool, A. 2001. Theaceae. In: Stevens WD, Ulloa C, Pool A., Montiel OM. (eds.). *Flora de Nicaragua. Angiospermas.* Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, Missouri. pp. 2443-2448.
- Robyns, A. 1967. Theaceae. In: *Flora of Panama, Part VI.* *Ann. Mo. Bot. Gard.* **54(1)**: 41-56. doi: 10.2307/239489.
- Rohlf, F.J. 2010. tpsDig version 2.16. Department of Ecology and Evolution. State University of New York. Stony Brook. NY.
- Rose, C., and Collins, M. 1903-1905. *Mexican-Central American & Porto Rican Plants.* Smithsonian Institution, United States of National Museum, Washington, USA.
- Schluter, D. 2000. *The ecology of adaptive radiation.* Oxford University Press, Oxford, UK.

- Silva, M.F.S., Moreira de Andrade, I., and Mayo, S.J. 2012. Geometric morphometrics of leaf blade shape in *Montrichardia linifera* (Araceae) populations from the Rio Parnaíba Delta north-east Brazil. *Bot. J. Linn. Soc.* **170(4)**: 554-572. doi: 10.1111/j.1095-8339.2012.01309.x.
- Standley, P. 1920-1926. *Trees and shrubs of Mexico*. Washington, D.C. Smithsonian Institution and U.S. Government Printing Office.
- Stevens, P.F. 2001. [and onwards.] Angiosperm Phylogeny Website, Version 4, [and more or less continuously updated since]. Available from <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/> [accessed 25 November 2015].
- Stevens, R.D., and Tello, J.S. 2009. Micro and macrohabitat associations in Mojave Desert rodent communities. *J. Mammal.* **90(2)**: 388-403. doi: <http://dx.doi.org/10.1644/08-MAMM-A-141.1>.
- Triana, J.J., and Planchon, E.E. 1862. *Ternstroemia seemanii*. *Ann. Sci. Nat., Bot. série 4* **18**: 260.
- Tropicos.org, 2010. Missouri Botanical Garden. 09 Dec 2010. Available from <http://www.tropicos.org> [accessed 25 November 2015].
- Urban, I. 1896. *Ternstroemiaceae (sensu ampliore)*. In: Engler A. *Systematik Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*. Engler's Botanische Jahrbücher 21. Leipzig. pp. 514-555.
- Viscosi, V., and Fortini, P. 2011. Leaf shape variation and differentiation in three sympatric white oak species revealed by elliptic Fourier analysis. *Nord. J. Bot.* **29(5)**: 632-640. doi: 10.1111/j.1756-1051.2011.01098.x.

- Viscosi, V., Antonecchia, G., Lepais, O., Fortini, P., Gerber, S., and Loy, A. 2012. Leaf shape and size differentiation in white oaks: assessments of allometric relationships among three sympatric species and their hybrids. *International Journal of Plants Sciences*, **173**(2): 875-884. doi: <http://dx.doi.org/10.1086/667234>.
- Wawra, H. 1886. Ternstroemiaceae. In: Martius CFP. *Flora Brasiliensis*, vol. XII, fascicle 97. Fleischer, Monachii & Lipsiae. pp. 267-282.
- Zapata, F., and Jiménez, I. 2012. Species delimitation: inferring gaps in morphology across geography. *Syst. Biol.* **61**(2): 179-194. doi: [10.1093/sysbio/syr084](https://doi.org/10.1093/sysbio/syr084).

## Figure legends

Figure 1. Geographical distribution of *Ternstroemia tepezapote* in Mexico and Central America. Red dots represent the localities gathered from data sources. The main biogeographic provinces are shown in bold: Sierra Madre Oriental (SMO), Sierra Norte de Oaxaca (SNO), Sierra Madre del Sur (SMS), Serranías Transístmicas (STI), Planicie Costera del Golfo (PCG), Planicie Costera del Pacífico (PCP), Petén (PET) and Cordillera de Talamanca (TAL) (Figure 1). The grey areas correspond to region highlighted in the text: northern Veracruz (NVE), Chiconquiaco (CHI), Los Tuxtlas (TUX), Chiapas highlands (HLC), Macizo Central de Oaxaca (MCO), Uxpanapa (UXP) and Sierra Madre de Chiapas (SMC).

Figure 2. Morphological traits measured and morphometric landmarks identified for a) leaves, b) sepals and c) fruits from the selected specimens of *Ternstroemia tepezapote* from populations in Mexico. Foliar traits: mean length of the leaf lamina (MLL); angle of the lamina apex (ALA); mean angle of the lamina base (MAL); distance from the base to the maximum width of the lamina (DBM); petiole length (PL); total leaf length (including lamina and petiole, TLL); width of the base (WB); 1/4 lamina width (LW1); 2/4 lamina width (LW2); 3/4 lamina width (LW3); maximum width of the lamina (MWL); lamina length/maximum width ratio (LWR); lamina/petiole length ratio (LPR). Floral traits: mean length of the sepal (MLS); angle of the sepal apex (ASA); angle of the sepal base (ASB); pedicel length (PDL); basal width of the pedicel (BWP); width at 1/5 of the sepal length (WS1); width at 3/5 of the sepal length (WS2). Fruit traits: mean length of the fruit (MLF);

angle of the fruit apex (AFA); angle of the fruit base (AFB); width at 4/9 of the fruit length (WF1); width at 2/9 of the fruit length (WF2).

Figure 3. Geographical distribution of the groups and sub-groups identified through the environmental analyses of populations of *Ternstroemia tepezapote* in Mexico and Central America. a) Main groups; b) temperate sub-groups; c) tropical sub-groups.

Figure 4. Ordination plots showing the morphological differentiation of groups and sub-groups of populations of *Ternstroemia tepezapote* in Mexico and Central America. a) Main groups; b) temperate sub-groups; c) tropical sub-groups. DF: discriminant functions for the analyses of morphological traits. CV: canonical correspondences for the morphometric analyses.

Figure 5. Variation in foliar, floral and fruit morphometry between groups and sub-groups of populations of *Ternstroemia tepezapote* in Mexico and Central America. a) Foliar morphometry; b) floral morphometry; c) fruit morphometry. The mean leaf, sepal and fruit shape are given for each group and sub-group identified. Group 1: temperate populations. Group 2: populations of northern Veracruz. Group 3: tropical populations.

Figure 6. Environmental and morphological variance within groups and sub-groups of populations of *Ternstroemia tepezapote* in Mexico and Central America. a) Main groups; b) temperate sub-groups; c) tropical sub-groups.

Figure 7. Geographical distribution of the groups and sub-groups of populations of *Ternstroemia tepezapote* in Mexico and the corresponding foliar, floral and fruit morphometry. a) Main groups; b) temperate sub-groups; c) tropical sub-groups.



**Table 1.** List of leaf, flower and fruit traits used in the analyses of morphological differentiation between populations of *Ternstroemia tepezapote* in Mexico and Central America.

Morphological trait	
<i>Leaf</i>	
MLL	mean length of the leaf lamina
ALA	angle of the lamina apex
MAL	mean angle of the lamina base
DBM	distance from the base to the maximum width of the lamina
PL	petiole length
TLL	total leaf length
WB	width of the base
LW1	1/4 lamina width
LW2	2/4 lamina width
LW3	3/4 lamina width
MWL	maximum width of the lamina
LWR	lamina length/maximum width ratio

LPR	lamina/petiole length ratio
LM	leaf margin (entire, crenate)
AVI	adaxial vein impression (impressed, not impressed)

*Flower (sepals)*

MLS	mean length of the sepal
ASA	angle of the sepal apex
ASB	angle of the sepal base
PDL	pedicel length
BWP	basal width of the pedicel
WS1	width at 1/5 of the sepal length
WS2	width at 3/5 of the sepal length

*Fruit*

MLF	mean length of the fruit
AFA	angle of the fruit apex
AFB	angle of the fruit base

WF1 width at 4/9 of the fruit length

WF2 width at 2/9 of the fruit length

---

**Table 2.** Altitudinal range of different species associated with *Ternstroemia tepezapote* in Mexico and Central America. Altitude is given in meters above sea level.

---

	Altitude (m)
<i>Ternstroemia hemsleyi</i>	1800-2000
<i>Ternstroemia huasteca</i>	1000-2200
<i>Ternstroemia impressa</i>	2600-2800
<i>Ternstroemia oocarpa</i>	1000-1200
<i>Ternstroemia seemanni</i>	0-800
<i>Ternstroemia seleriana</i>	2400-2800
<i>Ternstroemia sphaerocarpa</i>	1800-2400
<i>Ternstroemia tepezapote</i>	0-2800

---

**Table 3.** Correlation between the first two functions of the Discriminant Analysis (DA) and the eight environmental variables used in the study of differentiation between populations of *Ternstroemia tepezapote* in Mexico and Central America. Bold numbers indicate the highest correlation coefficients. DF: discriminant function. Environmental variables: mean annual temperature (BIO 01); isothermality (BIO 03); temperature seasonality (BIO 04); mean diurnal range (BIO 07); minimum temperature of the coldest quarter (BIO 11); annual precipitation (BIO 12); precipitation seasonality (BIO15); precipitation of the driest quarter (BIO 17).

<i>Environmental variables</i>	Temperate sub-					
	Groups of populations		groups		Tropical subgroups	
	DF 1	DF 2	DF 1	DF 2	DF 1	DF 2
BIO 01	<b>-.755**</b>		.391**	<b>.756**</b>	.635**	<b>.386**</b>
BIO 03	.493**	<b>-.832**</b>	<b>.788**</b>	-.388**	<b>.771**</b>	
BIO 04	-.313**	<b>.926**</b>	<b>-.838**</b>	.504**	<b>-.858**</b>	
BIO 07	.466**	.722**	-.228**	.317**	-.661**	<b>.339**</b>
BIO 11	<b>-.699**</b>	-.207**	.493**	<b>.697**</b>	<b>.812**</b>	.309**

BIO 12	<b>-.495**</b>	<b>-.491**</b>		<b>-.370**</b>	<b>.264**</b>	<b>-.674**</b>
BIO 15	<b>.820**</b>	<b>.220**</b>	<b>.409**</b>	<b>.660**</b>		<b>.309**</b>
BIO 17	<b>-.686**</b>		<b>-.600**</b>	<b>-.546**</b>		<b>-.841**</b>
Altitude	<b>.849**</b>		<b>-.209**</b>	<b>-.740**</b>	<b>-.541**</b>	<b>-.298**</b>
Longitude	<b>-.350**</b>	<b>-.854**</b>	<b>.439**</b>		<b>.740**</b>	
Latitud		<b>.931**</b>	<b>-.730**</b>		<b>-.785**</b>	<b>.210**</b>

---

**Table 4.** Correlation between the first two functions of the Discriminant Analysis and the morphological traits used in the study of differentiation between populations of *Ternstroemia tepezapote* in Mexico and Central America. Bold numbers indicate the highest correlation coefficients. DF: discriminant function. See Table 1 for details on the morphological traits.

Morphological traits	Groups of populations		Temperate sub-groups		Tropical sub-groups	
	DF 1	DF 2	DF 1	DF 2	DF 1	DF 2
<i>Leaf</i>						
ALA	<b>-.503**</b>	<b>.633**</b>	<b>.693**</b>	<b>-.410**</b>		
MAL	<b>-.427**</b>	.386**		-.246**	-.212**	<b>.649**</b>
MLL	.221**	<b>-.589**</b>	.429**	.558**		.219**
WB	-.280**		.509**			<b>.600**</b>
LW1	-.144**	-.345**	.614**		<b>-.418**</b>	.243**
LW2		-.391**	.688**		<b>-.416**</b>	
An09	-.152**	-.257**	<b>.739**</b>		-.343**	
PL		<b>-.641**</b>	.388**	<b>.823**</b>		.222**

DBM	.180**	-.494**	.485**	.461**		.241**
MWL		-.369**	<b>.697**</b>		-.395**	
LPR	.167**	.197**		-.285**		
LWR		-.184**	<b>-.405**</b>		-.235**	
LM	<b>.806**</b>	<b>.515**</b>			<b>.670**</b>	<b>-.243**</b>
AVI	<b>.433**</b>	-.281**	<b>-.492**</b>		<b>.576**</b>	
<i>Flower</i>						
ASA		.245**				
ASB	.594**	.422**	.563**	.461**	.585**	
MLS	.663**	.428**	<b>.846**</b>	.534**	<b>.896**</b>	
WS1	.568**	.498**	.577**		.603**	
WS2	<b>.762**</b>	<b>.647**</b>	.661**	.538**	<b>.851**</b>	.392**
PDL	.249**		<b>-.614**</b>	<b>.789**</b>		<b>.951**</b>
BWP	<b>.904**</b>	<b>-.427**</b>		.418**		.341**

*Fruit*

AFA		<b>.995**</b>	<b>.889**</b>	.457**	
AFB	.604**	.312**		.670**	.641**
MLF	<b>.759**</b>		<b>-.525**</b>	.622**	<b>1.000**</b>
WF2	.476**	<b>.739**</b>	.547**	.561**	.481**
WF1	<b>.868**</b>	.496**		<b>1.000**</b>	.679**

---



**Table 5.** Correlation between the first two functions of the Discriminant Analyses for environmental variables and morphological traits, and the canonical correspondences for the geometric morphometry used in the study of differentiation between populations of *Ternstroemia tepezapote* in Mexico and Central America. Bold numbers indicate the highest correlation coefficients. EDF: environmental discriminant function. TDF: morphological traits discriminant function. CVMS: morphometric canonical correspondences.

		Discriminant functions and canonical correspondences					
		TDF 1	TDF 2	PCMS 1	PCMS 2	CVMS 1	CVMS 2
<i>Leaf</i>							
Groups of populations	EDF 1	<b>-.380**</b>	<b>.272**</b>	<i>-.272**</i>		<b>.482**</b>	
	EDF 2	<b>.549**</b>	<b>.183**</b>	<i>.223**</i>		<b>-.173**</b>	<b>-.230**</b>
	TDF 1			<b>.503**</b>		<b>-.500**</b>	<b>-.233**</b>
	TDF 2			<b>-.391**</b>	<b>-.191**</b>	<b>.531**</b>	
Temperate sub-groups	EDF 1	<b>.643**</b>		<b>-.300**</b>	<b>-.417**</b>	<b>-.499**</b>	<b>-.324**</b>

	EDF 2				<b>.340**</b>
	TDF 1		<b>-.523**</b>	<b>-.377**</b>	<b>-.239**</b>
	TDF 2		<b>.498**</b>		<b>.381**</b>
Tropical		<b>-.621**</b>		<b>.264**</b>	<b>-.485**</b>
sub-groups	EDF 1				
	EDF 2	<b>-.370**</b>	<b>-.179**</b>	<b>.238**</b>	<b>-.348**</b>
	TDF 1		<b>.368**</b>	<b>-.377**</b>	<b>.403**</b>
	TDF 2			<b>.181**</b>	<b>.557**</b>
<i>Flower</i>					
Groups	of	<b>.442**</b>			
populations	EDF 1				
	EDF 2	<b>-.191**</b>			<b>-.208**</b>
	TDF 1		<b>-.295**</b>		
	TDF 2		<b>-.349**</b>		
Temperate	EDF 1	<b>.538**</b>			

sub-groups

EDF 2 **-.454\*\***

TDF 1

TDF 2

Tropical **-.460\*\*** **-.420\*\***

sub-groups EDF 1

EDF 2 **-.245\*\***

TDF 1

TDF 2 **.405\*\***

*Fruit*

Groups of **.389\*\*** **-.284\*\*** **-.590\*\***

populations EDF 1

EDF 2 **-.378\*\*** **.382\*\*** **.351\*\*** **-.427\*\***

TDF 1 **-.678\*\*** **-.629\*\*** **.328\*\***

TDF 2 **-.581\*\*** **.383\*\***

Temperate

sub-groups

EDF 1

EDF 2

TDF 1

**.578\*\***

TDF 2

**-.821\*\***

**.497\*\***

**-.462\*\***

Tropical

**-.556\*\***

sub-groups

EDF 1

EDF 2 **-.387\*\***

TDF 1

TDF 2

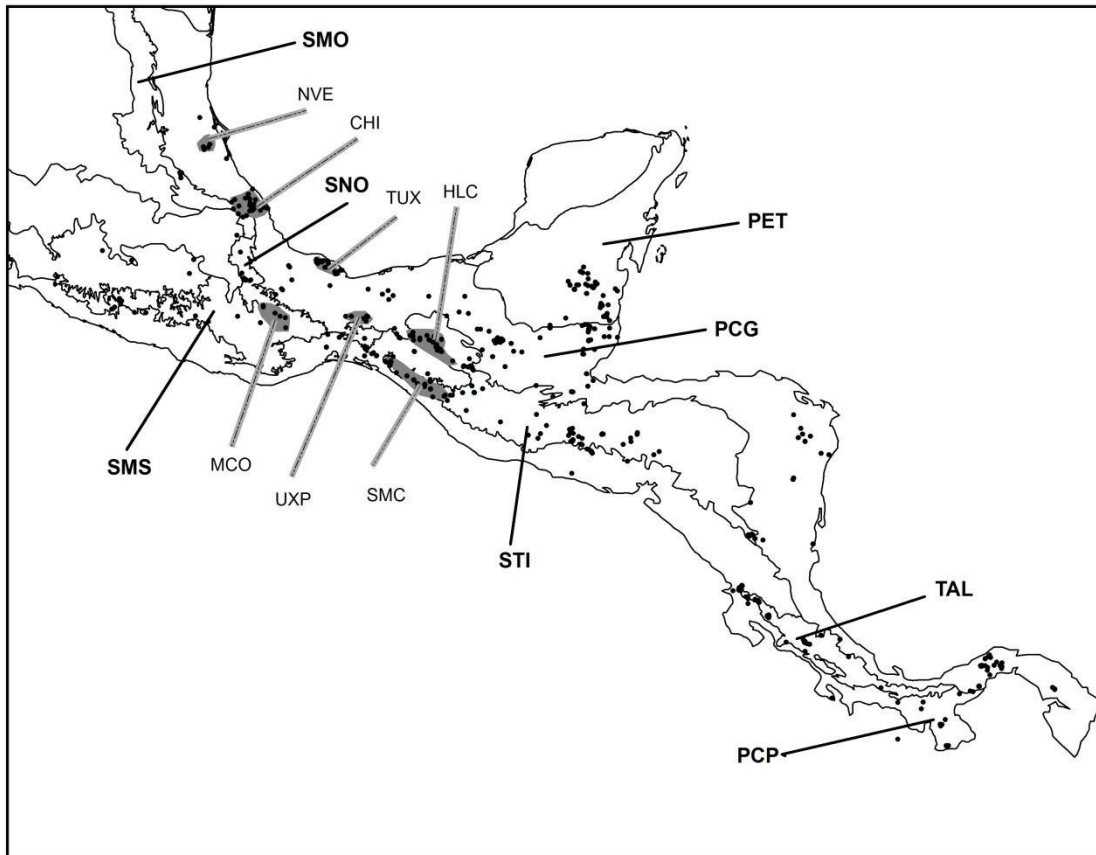


Figure 1. Geographical distribution of *Ternstroemia tepezapote* in Mexico and Central America. Red dots represent the localities gathered from data sources. The main biogeographic provinces are shown in bold: Sierra Madre Oriental (SMO), Sierra Norte de Oaxaca (SNO), Sierra Madre del Sur (SMS), Serranías Transístmicas (STI), Planicie Costera del Golfo (PCG), Planicie Costera del Pacífico (PCP), Petén (PET) and Cordillera de Talamanca (TAL) (Figure 1). The grey areas correspond to region highlighted in the text: northern Veracruz (NVE), Chiconquiaco (CHI), Los Tuxtlas (TUX), Chiapas highlands (HLC), Macizo Central de Oaxaca (MCO), Uxpanapa (UXP) and Sierra Madre de Chiapas (SMC). 215x166mm (300 x 300 DPI)

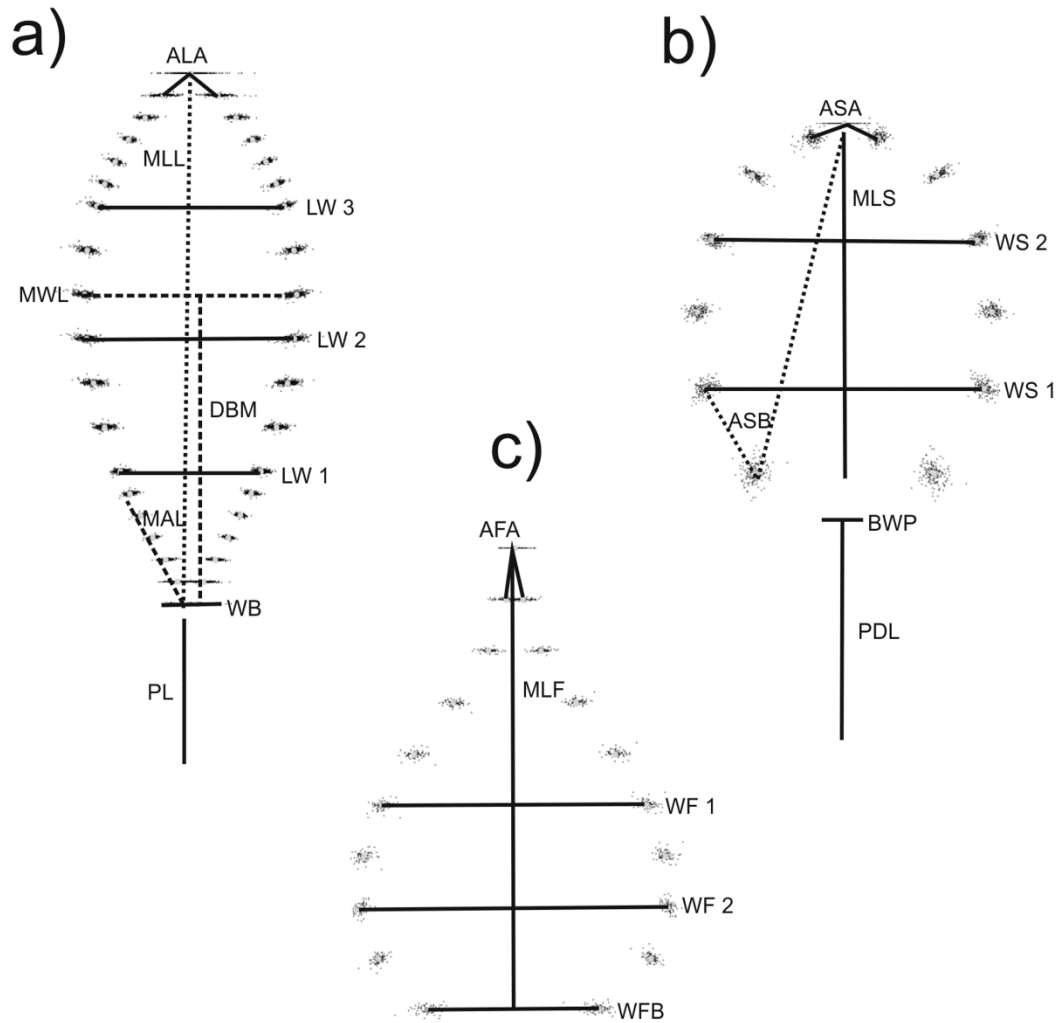


Figure 2. Morphological traits measured and morphometric landmarks identified for a) leaves, b) sepals and c) fruits from the selected specimens of *Ternstroemia tepezapote* from populations in Mexico. Foliar traits: mean length of the leaf lamina (MLL); angle of the lamina apex (ALA); mean angle of the lamina base (MAL); distance from the base to the maximum width of the lamina (DBM); petiole length (PL); total leaf length (including lamina and petiole, TLL); width of the base (WB); 1/4 lamina width (LW1); 2/4 lamina width (LW2); 3/4 lamina width (LW3); maximum width of the lamina (MWL); lamina

length/maximum width ratio (LWR); lamina/petiole length ratio (LPR). Floral traits: mean length of the sepal (MLS); angle of the sepal apex (ASA); angle of the sepal base (ASB); pedicel length (PDL); basal width of the pedicel (BWP); width at 1/5 of the sepal length (WS1); width at 3/5 of the sepal length (WS2). Fruit traits: mean length of the fruit (MLF); angle of the fruit apex (AFA); angle of the fruit base (AFB); width at 4/9 of the fruit length (WF1); width at 2/9 of the fruit length (WF2). 150x159mm (600 x 600 DPI)

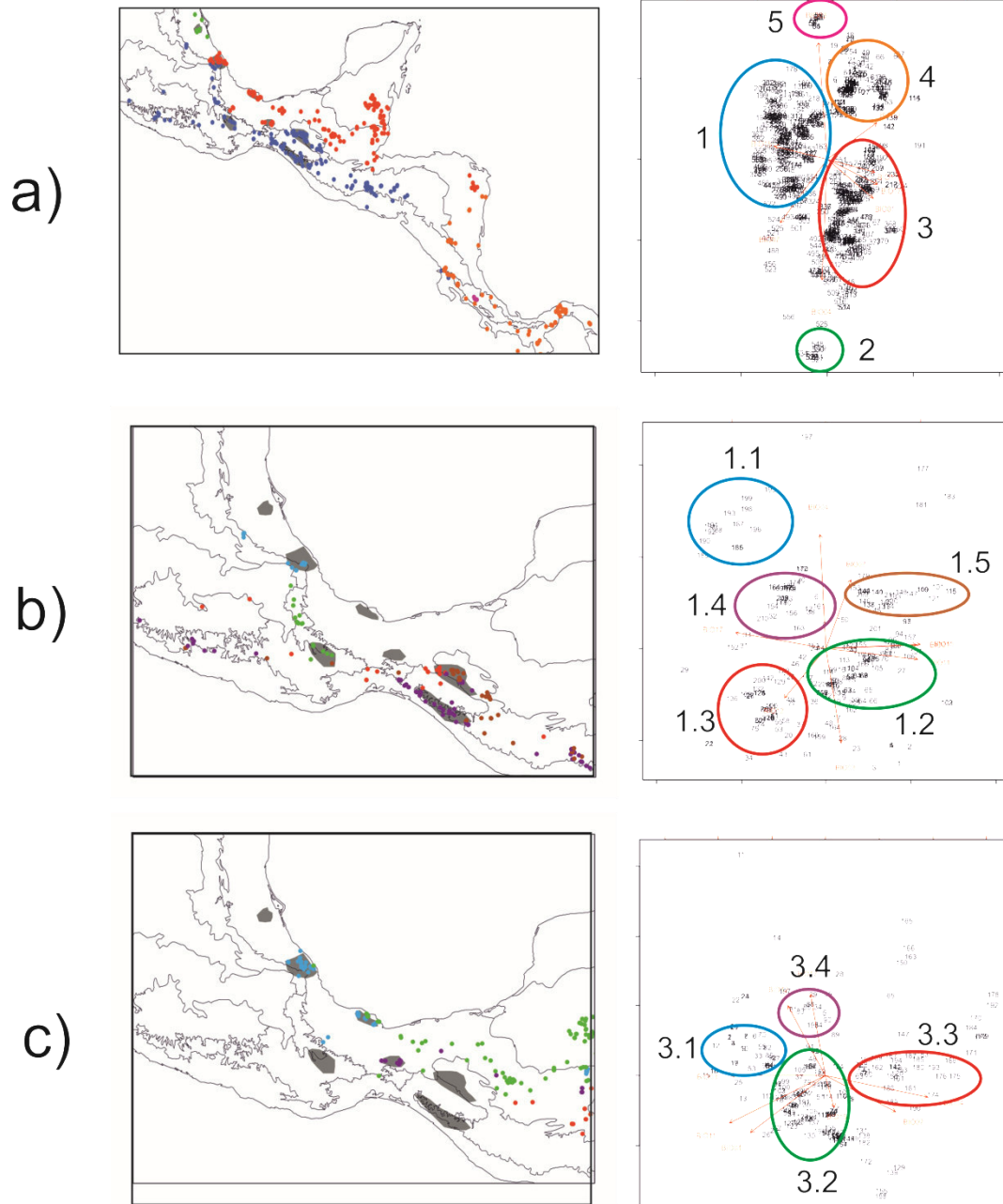


Figure 3. Geographical distribution of the groups and sub-groups identified through the environmental analyses of populations of *Ternstroemia tepezapote* in Mexico and Central America. a) Main groups; b) temperate sub-groups; c) tropical sub-groups. 171x207mm (600 x 600 DPI)



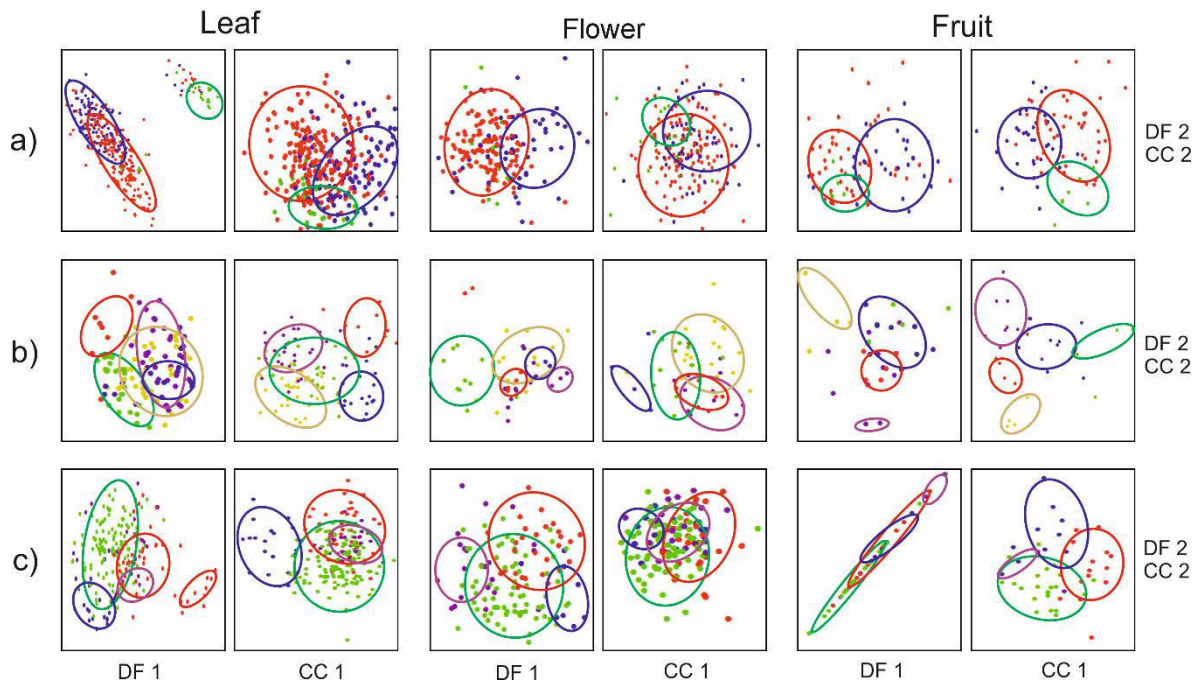


Figure 4. Ordination plots showing the morphological differentiation of groups and sub-groups of populations of *Ternstroemia tepezapote* in Mexico and Central America. a) Main groups; b) temperate sub-groups; c) tropical sub-groups. DF: discriminant functions for the analyses of morphological traits. CV: canonical correspondences for the morphometric analyses. 140x80mm (600 x 600 DPI)

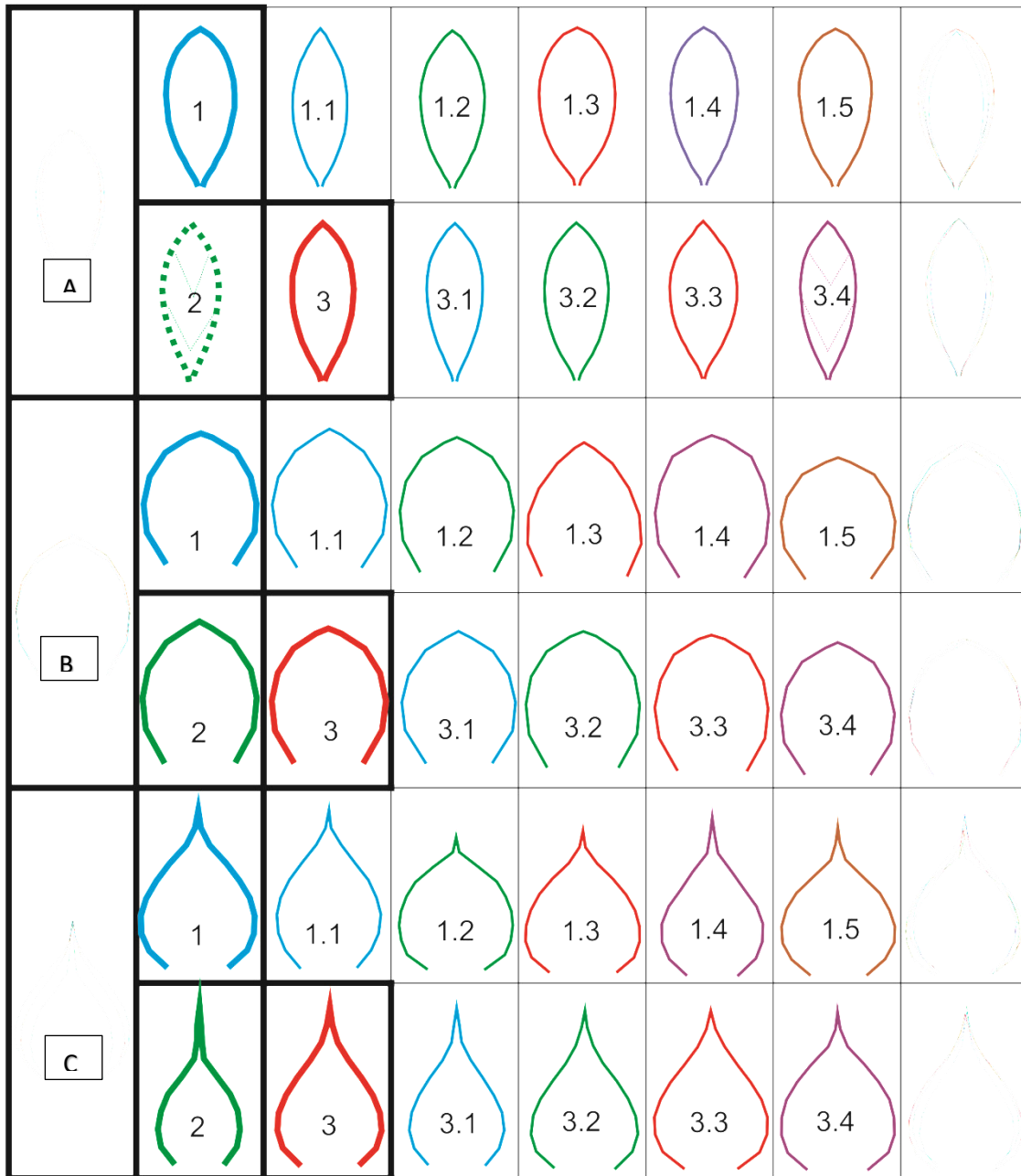


Figure 5. Variation in foliar, floral and fruit morphometry between groups and sub-groups of populations of *Ternstroemia tepezapote* in Mexico and Central America. a) Foliar morphometry; b) floral morphometry; c) fruit morphometry. The mean leaf, sepal and fruit shape are given for each group and sub-group identified. Group 1: temperate populations.

Group 2: populations of northern Veracruz. Group 3: tropical populations. 178x205mm  
(600 x 600 DPI)

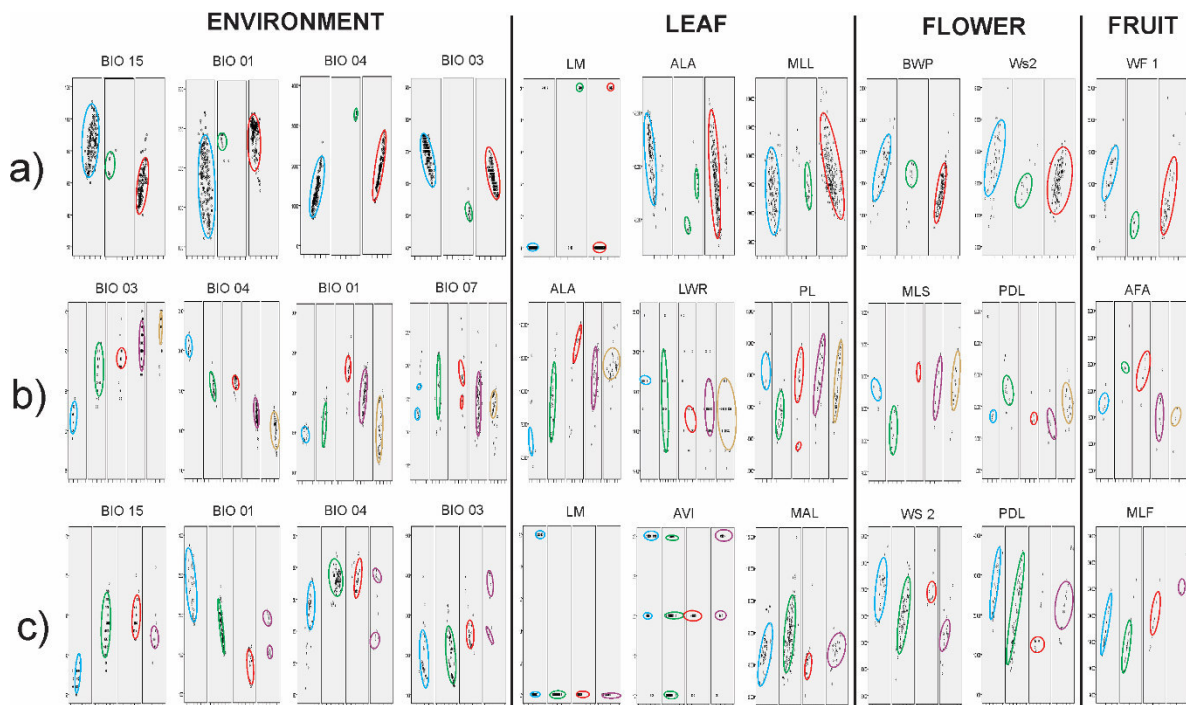


Figure 6. Environmental and morphological variance within groups and sub-groups of populations of *Ternstroemia tepezapote* in Mexico and Central America. a) Main groups; b) temperate sub-groups; c) tropical sub-groups. 142x84mm (600 x 600 DPI)

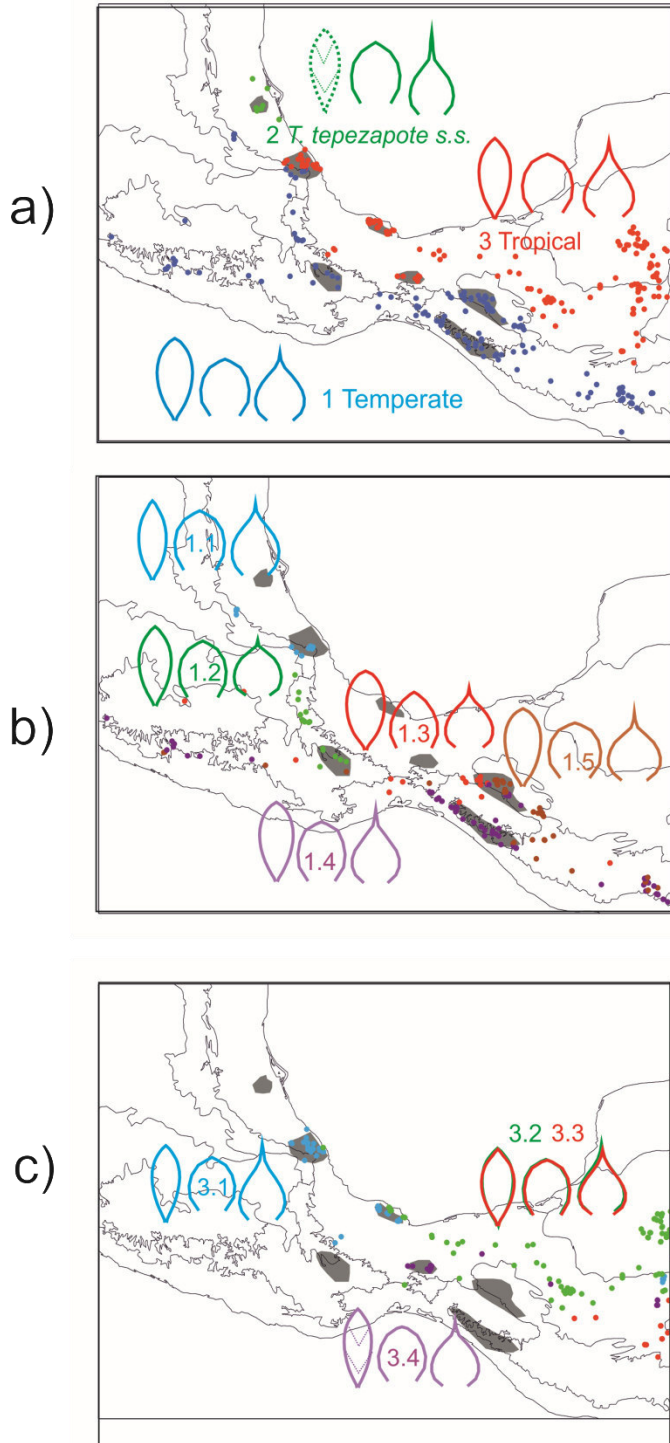


Figure 7. Geographical distribution of the groups and sub-groups of populations of *Ternstroemia tepezapote* in Mexico and the corresponding foliar, floral and fruit

morphometry. a) Main groups; b) temperate subgroups; c) tropical sub-groups.  
241x512mm (600 x 600 DPI).

## DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

En el capítulo 1 se analizó la morfología de la hoja de *Ternstroemia lineata*, linaje perteneciente a un grupo de plantas características de los bosques húmedos de Mesoamerica. Para determinar el papel que juegan los factores medioambientales en la diferenciación morfológica de sus poblaciones, estudiamos las tendencias geográficas generales de la morfología de la hoja y su relación con las principales variables climáticas, principalmente temperatura y precipitación.

Las poblaciones del complejo *T. lineata* muestran una gran variación en cuanto a los caracteres morfológicos foliares a través de su intervalo distribucional. Dado lo anterior, nuestros análisis permitieron definir nueve grupos morfológicamente homogéneos dentro del complejo y definir sus distribuciones geográficas. El patrón que encontramos es que *T. lineata* presenta un mosaico de distribución geográfica en parches, en las que algunos grupos de poblaciones tienen una distribución continua a través de la Faja Volcánica Transmexicana y la Sierra Madre del Sur. No obstante, también detectamos algunos grupos morfológicos que se distribuyen parapátricamente y otros que están aislados en las zonas más norteñas y sureñas de la distribución del complejo.

Algunos de los grupos geográficos encontrados son consistentes con el estatus taxonómico aceptado actualmente (Kobuski, 1942; Bartholomew & McVaugh, 1997); tal es el caso de las poblaciones identificadas como *T. dentisepala* del noroccidente de México y de *T. impressa* del sureste mexicano. Algunos otros grupos no tienen una clara asociación con la circunscripción taxonómica actual.

A partir del siglo XIX, los biólogos notaron que en el trópico húmedo son comunes las plantas con hojas más grandes que aquellas encontradas en regiones templadas, donde se más comunes las hojas pequeñas, principalmente a latitudes y elevaciones mayores. Algunos autores (e.g., Jones, 2014; Michaletz, et al. 2016; Wright, et al. 2017) han intentado explicar los eventos climáticos globales que desencadenan la forma y tamaño de la hoja. De manera general, se ha visto que la variación morfológica en las plantas depende de los cambios de las variables medioambientales a lo largo de gradientes latitudinales, longitudinales y altitudinales a diferentes escalas geográficas (Rico-Gray & Palacios-Ríos, 1996; Niinemets 2001; Chalcoff, Ezcurra & Aizen, 2008; Uribe-Salas et al., 2008; Frenne et al., 2013; Moles et al., 2014).

La morfología de la hoja del complejo *T. lineata* mostró claros patrones de variación por diferencias latitudinales y longitudinales, pero no por diferencias altitudinales. En nuestro estudio encontramos una fuerte correlación entre la morfología de la hoja y variables medioambientales. De manera específica, el área de la hoja mostró una relación cercana con variables medioambientales, donde las hojas con menor área se encontraban en regiones con mayor precipitación durante el año (*i.e.*, alta precipitación durante los meses más húmedos y secos). Por otro lado, las hojas con una área mayor fueron encontradas en regiones con una estacionalidad pronunciada de temperatura y precipitación. Es interesante que el patrón encontrado en nuestro estudio no sigue la tendencia general observada a escalas globales, en donde las hojas más pequeñas tienden a ser más frecuentes en sitios secos (Wright et al., 2017).

La variación en la forma de la hoja a través de gradientes medioambientales ha sido explicada como respuesta de las poblaciones de plantas a los factores medioambientales

(Givinsh, 1987; Malhado et al. 2009a; Malhado et al. 2009b; Werger & Ellenbroek, 1978). De manera general, las hojas más largas, delgadas y espatuladas fueron encontradas en regiones con una precipitación más baja y una alta estacionalidad de la precipitación, siguiendo un patrón noroeste-sureste. Sin embargo, las poblaciones del complejo *T. lineata* también mostraron diferenciación en la forma de la hoja (*v.gr.* de forma delgada espatulada vs. elíptica y obovada) en bosques húmedos de montaña similares, pero siempre siguiendo un gradiente latitudinal y longitudinal.

La relación entre la longitud y la superficie de la hoja con respecto a la estacionalidad de la precipitación fue difícil de explicar en nuestro estudio., lo cual representa una ventaja adaptativa, debido a que las hojas más pequeñas tienen una evapotranspiración menor (Chalcoff, Ezcurra & Aizen, 2008). Nuestros resultados no arrojan este mismo resultado, ya que las hojas más largas y con un área mayor fueron encontradas en aquellas regiones con escasa lluvia. Nosotros sugerimos que el patrón observado se debe al tipo de hábitat en los que estas plantas crecen, caracterizado por altos niveles de humedad en forma de nubes, que son más persistentes en los periodos más secos y fríos del año. La constante presencia de nubes tiende a formar una capa delgada de agua en la superficie de la hoja, que reduce la transpiración y por lo tanto el crecimiento (Leigh, 1975, Lightbody, 1985). Además, esta capa de agua refleja la luz del sol, provocando una reducción de la actividad fotosintética y por lo tanto afectando la tasa de crecimiento de las hojas (Lightbody, 1985).

También es difícil de explicar el valor adaptativo de tener hojas espatuladas o elípticas en diferentes ambientes. Recientemente, Kidner & Umbreen (2010) observaron que la forma de la hoja es extremadamente variable entre las especies y aún en la misma



especie, con grandes variaciones entre las poblaciones y las plantas individuales. La forma de la hoja está relacionada con la capacidad de captura de luz y en la regulación del balance de agua y temperatura. Consideramos que se requieren estudios detallados sobre la variación microclimática entre las poblaciones y análisis de los patrones vasculares de la hoja para determinar los factores que desencadenan la variación de la forma de la hoja del complejo *T. lineata*.

La variación en los caracteres de la hoja se debe a la plasticidad fenotípica en respuesta a gradientes ambientales; la variación morfológica está fuertemente asociada al clima (Givnish, 1987; Westoby et al., 2002; Gratani 2014). El reconocimiento de grupos morfológicos y geográficos a lo largo de la distribución del complejo *T. lineata* nos permitió identificar regiones donde existe variación morfológica debida a diferentes condiciones medioambientales. Pudimos observar un patrón en mosaico de algunas características foliares, y una correspondencia entre gradientes ambientales y forma y tamaño de la hoja. Estos resultados dejan ver que los factores medioambientales juegan un papel relevante en la variación de las características foliares del complejo *T. lineata*. Esta variación se agrupa dentro de grupos discretos bien diferenciados geográficamente. Los patrones observados sugieren que muchos grupos de poblaciones están morfológicamente diferenciados como resultado de un aislamiento geográfico. Pero no debe descartarse que exista una diferenciación significativa en caracteres de la hoja entre poblaciones geográficamente cercanas, lo que sugiere que existen otros factores además del clima que pueden influir en la variación de la morfología de la hoja de las especies del complejo.

En el capítulo 2 podemos observar que hay ciertas limitantes de los métodos filogenéticos para delimitar especies en el complejo de *Ternstroemia lineata*.

Si bien los métodos tradicionales de delimitación de especies se basaban mayormente en hipótesis filogenéticas cuyo principal criterio delimitador era la monofilia recíproca (Sites y Marshall, 2004), existen al menos tres fenómenos que impiden que dicha condición se cumpla: duplicación de genes, transferencia horizontal y coalescencia profunda (Edwards, 2009). En el caso particular de las plantas el escenario se complica debido a que la mayoría de los marcadores empleados en tratamientos filogenéticos proceden de marcadores plastídicos, los cuales presentan una baja diversidad (Small et al., 2004; Ilut y Doyle, 2012) y un alto grado de coalescencia profunda (persistencia de haplotipos compartidos entre especies) (Jakob y Blattner, 2006).

La filogenia basada en el espaciador plastídico *trnT-trnL*, sugiere que a) existe una baja diversidad nucleotídica interespecífica, visible en el gran clado que contiene de manera polifilética a las cuatro especies del complejo y que b) el grupo divergente de *T. chalicophila* y *Eurya acuminata* represente un escenario de coalescencia profunda, en el cual *T. chalicophila* conserva tanto variantes plastídicas muy antiguas como variantes compartidas o relacionadas con el resto de las especies del complejo.

En el caso de los marcadores nucleares, si bien los marcadores de copia única se consideran una alternativa en cuanto a variabilidad y tiempos de coalescencia (Small et al., 2004; Shaw et al., 2005, 2007), en este caso el marcador *LEAFY* mostró una tasa de transferibilidad muy baja (pocos amplificadores legibles) y, al corresponder a una región codificante, presentó apenas un 1.22% de sitios variables lo cual es sumamente inferior al reportado en Theaceae (30.63%) Zhang et al., 2014 y por lo tanto, insuficiente para proporcionar informatividad filogenética. Adicionalmente, la escasa legibilidad de los

electroferogramas de este marcador no debe descartar la existencia de duplicaciones o multicopias.

La región de ADN nuclear ribosomal *ITS*, que presentó la mayor variabilidad, así como grupos bien soportados (*T. lineata* + *T. dentisepala* y un grupo discreto de *T. impressa* + *T. chalicophila*) aún muestra ausencia de monofilia recíproca total, limitando su utilidad para delimitar especies con métodos filogenéticos. No obstante, su nivel de variación es adecuado para analizar la distribución espacial de los linajes mediante técnicas filogeográficas. Adicionalmente, la coincidencia entre la alta divergencia de algunos individuos de *T. chalicophila* tanto con los datos nucleares como plastídicos sugieren la presencia de especies crípticas (Bickford et al., 2007; Carstens y Satler, 2013).

Los análisis filogeográfico muestran que los valores globales de diferenciación son valores altos entre las especies, adicionalmente los índices calculados a partir de alelos ordenados ( $N_{ST}$ ) fue mucho mayor que el basado en alelos y no ordenados ( $G_{ST}$ ), lo cual es indicativo de estructura filogeográfica. Es decir, la prevalencia de haplotipos no sigue un patrón aleatorio sino que está asociada con la relación entre los mismos y su coexistencia en el espacio geográfico (Pons y Petit, 1996).

De manera específica, la baja diferenciación entre *T. lineata* y *T. dentisepala*, así como la presencia de haplotipos compartidos entre ambas, pero también de haplotipos privados para la segunda sugieren conexiones históricas que deben reevaluarse mediante escenarios de flujo génico, es decir, mediante una aproximación basada en genética de poblaciones usando como hipótesis de trabajo la posición de *T. dentisepala* como una subpoblación de *T. lineata*.

A pesar de tener un bajo número muestral, *T. chalicophila* muestra haplotipos privados en posiciones muy distantes de la red, estos haplotipos representan fases, es decir, alelos reconstruidos a partir de las secuencias heterocigas de un solo individuo y constituye la primera evidencia de que el pool genético de esta especie atravesó por un escenario peripátrico temprano que aislaría haplotipos no cercanamente relacionados que actualmente coexisten, a diferencia de los resultados filogenéticos en los cuales se podría interpretar como cripticismo. El caso particular de *T. chalicophila* requiere una aproximación histórico-demográfica que considere las variaciones de hábitat de los bosques templados durante el pasado (Ramírez-Barahona y Eguirarte, 2013) así como la evaluación del papel del flujo génico reciente (principalmente con *T. impressa*) contra coalescencia profunda mediante métodos como la computación bayesiana aproximada (Beaumont et al., 2002).

La especie *T. impressa*, por su parte, mantiene los mayores niveles de estructura filogeográfica dados principalmente por la retención de dos haplotipos en una distribución reducida lo cual permite diferenciarse del resto de las especies del complejo. Esta evidencia es congruente con los tratamientos filogenéticos en los cuales se recuperaba el grupo de *T. impressa*.

El capítulo 3 versa sobre la distribución de *Ternstroemia tepezapote*, especie que ha sido considerada como altamente variable y con una distribución muy amplia en el país. Se ha dicho que esta especie habita en diferentes tipos de vegetación, tanto tropicales como templados, desde el nivel del mar hasta los 3000 msnm (e.g., Standley, 1920-1926; Rose and Collins, 1903-1905; Kobuski 1942, 1943; Luna-Vega et al. 2004). La delimitación taxonómica de esta especie ha sido ambigua y se debe a que se cree que la especie tiene una variación fenotípica muy grande y una alta tolerancia ambiental. En este estudio,

encontramos que dentro del intervalo distribución en México de *T. tepezapote*, existen varios grupos principales que dependen de diferencias en la temperatura media anual y la estacionalidad de la lluvia, así como de otros factores como la estacionalidad de la temperatura e isothermalidad.

En este estudio encontramos ocho entidades morfológicas diferentes (morfotipos) de *T. tepezapote* basados en evidencias ambientales y morfológicas (ver clave taxonómica al final). Para los fines de este manuscrito, se define a un morfotipo como el grupo de organismos que comparte caracteres morfológicos y ambientales.

Las poblaciones tropicales localizadas en el norte de Veracruz, en las cercanías de Chiconquiaco, son las únicas que encajan en la descripción original de la especie (*T. tepezapote s.s.*). Además de éste, encontramos cinco morfotipos templados y dos más tropicales. Podemos decir que existen diferencias contundentes entre los morfotipos templados y tropicales.

Los cinco morfotipos templados son claramente diferentes en cuanto a la forma de la hoja, fruto y en algunos casos en la flor (sépalos). Podemos decir que, en la mayoría de los casos, estas diferencias se deben a su separación en distancia geográfica, ya que tres de estos morfotipos son claramente alopátricos al resto. En el caso de los sistemas montañosos del norte de Chiapas, existen dos morfotipos morfológicamente diferentes pero cercanos geográficamente, pero que habitan en diferentes tipos de vegetación y elevación. Por lo anterior, podemos decir que el que los morfotipos estén alejados unos de otros no es el único factor que explique su divergencia morfológica.

En cuanto a los morfotipos tropicales, observamos que existe un solapamiento en el morfo-espacio de tres de los cuatro grupos propuestos originalmente, por lo que sólo pudimos reconocer dos morfotipos tropicales. En este caso, el efecto del aislamiento no es necesariamente obvio, ya que existen poblaciones localizadas en diferentes sitios que son morfológicamente similares. Pudimos reconocer tres entidades originales que habitan en zonas geográficamente cercanas sin que existieran barreras geográficas evidentes.

Los análisis de correlación llevados a cabo mostraron que existe una correlación significativa de los eigenvectores del PCA con los gradientes de precipitación, por lo que podemos asumir que algunos procesos adaptativos siguen ocurriendo en estas entidades, y que la variación registrada puede ser consistentemente explicada con gradientes de precipitación medioambiental o hasta con temperatura. Además, tenemos que considerar que algunas características cualitativas, como el caso de las venas de la hoja impresas en el haz (permitiendo una mayor superficie de exposición para absorber nutrientes del medioambiente) podrían ayudar a separar a las poblaciones de Uxpanapa (Veracruz) de las demás poblaciones.

*Ternstroemia tepezapote s.s.*

*Ternstroemia tepezapote* fue descrita originalmente a partir de especímenes recolectados en el norte de Veracruz a altitudes de 50-100 m. El grupo de poblaciones del norte de Veracruz puede considerarse como representante morfológico y ecológico del tipo nomenclatural de la especie. Las poblaciones del norte de Veracruz se caracterizan por presentarse en sitios con una baja isothermalidad y una alta temperatura estacional, con respecto al resto de las poblaciones de tierras bajas tropicales (Figura 6), por lo que estas

poblaciones de tierras bajas son consideradas en nuestro estudio como *T. tepezapote s.s.* (Figura 7a).

Las diferencias morfológicas entre *T. tepezapote s.s.* y el resto de las poblaciones tropicales son: el tipo de margen de la hoja (crenado) y la impresión de la vena adaxial, posiblemente para agrandar la superficie de exposición de las hojas garantizando su absorción de agua y luz. La morfometría foliar separa claramente *T. tepezapote s.s.* del grupo templado, pero no del grupo tropical. Sin embargo, las hojas de *T. tepezapote s.s.* son elípticas y más delgadas que las hojas observadas en el resto de las poblaciones tropicales. Además, los ángulos del ápice y la base de la lámina son más agudos en *T. tepezapote s.s.* (60-80 °) que en el resto del grupo tropical (40-55 °). La separación entre *T. tepezapote s.s.* y el grupo tropical no fue fácil. No obstante, observamos diferencias entre *T. tepezapote s.s.* y las poblaciones que constituyen el grupo tropical, principalmente en cuanto al ápice del fruto.

#### Características de los morfotipos del grupo templado

Se pudieron identificar cuatro de los cinco grupos ambientales utilizando análisis morfológicos y morfométricos de hojas, flores (sépalos) y frutos (Figura 7b). Los individuos del subgrupo 1.1 se encuentran en la Sierra Madre Oriental (1600-2000 m) y se caracterizan por tener hojas elípticas y delgadas con un ápice agudo (50-70 °), venas poco impresas y pecíolos largos (> 7 mm). Las flores tienen sépalos ovoides con una longitud de 8-10 mm, ápices agudos y pedicelos largos (> 40 mm). Los frutos tienen un ápice alargado (6-10 mm de ancho) y muy agudo. Este subgrupo corresponde a las poblaciones descritas como *T. huasteca* B.M. Barthol. (Bartholomew 1988). El morfotipo pertenece a

especímenes de herbario mal identificados que fueron corregidos en los herbarios como *T. huasteca*.

Las poblaciones del subgrupo 1.2 se distribuyen a lo largo de la Sierra Norte de Oaxaca (1400-2500 m) y sus miembros se caracterizan por tener hojas ligeramente obovadas con ápices agudos ( $55-120^\circ$ ) y pecíolos cortos (4-6 mm) (Figura 7b). Estos individuos tienen flores con sépalos semicirculares pequeños (5-8 mm), ápices obtusos y pedicelos con una longitud de 20-35 mm. Los frutos son redondos y tienen un ápice corto (12-15 mm de ancho). La morfología de los individuos de este subgrupo se asemeja a la de los individuos descritos como *T. hemsleyi* Hochr. (Hochreutiner 1917), lo que sugiere la existencia de una especie diferente que debería validarse con estudios complementarios, como los genéticos y moleculares.

Las poblaciones del subgrupo 1.3 habitan el ecotono entre los bosques húmedos de montaña y el bosque tropical perennifolio de Oaxaca y Chiapas, a una altitud de 500-1200 m (Figura 7b). Este subgrupo se caracteriza por tener hojas ampliamente obovadas con ápices obtusos ( $110-150^\circ$ ), bases cuneadas, con venas imperceptibles y pecíolos largos (6-10 mm). Las flores tienen sépalos obovadas con ápices agudos (10-12 mm) y pedicelos cortos (15-18 mm). Los frutos son obovadas, con ápices cortos, con una anchura de 15-22 mm. Los individuos de este subgrupo tienen una morfología semejante a la de los especímenes descritos como *T. oocarpa* (Rose) Melch. (Melchior, 1935). La morfología de *T. oocarpa* también se asemeja, aunque parcialmente, a la de las poblaciones del subgrupo 1.4. Este subgrupo se distribuye en bosques húmedos de montaña y bosques de *Quercus* de la Sierra Madre de Chiapas (900-2000 m). Los miembros de este subgrupo se caracterizan por tener hojas ligeramente obovadas (Figura 7b) con ápices agudos a obtusos ( $80-135^\circ$ ),



venas imperceptibles y pecíolos largos (6-11 mm). Las flores tienen sépalos ampliamente elípticos, alargados (7-11 mm), ápices obtusos y pedicelos cortos (10-18 mm). Los frutos son piriformes con ápices alargados y agudos, con una anchura de 15-23 mm.

Finalmente, el subgrupo 1.5 se localiza en los bosques de *Pinus-Quercus* mixtos y bosques húmedos de montaña de las tierras altas de Chiapas, a una altitud de 1500-3000 msnm. Los miembros de este subgrupo tienen hojas obovadas, ligeramente espatuladas, con ápices agudos a obtusos (110-130 °) y pecíolos largos (5-10 mm). Las flores tienen sépalos circulares y grandes (12-25 mm), ápices obtusos y pedicelos con una longitud de 11-23 mm. Los frutos son redondos con un ápice ligeramente alargado y un ancho de 20-30 mm. Los miembros que pertenecen a este subgrupo también pueden identificarse parcialmente como *T. oocarpa*.

#### Características de los morfotipos del grupo tropical

Los subgrupos tropicales tienen una menor diferenciación morfológica, a diferencia de los templados. Las poblaciones del subgrupo 3.1 se distribuyen en Chiconquiaco, Veracruz, a una elevación de 0-1200 msnm. Los análisis morfológicos y morfométricos muestran que este subgrupo es diferente del resto de las poblaciones tropicales. Sin embargo, si consideramos los rasgos foliares cualitativos, los individuos que habitan en altitudes de menos 500 msnm y que tienen un margen crenado pertenecen a *T. tepezapote s.s.*, mientras que los individuos ubicados a una altitud de 800-1200 msnm pertenecen al grupo templado. Por lo anterior, los individuos de este subgrupo fueron los más difíciles de diferenciar utilizando análisis discriminantes.

No se pudieron detectar diferencias morfológicas o morfométricas evidentes entre los subgrupos ambientales 3.2 y 3.3, que se localizan en todo el Planicie Costera del Golfo y la región Lacandona, respectivamente, a altitudes de 50 a 700 m. Estos dos subgrupos ambientales forman un grupo morfológico único caracterizado por presentar hojas elípticas con ápices agudos (50-70 °), con venas poco aparentes y márgenes enteros. Las flores tienen sépalos ampliamente elípticos, con una longitud de 5.8-9.5 mm, ápices agudos y pedicelos con una longitud de 10-30 mm. Los frutos son piriformes y tienen ápices alargados y agudos. La morfología de los individuos de estos dos subgrupos corresponde a la de los especímenes descritos como *T. seemannii* Triana y Planch. (Triana y Planchon 1862).

Finalmente, el subgrupo 3.4 se localiza en la región de Uxpanapa, Veracruz, a una altitud cercana al nivel del mar. Este subgrupo está compuesto por individuos con poca diferenciación foliar y diferencias mínimas en la morfología floral y del fruto con respecto a los demás subgrupos. Las hojas son obovadas con un ápice agudo (50-70 °), con venas impresas conspicuas y márgenes enteros. Los individuos de este subgrupo se asemejan un tanto a los especímenes descritos como *T. seemannii*, ubicados en diferentes localidades de los subgrupos 3.2 y 3.3.

Concluyendo podemos resumir que en el capítulo 1 analizamos la relación entre las variables medioambientales y la variación en la morfología foliar entre varias poblaciones de *T. lineata* distribuidas en México y Guatemala. Pudimos observar que el efecto del clima es diferente en las diferentes poblaciones, lo que ha causado que existan diferentes patrones de diferenciación geográfica. Nuestros resultados muestran que existen morfologías foliares convergentes entre los individuos de diferentes poblaciones, como una respuesta a factores medioambientales similares más que a proximidad geográfica. Es importante que se corroboren los patrones encontrados con análisis de estructura genética entre las poblaciones.

El haber llevado a cabo diferentes análisis estadísticos multivariados y análisis geográficos de morfología foliar permitió establecer patrones de variabilidad, que son un paso fundamental para entender el proceso de diferenciación de las poblaciones de las entidades de este complejo de especies, resultados que pueden ser extrapolados a otras especies relacionadas ambientalmente. No obstante, es importante incluir datos genéticos con la variación morfológica para entender mejor las barreras reproductivas y otros procesos.

En este estudio se resalta el papel clave que tiene el ambiente para moldear la variación morfológica en las diferentes poblaciones de un complejo de especies a nivel local y regional. No obstante, consideramos que es necesario un estudio taxonómico formal que englobe tanto los caracteres morfológicos de la hoja, flores y frutos, además de incluir marcadores moleculares para evaluar el grado de diferenciación entre las especies y subespecies del complejo *T. lineata*.

Del capítulo 2 se concluye que el enfoque multiloci empleado, a pesar de integrar evidencias de diferentes compartimientos genómicos (núcleo, mitocondria y cloroplasto) no es suficientemente informativo para concluir sobre los límites específicos del complejo. Por otra parte, esta aproximación evidencia la existencia de linajes comunes a varias especies del complejo.

La aproximación filogeográfica, al emplear un mayor número de individuos permite vislumbrar escenarios históricos comunes entre *T. lineata* y *T. dentisepala*, sin embargo, el umbral que define a la segunda como subespecie de la primera necesita el empleo de otros marcadores que proporcionen una mayor informatividad filogenética así como la puesta a prueba de escenarios demográficos explícitos.

La formación de grupos soportados de *T. impressa* y *T. chalicophila* con los métodos tanto filogenéticos como filogeográficos evidencian su estatus de especies. Adicionalmente, el método filogeográfico permitió determinar que *T. chalicophila* se compone tanto de linajes muy divergentes entre sí más linajes comunes en el complejo y no de especies crípticas.

Del capítulo 3 podemos concluir que a partir de nuestros resultados morfométricos y ambientales, que sólo las poblaciones del norte de Veracruz (Tepetzintla, Chontla y alrededores) que habitan en altitudes más bajas, pertenecen a *Ternstroemia tepezapote ss.* Las otras poblaciones de localidades templadas y tropicales que habitan en diferentes lugares en el centro y el sur de México no coinciden con la especie tipo. Es necesario renombrar a los miembros de estas poblaciones, por lo que es indispensable reconsiderar algunas de las sinonimias propuestas anteriormente como entidades taxonómicas válidas.

Este es el caso de *T. hemsleyi*, *T. oocarpa*, y *T. seemannii*, entidades taxonómicas que se agruparon en *T. tepezapote* sl. (Ver clave taxonómica).

*T. huasteca* a veces se ha identificado erróneamente como *T. tepezapote*, pero nunca ha sido considerada como una sinonimia de esta última entidad. Las poblaciones templadas son más diferentes morfológicamente entre sí, mientras que las poblaciones tropicales tienen una mayor plasticidad fenotípica y una menor diferenciación morfológica. Consideramos que las poblaciones tropicales son más problemáticas taxonómicamente porque su diferenciación es menos evidente, por lo que es necesario realizar investigaciones genéticas y filogeográficas.

#### Clave taxonómica

A continuación se presenta una clave artificial para separar los diferentes grupos mexicanos que resultaron del análisis y que permite distinguir claramente a *Ternstroemia tepezapote sensu stricta* del resto de las especies que en algún momento han sido identificadas como *T. tepezapote* (*Ternstroemia tepezapote sensu lacto*).

#### 1. Hojas elípticas a ligeramente obovadas, delgadas con ápice agudo

2. Pecíolos cortos de 4 a 6 mm de largo..... Grupo 1.2 – *Ternstroemia hemsleyi*

2. Pecíolos largos de más de 7 mm de largo

3. Sépalos ovoides, pedicelos largos de más de 40 mm de largo.... Grupo 1.1 -

*Ternstroemia huasteca*

3. Sépalos ampliamente elípticos, pedicelos de 10 a 30 mm de largo..... Grupos (3.2 y 3.3)..... *Ternstroemia seemannii* en parte

#### 1. Hojas obovadas a ampliamente obovadas, delgadas o gruesas, ápice agudo u obtuso

2. Hojas obovadas, gruesas a delgadas

3. Hojas delgadas, venas impresas en el haz, habitan por debajo de los 100 m de

altitud

- 4. Borde la hoja entero..... Grupo 3.4 - *Ternstroemia seemannii*  
en parte
- 4. Borde de la hoja crenado .....Grupo 3.1 - *Ternstroemia tepezapote*  
*s.s.*
- 3. Hojas gruesas, venas no impresas en el haz, habitan de los 900 a los 3000 m
  - 4. Sépalos ampliamente elípticos, de 7 a 11 mm de largo.....Grupo 1.4 –  
*Ternstroemia oocarpa* en parte
  - 4. Sépalos circulares, de 12 a 25 mm de largo.....Grupo 1.5 –  
*Ternstroemia oocarpa* en parte
- 2. Hojas ampliamente obovadas, siempre gruesas.....Grupo 1.3 –  
*Ternstroemia oocarpa* en parte

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anderberg, A.A., Rydin, C., & Källersjö, M. 2002. Phylogenetic relationships in the order Ericales s.l.: analyses of molecular data from five genes from the plastid and mitochondrial genomes. *American Journal of Botany* 89(4): 677-687.
- APG II. (Angiosperm Phylogeny Group II) 2003. An Update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 141, 399-436
- APG IV (Angiosperm Phylogeny Group 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 (1): 1–20.
- Avice, J.C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA, EUA.
- BioMedware. 2013. *BoundarySeer: software for the detection and analysis of geographic boundaries*. User manual version 1.5 BioMedware, Inc.
- Chi-Chih, W., Zhi-Fu, H. & Chih-Hua, T. 2007. Phylogeny and taxonomy of *Eurya* (Ternstroemiaceae) from Taiwan, as inferred from ITS sequence data. *Botanical Studies* 48: 97-116.
- Clement, M., Posada, D.C.K.A. & Crandall, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular ecology* 9(10): 1657-1659.
- Conzatti, C. 1903. *Los géneros vegetales mexicanos*. Mexico. Secretaría del Fomento, Mexico 449 pp.

- Cornish-Bowden, A. 1985. Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences: recommendations 1984. *Nucleic Acids Research* 13(9): 3021.
- Cronquist, A. 1981. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. Columbia University Press. New York.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., & Posada, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8): 772-772.
- Donatella, C., Matarazzo, P., Allegrucci, G. & Sbordoni, V. 1997. Comparing patterns of geographic variation in cave crickets by combining geostatistic methods and Mantel tests. *Journal of Biogeography* 24(4): 419-431.
- Dumolin-Lapègue, S., Pemonge, M.H. & Petit, R.J. 1997. An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Molecular Ecology* 6: 393–397.
- ESRI. 2011. *ArcGIS desktop: release 10*. Redlands: Environmental Systems Research Institute.
- Hijmans, R.J., & Graham, C.H. 2006. The ability of climate envelope models to predict the effect of climate change on species distributions. *Global Change Biology*, 12(12): 2272-2281.
- Johnston, K., Ver Hoef, J.M., Krivoruchko, K. & Lucas, N. 2001. *Using ArcGis statistical Analyst*. ESRI. 300 p.
- Keng, H., 1961. Comparative morphological studies in Theaceae. *Univ. Calif. Publ. Bot.* 33, 269–384.



- Kobuski, C.E. 1942. Studies in the Theaceae. XIII. Notes on the Mexican and Central American species of Ternstroemia. *J. Arnold Arbor.* 23: 464–478.
- Kobuski, C.E. 1943. Studies in the Theaceae. XIV. Notes on the West Indian species of Ternstroemia. *J. Arnold Arbor.* 24: 60-76.
- Kobuski, C.E. 1961. Studies in the Theaceae. XXXII. A review of the genus Ternstroemia in the Philippine Islands. *J. Arnold Arbor.* 42: 263-275.
- Kobuski, C.E. 1963. Studies in the Theaceae. XXXIV. Some Asiatic taxa of Ternstroemia. *J. Arnold Arbor.* 44: 421-434.
- Kozlov, A. M., Darriba, D., Flouri, T., Morel, B., & Stamatakis, A. (2019). RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics* 35(21): 4453-4455.
- Lefort, F. & Douglas, G.C. 1999. An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. *Annals of Forest Science* 56: 259-263.
- Leigh, J.W., & Bryant, D. 2015. Popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 6(9): 1110-1116.
- Librado, P., & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- Luna-Vega, I. & Villaseñor, J.L. 1996. Géneros de Theaceae: aspectos taxonómicos y nomenclaturales. *Bol. Soc. Bot. México* 59: 81-95.

- Luna-Vega, I., & Ochoterena, H. 2004. Phylogenetic relationships of the genera of Theaceae based on morphology. *Cladistics*, 20(3): 223-270.
- Luna-Vega, I., Alcántara-Ayala, O. & Contreras-Medina, R. 2004. Patterns of diversity, endemism and conservation: an example with Mexican species of Ternstroemiaceae Mirb. ex DC. (Tricolpates: Ericales). *Biodiversity and Conservation* 13: 2723–2739.
- Martínez-González, C.R., Gallegos-Vázquez, C., Luna-Vega, I., & García-Sandoval, R. (2015). *Opuntia leiascheinvariana*, una nueva especie de Cactaceae del Estado de Hidalgo, México. *Botanical Sciences* 93(3): 517-529.
- Mirbel, M. 1813. Notes pour servir à l'histoire naturelle de la famille des Orangers de M. A.-L. de Jussieu. *Nouveau Bulletin des Sciences par la Société Philomatique* 75: 377-383
- Pool, A. 2001. Theaceae. In: Stevens W.D., Ulloa C., Pool A. and Montiel O.M. (eds.). *Flora de Nicaragua. Angiospermas*. Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, Missouri, pp. 2443–2448.
- Posada, D. & Crandall K.A. 2001. Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Systematic Biology* 50: 580-601.
- Prince, L.M., & C.R.Parks. 2001. Phylogenetic relationships of Theaceae inferred from chloroplast DNA sequence data. *Am. J. Bot.* 88, 2309–2320.
- R Core Team. 2018. *R: a language and environment for statistical computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.

- Rohlf, F.J. 2010. tpsDig version 2.16. Department of Ecology and Evolution. State University of New York. Stony Brook. NY.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Schönenberger, J., Andenberg, A.A., & Sytsma, K.J., 2005. Molecular phylogenetics and patterns of floral evolution in the Ericales. *Int. J. Plant Sci.* 166, 265-288.
- Swofford, D.L. 2000. PAUP\*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\* and other methods), Ver 4.0b4a. Sinauer Associates, Sunderland.
- Standley, P. 1920-1926. Trees and shrubs of Mexico. Washington, D.C. Smithsonian Institution and U.S. Government Printing Office.
- Statsoft Inc. 2009. Statistica 7.0. Tulsa: StatSoft Inc
- Stephens, M., Smith, N. J., & Donnelly, P. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *The American Journal of Human Genetics* 68(4): 978-989.
- Stevens, P.F. 2008. Angiosperm Phylogeny Website. Version 9 onwards. <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>.
- Stevenson, D.W., Stevenson, J.W. 2004. Ternstroemiaceae. In: Smith N., Mori, S.A., Henderson, A., Stevenson, D.W., Heald, S. (Eds.). Flowering plants of the Neotropics. Princeton University Press, Princeton and Oxford, pp. 367-368.

- Sun, Y., Skinner, D. Z., Liang, G. H., & Hulbert, S. H. 1994. Phylogenetic analysis of Sorghum and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 89(1): 26-32.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. , Bouvet, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol Biol* 17, 1105–1109.
- Thorpe, R.S. 2002. Geographic variation. In: Pagel, M. (ed.). *Encyclopedia of evolution*. Oxford University Press. pp. 430-435.
- Urban, I. 1896. Ternstroemiaceae (sensu ampliore). In: Engler A. *Systematik Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie*. Engler's Botanische Jahrbücher 21. Leipzig. pp. 514-555.
- Urbatsch, L.E., Baldwin B.G. & Donoghue M.J. 2000. Phylogeny of coneflowers and relatives (Heliantheae: Asteraceae) based on nuclear rDNA internal transcribed spacer (ITS) sequences and chloroplast DNA restriction site data. *Syst. Bot.* 25: 539-565.
- Wawra, H. 1886. Ternstromiaceae. In Martius, K.F.P., Eichler, A.G., & Urban, I. (Eds.) *Flora Brasiliensis, enumeratio plantarum in Brasilia hactenus detectarum : quas suis aliorumque botanicorum studiis descriptas et methodo naturali digestas partim icone illustratas*. Vol 12.
- Weitzman, A.L. 1995. Diversity of Theaceae and Bonnetiaceae in the montane Neotropics. In: Churchill, S.P., Balslev, H., Forero, E., Luteyn, J.L., *Biodiversity and Conservation of Neotropical Montane Forests*. The New York Botanical Garden, New York, pp. 365-375.

- Weitzman A.L, Dressler S, Stevens P.F. 2004. Ternstroemiaceae. In: Kubitzki K, ed. Flowering Plants Dicotyledons. The families and genera of vascular plants. Berlin, Heidelberg: Springer. Vol. 6
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M.A. Innis et al. (eds.), PCR protocols, Academic Press, San Diego, California, USA, pp. 315-322.
- Yang, S.-X., Yang, J.-B., Lei, L.-G., Li, D.-Z., Yoshino, H. & Ikeda, T. 2004. Reassessing the relationships between *Gordonia* and *Polyspora* (Theaceae) based on the combined analyses of molecular data from the nuclear, plastid and mitochondrial genomes *Plant Syst. Evol.* 248: 45-55.
- Zhang, W., Kan, S. L., Zhao, H., Li, Z. Y., & Wang, X.Q. 2014. Molecular phylogeny of tribe Theae (Theaceae s.s.) and its implications for generic delimitation. *PloS One* 9(5): e98133.