



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

BIOLOGÍA EVOLUTIVA

Delimitación de especies y filogeografía del clado *Dalbergia congestiflora* (Fabaceae: Papilionoideae)

T E S I S

(POR ARTÍCULO CIENTÍFICO)

Molecular species delimitation in the *Dalbergia congestiflora* (Papilionoideae) clade reveals regional endemism and cryptic diversity

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Euler Pedraza Ortega

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. JENY SOLANGE SOTUYO VÁZQUEZ

INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ANTONIO GONZÁLEZ RODRÍGUEZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. GERARDO ADOLFO SALAZAR CHÁVEZ

INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2023



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

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

BIOLOGÍA EVOLUTIVA

Delimitación de especies y filogeografía del clado *Dalbergia congestiflora* (Fabaceae: Papilionoideae)

TESIS

(POR ARTÍCULO CIENTÍFICO)

Molecular species delimitation in the *Dalbergia congestiflora* (Papilionoideae) clade reveals regional endemism and cryptic diversity

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

Euler Pedraza Ortega

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. JENY SOLANGE SOTUYO VÁZQUEZ

INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ANTONIO GONZÁLEZ RODRÍGUEZ

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS Y SUSTENTABILIDAD, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. GERARDO ADOLFO SALAZAR CHÁVEZ

INSTITUTO DE BIOLOGÍA, UNAM

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2023



COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

OFICIO CPCB/223/2023

ASUNTO: Oficio de Jurado

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

Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el 16 de enero del 2023, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de **BIOLOGÍA EVOLUTIVA** del alumno **PEDRAZA ORTEGA EULER** con número de cuenta **95605201** por la modalidad de graduación de **tesis por artículo científico** titulado: **“Molecular species delimitation in the *Dalbergia congestiflora* (Papilionoideae) clade reveals regional endemism and cryptic diversity”**, que es producto del proyecto realizado en la maestría que lleva por título: **“Delimitación de especies y filogeografía del clado *Dalbergia congestiflora* (Fabaceae: Papilionoideae)”**, ambos realizados bajo la dirección de la **DRA. JENY SOLANGE SOTUYO VAZQUEZ**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: **DR. ALFONSO OCTAVIO DELGADO SALINAS**
Vocal: **DRA. SOFIA SOLORZANO LUJANO**
Vocal: **DRA. SONIA VAZQUEZ SANTANA**
Vocal: **M. EN C. LAURA MARGARITA MARQUEZ VALDELAMAR**
Secretario: **DR. GERARDO ADOLFO SALAZAR CHAVEZ**

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 27 de febrero de 2023

COORDINADOR DEL PROGRAMA

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Este trabajo no hubiese sido posible sin el apoyo brindado por diversas instituciones. Agradezco en primera instancia al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por brindarme la oportunidad de formarme académicamente. Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (CVU 924210), para la realización de mis estudios de maestría. Agradezco al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por la financiación del proyecto no. IT200519, con cuyos recursos realizamos el trabajo de campo y laboratorio, y por la beca no. 239920 otorgada como apoyo para la obtención de grado. Quiero agradecer a mi tutora, la Dra. Jeny Solange Sotuyo Vázquez, por la asesoría y el apoyo brindado durante la realización de mis estudios de maestría. A los miembros de mi comité tutorial al Dr. Antonio González Rodríguez y al Dr. Gerardo Adolfo Salazar Chávez por su orientación académica.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

En el ámbito personal agradezco a la M. en C. Leticia Julio Catarino con quien compartí los estudios de maestría y cuyo compañerismo y amistad hicieron agradable el trabajo en campo y de laboratorio, además por su excelente asesoría para la revisión de los ejemplares herborizados y por haberme contagiado de su entusiasmo por la botánica. Agradezco al Biól. Esteban Manuel Martínez Salas por su invaluable ayuda durante la realización del trabajo de campo y por sus atinadas observaciones respecto de las especies de nuestro grupo de estudio. Agradezco a los integrantes de mi jurado el Dr. Alfonso Octavio Delgado Salinas, el Dr. Gerardo Adolfo Salazar Chávez, La M. en C. Laura Margarita Márquez Valdelamar, la Dra. Sofía Solórzano Lujano y la Dra. Sonia Vázquez Santana, por sus acertados comentarios que me ayudaron a enriquecer este manuscrito.

Agradezco al Instituto de Biología de la UNAM por el acceso a las instalaciones del Laboratorio Nacional de la Biodiversidad, en particular al Laboratorio de Biología Molecular por haberme permitido trabajar en sus instalaciones, y al Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y la Salud por sus servicios de secuenciación, en las cuales siempre conté con la ayuda de la M. en C. Laura Margarita Márquez Valdelamar y la M. en C. Nelly López Ortiz.

Agradezco al Herbario Nacional de México (MEXU), y a su curador Dr. David Gernandt, por las facilidades brindadas por el acceso a las colecciones; a la M. en C. María del Rosario García Peña por facilitar el trámite de los préstamos a los herbarios externos, al la Dra. Angélica Ramírez Roa por su apoyo en la digitalización de los ejemplares de herbario. Agradezco al Inventario Nacional Forestal y de Suelos (INF), y a su responsable el Dr. Matin Ricker, por haber facilitado las muestras de esta colección.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUCCIÓN	3
1.1 El género <i>Dalbergia</i> , un conjunto de especies amenazadas	3
1.1.1 Problemática de las maderas duras tropicales	3
1.1.2 Taxonomía e historia natural del género <i>Dalbergia</i>	5
1.1.3 Clado <i>Dalbergiae</i>	6
1.1.4 Género <i>Dalbergia</i>	7
1.1.4.1 Diagnósis	8
1.1.4.2 Distribución, hábitat y fenología	9
1.1.5 México y América Central un centro de diversidad	10
1.1.6 Clado <i>Dalbergia congestiflora</i>	13
1.2 La especie como unidad biológica	14
1.3 Delimitación de especies basada en secuencias	17
1.3.1 Códigos de barra genéticos	18
1.3.2 Uso de distancias <i>versus</i> uso de árboles	19
1.3.3 Generalización del modelo Yule-Coalescente (GMYC)	20
1.3.4 Proceso de Árbol de Poisson (PTP)	20
1.3.5 Detección Automática de discontinuidades en códigos de barras (ABGD)	21
1.3.6 Ensamble de especies por subdivisión automática (ASAP)	22
2 MOLECULAR SPECIES DELIMITATION IN THE <i>DALBERGIA CONGESTIFLORA</i> (PAPILIONOIDEAE) CLADE REVEALS REGIONAL ENDEMISM AND CRYPTIC DIVERSITY	23
2.1 Abstract	23
2.1.1 Premise	23

Tabla de contenido

2.1.2	Methods	24
2.1.3	Results	24
2.1.4	Conclusions	24
2.2	Key words	24
2.3	Introduction	24
2.4	Methods	28
2.4.1	Species sampling	28
2.4.2	DNA extraction and sequencing	28
2.4.3	Phylogenetic analysis	29
2.4.4	Species delimitation	30
2.5	Results	31
2.5.1	Sequences analysis	31
2.5.2	Phylogenetic analysis	31
2.5.3	Species delimitation	32
2.6	Discussion	34
2.6.1	Phylogenetic relationships of the <i>Dalbergia congestiflora</i> clade	34
2.6.2	Evolutionary trends in the <i>Dalbergia congestiflora</i> clade	36
2.6.3	Limitations of the morphology and taxonomic implications	39
2.7	Conclusions	40
2.8	Acknowledgments	41
2.9	Authors Contributions	41
2.10	Conflict of interest	41
2.11	Data availability	41
2.12	References	42
3	DISCUSIÓN GENERAL	52
3.1	Utilidad y eficiencia de los marcadores seleccionados	52
3.2	Limitaciones de la morfología en la discriminación de especies del género <i>Dalbergia</i>	53
3.3	Relaciones filogenéticas	54
3.4	Historia evolutiva del clado <i>Dalbergia congestiflora</i>	55
4	CONCLUSIONES	60
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

RESUMEN

El género *Dalbergia* L. f. agrupa a 275 especies leñosas que habitan en los trópicos de todo el mundo; su taxonomía es compleja y actualmente no existe un tratado taxonómico de todo el género en su conjunto, además muchas de sus especies han sido descritas recientemente. Las especies de este género se encuentran en riesgo de extinción, debido a la tala y tráfico internacional. El propósito de este trabajo fue realizar una delimitación *de novo*, con marcadores moleculares de las especies del clado *D. congestiflora*, el cual es el linaje del género *Dalbergia* más diverso en México y América Central. Nuestros resultados muestran que la región completa del *ITS* es capaz de discriminar entre las especies de este clado. En este trabajo se reportan un mayor número de especies candidatas que las quince que actualmente se reconocen con base en la morfología. Una de las especies candidatas es un taxón totalmente nuevo y a su vez se discute la validez de una de las morfoespecies reconocidas. Dos de las especies candidatas tienen una distribución geográfica amplia, mientras que el resto son endémicas o microendémicas. A partir de nuestros resultados inferimos que el clado se ha diversificado en la región a través de cambios de hábitat, proponemos que el ambiente ancestral de estas especies es el bosque tropical estacionalmente seco pero actualmente habitan ambientes más húmedos, los bosques tropicales lluviosos y el bosque húmedo de montaña.

ABSTRACT

The genus *Dalbergia* L. f. groups 275 woody species that inhabit the tropics around the world; its taxonomy is complex and there is currently no taxonomic treatment of the entire genus as a whole, and many of its species have been recently described. The species of this genus are at risk of extinction due to logging and international trafficking. The purpose of this work was to perform a de novo delimitation, with molecular markers of the species of the *D. congestiflora* clade, which is the most diverse lineage of the genus *Dalbergia* in Mexico and Central America. Our results show that the full *ITS* region is able to discriminate between the species of this clade. In this work we report a greater number of candidate species than the fifteen currently recognized based on morphology. One of the candidate species is a completely new taxon and the validity of one of the recognized morphospecies is discussed. Two of the candidate species have a wide geographic distribution, while the rest are endemic or microendemic. From our results we infer that the clade has diversified in the region through habitat changes, we propose that the ancestral environment of these species is the seasonally dry tropical forest but currently they inhabit more humid environments, tropical rainforests and montane rainforest.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 EL GÉNERO *DALBERGIA*, UN CONJUNTO DE ESPECIES AMENAZADAS

1.1.1 PROBLEMÁTICA DE LAS MADERAS DURAS TROPICALES

Hoy en día casi nadie cuestiona la gran importancia que tienen los ecosistemas tropicales, no solamente por sus altos niveles de diversidad biológica (Antonelli & Sanmartín, 2011), sino también por su papel como almacenes de carbono y por su efecto en la regulación global del clima (Bonan, 2008). Estos ecosistemas se encuentran entre los más amenazados actualmente, tan sólo en los trópicos se concentra un 32% de la cobertura forestal perdida a nivel global, y es el único ecosistema donde la tasa de pérdida se incrementa cada año (Hansen et al., 2013). De continuar esta tendencia, varias de las regiones tropicales consideradas como megadiversas (“biodiversity hotspots”) perderán en el futuro un gran número de sus especies (Brooks et al., 2002; Myers et al., 2000).

La tala selectiva de especies con valor forestal constituye una amenaza para los bosques tropicales, esta actividad es aparentemente menos destructiva si se le compara con la ganadería o la agricultura. Sin embargo, en los trópicos la densidad de individuos por hectárea para la mayoría de las especies arbóreas es muy baja, por lo tanto, su explotación aún siendo selectiva, requiere explorar continuamente nuevos territorios. Lo que acarrea la necesidad de abrir nuevas vías de acceso para el transporte de la madera, por lo que en última instancia esta actividad es tan solo la punta de lanza aprovechamientos más perjudiciales (Barrett et al., 2010).

Gran parte del aprovechamiento de los recursos forestales en los trópicos se ha centrado en las denominadas maderas preciosas, esta clase de madera posee un conjunto de atributos que las hacen deseables, por ejemplo, su apariencia, sus propiedades mecánicas, sus

1 Introducción

cualidades acústicas, sus usos en rituales o sus usos medicinales (Jenkins et al., 2012). Si a lo anterior, le añadimos que normalmente el inventario de esta clase de madera es limitado, se tiene el incentivo para que su precio en el mercado sea elevado, el cual es mucho mayor que para otros tipos de madera. La disponibilidad de esta madera depende de características intrínsecas de las especies de las que provienen, tales como, su distribución geográfica restringida, su rareza ecológica, su baja eficiencia reproductiva y su lenta tasa de crecimiento (Jenkins et al., 2012).

Entre las maderas preciosas cuya demanda se ha incrementado en tiempos recientes, se encuentran los denominados palo de rosa o “rosewood” por su nombre inglés. El tamaño del intercambio comercial de esta clase de madera se estima que alcanza los 90 millones de metros cúbicos al año, lo cual representa un problema, porque la mayor parte del volumen que se comercializa procede de la extracción directa de las poblaciones naturales, lo que constituye un aprovechamiento que no es sostenible en el tiempo (de Camino & Morales, 2013). La presión comercial para obtener esta madera fomenta la tala de las especies de las que procede y coloca a estas especies bajo un elevado riesgo de extinción (Jenkins et al., 2012), a esto se suma el hecho de que continuamente se explotan nuevas especies en sustitución de aquellas cuyos inventarios son cada vez más limitados (Braga de Oliveira et al., 1971).

Con esta dinámica de extracción llegaremos a una situación de crisis en el mercado de las maderas duras tropicales, cuya única manera de afrontar es mediante el establecimiento de plantaciones o bien con la implementación de planes de manejo para la explotación controlada de los bosques (de Camino & Morales, 2013). Ambas situaciones representan enormes retos, en el primer caso porque las plantaciones de especies tropicales, a diferencia de aquellas de climas templados, no se han logrado establecer de manera extensiva; y cuando lo han hecho, la madera obtenida de este modo no tiene la calidad requerida por el mercado (Jenkins et al., 2012). En el segundo, por las complejidades administrativas y técnicas que implica manejar el bosque de manera sustentable.

Las especies del género *Dalbergia* L. f., están entre las leguminosas que más se han visto amenazadas por la sobreexplotación, su comercio ilícito en los mercados internacionales es tan elevado que el valor de las incautaciones globales de su madera supera por mucho al valor combinado de los decomisos de marfil, cuernos de rinoceronte y grandes felinos (Zhu, 2020). Esta madera ha sido objeto de comercio internacional por más de 300 años, debido a que es requerida para trabajos de ebanistería y la elaboración de muebles finos (Richter et al., 1996), pero sólo en tiempos recientes su aprovechamiento representa un

problema, puesto que en las últimas dos décadas el volumen que se comercializa se ha incrementado exponencialmente (Zhu, 2020).

Varias especies del género *Dalbergia* poseen madera que se encuentra entre las más cotizadas en el mercado, entre ellas podemos mencionar a *D. nigra* (“Jacarandá do Brasil”) de Brasil, *D. latifolia* Roxb. (“Black rosewood”) y *D. sisso* Roxb. ex DC. (“Indian rosewood”) de India e Indonesia, *D. melanoxylon* Guill. & Perr. (“African blackwood”) de África, *D. odorifera* T.C. Chen (“Fragrant rosewood”) de China, *D. retusa* Hemsl. (Cocobolo) y *D. stevensonii* Standl. (“Honduras rosewood”) de México y América Central (Cervantes-Maldonado, 2006; Qin et al., 2020; Richter et al., 1996).

1.1.2 TAXONOMÍA E HISTORIA NATURAL DEL GÉNERO *DALBERGIA*

Como en muchos grupos de plantas con flores, la taxonomía de las leguminosas se ha apoyado tradicionalmente en la morfología, en particular en los caracteres de las estructuras de la flor y el fruto. Pero con el advenimiento de numerosos estudios filogenéticos basados en caracteres moleculares, la taxonomía de esta familia se ha modificado substancialmente. El consenso actual, es que la concepción tradicional de tres subfamilias: Caesalpinioideae, Mimosoideae y Papilionoideae, no refleja adecuadamente las relaciones filogenéticas en esta familia (LPWG, 2013).

La subfamilia Papilionoideae, es de entre las tres subfamilias tradicionales en Leguminosas, la única que actualmente se considera como monofilética, no obstante a su interior se han realizado numerosos cambios taxonómicos (Cardoso et al., 2013). En esta subfamilia se agrupan cerca de 14,000 especies, por lo que es una de las más grandes dentro de las leguminosas (LWPG, 2017). Esta es la subfamilia que más se ha diversificado, lo que la ha llevado a habitar en una amplia gama de condiciones ecológicas en regiones tropicales y templadas de todo el mundo (Lavin et al., 2005).

La característica más distintiva de la subfamilia Papilionoideae es la presencia de una flor altamente especializada, de marcada simetría bilateral, que posee cinco pétalos claramente diferenciados, dos conforman la quilla, dos corresponden a las alas y uno más es el pétalo estandarte, todos ellos, en conjunto con estambres parcialmente fusionados envuelven al ovario. Este arreglo estructural, le confiere una arquitectura tridimensional que limita el acceso al polen y al néctar, por lo cual se piensa es una característica que ha sido seleccionada por su íntima relación con sus polinizadores (Arroyo, 1981).

1.1.3 CLADO *DALBERGIAE*

El término *Dalbergiae* fue acuñado por Bentham (1860) para designar a una tribu de árboles tropicales que presentan partes florales fusionadas y vainas indehiscentes; en esta tribu, él reconoció tres subtribus *Pterocarpeae* que se caracteriza por tener frutos tipo sámara, *Lonchocharpeae* cuyas vainas tienen pequeñas alas marginales y *Geoffroyeae* que posee frutos en forma de drupa. Posteriormente, Polhill (1981) con base en caracteres anatómicos y químicos de la madera, estableció a *Dalbergiae* como tribu, en ella agrupó a 19 géneros de especies leñosas tropicales, correspondientes a las subtribus *Pterocarpeae* y *Geoffroyeae* de Bentham, mientras que *Lonchocarpinae* fue segregada y asociada al grupo de leguminosas que acumulan aminoácidos no proteicos en sus semillas. Por su parte, Sousa y de Sousa (1981) seguían manteniendo el punto de vista de Bentham puesto que *Dalbergiae* (sensu Polhill) y *Lonchocarpinae* comparten la presencia de inflorescencias determinadas.

Uno de los mayores rearrreglos en la taxonomía de leguminosas es el reconocimiento del clado Dalbergioides como monofilético, su hallazgo fue inesperado porque las relaciones entre sus miembros no habían sido intuitas morfológicamente y los géneros que lo conforman estaban segregados en varias tribus. El clado fue identificado inicialmente por Doyle et al. (1997) con un análisis filogenético basado en secuencias del gen *rbcL* y del intrón del gen *trnL*, pero fueron Lavin et al. (2001) quienes lo reconocieron y lo nombraron, en su estudio que combinó secuencias de ADN y caracteres morfológicos. Este clado ha sido resuelto consistentemente como monofilético análisis filogenéticos posteriores (Cardoso et al., 2013; Kajita et al., 2001; Wojciechowski et al., 2004).

Por su parte, Cardoso et al. (2013) reconocieron al clado *Dalbergiae* como el equivalente del clado Dalbergioides *sensu* Lavin, mientras que reservaron el nombre Dalbergioides *sensu lato* para agrupar sus clados *Dalbergiae* y *Amorphae*. En el clado *Dalbergiae* incluyeron a todos los géneros de las tribus *Aeschynomeneae* y *Adesmieae*, únicamente a la subtribu *Brynae* de *Desmodieae* y la mayoría de los géneros de la tribu *Dalbergiae*, excepto *Andira* Lam., *Hymenolobium* Benth., *Vatairea* Aubl. y *Vataireopsis* Ducke. En años recientes se han agregado tres géneros más al clado, *Acosmium* Schott (Cardoso et al., 2012), *Maraniona* C.E. Hughes, G.P. Lewis, Daza & Reynel (Hughes et al., 2004) y *Steinbachiella* Harms (Lewis et al., 2012), por lo que en la actualidad *Dalbergiae* agrupa a 47 géneros.

El clado *Dalbergiae sensu* Cardoso et al. (2013), es un grupo pantropical con alrededor de 1367 especies, donde más del 60% de ellas pertenecen a sólo cuatro grandes géneros, *Adesmia* D.C., *Aeschynomene* L., *Dalbergia* L.f. y *Machaerium* Pers. El clado *Dalbergiae* es de los pocos en Leguminosas que además de estar delimitado por caracteres genéticos, sus especies comparten una sinapomorfía morfológica (Lavin et al., 2001; LPWG, 2013); la cual es la presencia de nódulos fijadores de nitrógeno de tipo *Aeschynomeneae*, los cuales se caracterizan por su tamaño pequeño, su crecimiento determinado y su forma oblata (Sprent et al., 2017).

En el clado *Dalbergiae* consistentemente se reconocen tres linajes, los cuales están relacionados a los géneros *Adesmia* DC., *Dalbergia* L. f. y *Pterocarpus* Jacq. (Cardoso et al., 2013); estos linajes se consideran crípticos porque están diferenciados genéticamente, pero difícilmente se reconocen con base en otro tipo de caracteres (Lavin et al., 2001).

1.1.4 GÉNERO *DALBERGIA*

El género *Dalbergia* L.f. (Fabaceae: Papilionoideae) cuenta con 275 especies (Cowell et al., 2022), aunque su número exacto se desconoce, porque no existe un estudio monográfico que lo comprenda en su totalidad. Rzedowski y Guridi-Gómez (1988) señalan que es un hecho desafortunado que siendo un grupo tan diverso, no haya sido revisado desde los tiempos de Bentham, propósito que es difícil de cumplir porque el conocimiento que tenemos para muchas de sus especies es aún muy limitado, y en la actualidad no hemos logrado documentar la magnitud de su variabilidad morfológica, su distribución geográfica o sus afinidades ecológicas.

El género *Dalbergia* consistentemente se resuelve como monofilético en diversos estudios filogenéticos realizados con marcadores moleculares y en todos ellos tiene por grupo hermano al clado que conforman los géneros *Machaerium* Pers. y *Ctenodon* Baill. (Cardoso et al., 2020; Lavin et al., 2001; Ribeiro et al., 2007). El primer estudio enfocado en resolver las relaciones al interior del género *Dalbergia* fue el realizado por Vatanparast et al. (2013), en él incluyeron a 67 especies representativas de su área de distribución; estos autores reportan que únicamente tres de las secciones propuestas para este género son monofiléticas, la sección *Triptolemea*, que posee inflorescencias cimosas y vainas tipo sámara, la sección *Ecastaphyllum*, de inflorescencias racemosas y frutos orbiculares, y la sección *Dalbergaria*, que posee el pétalo estandarte reflexo y dos grupos de cinco estambres; del mismo modo, reportan por primera vez la incongruencia entre la filogenia

y la geografía en el género *Dalbergia*, pues este se divide en 5 grandes clados de los cuales sólo el más basal contiene a especies de América del Sur, pero el resto presenta una intrincada mezcla de especies de dos o más continentes.

Los autores del estudio previo proponen el origen del género *Dalbergia* en América del sur y la dispersión transoceánica a larga distancia como el mecanismo que mejor explica la distribución actual de sus especies. Estudios posteriores, que incluyen un muestreo más amplio de especies del género *Dalbergia* y que además estimaron los tiempos de divergencia de sus linajes, hallaron que el género se originó en América del sur a inicio del Mioceno entre los 19.9 y los 25.9 millones de años en el pasado (Rahaingoson et al., 2022; Sotuyo et al., 2022).

En México y América Central, las especies del género *Dalbergia* no conforman un grupo monofilético, en esta región Sotuyo et al. (2022) reconocieron cuatro clados distintos, los cuales son más afines a clados de otros continentes que entre sí; dos de estos clados, agrupan a especies lianoides y están asociados a las especies *D. glabra* (Mill.) Standl. y *D. ecastaphyllum* (L.) Taub., mientras que los otros dos agrupan a especies arbóreas o arbustivas, y están asociadas a las especies *D. glomerata* Hemsl. y *D. granadillo* Pittier.

1.1.4.1 DIAGNOSIS

L.f, Suppl. Pl.:52.1781

Árboles, arbustos, arbustos escandentes o lianas. Hojas alternas, imparipinnadas; estípulas varias, con frecuencia pequeñas y caducas; estipelas ausentes; folíolos cartáceos a coriáceos, alternos. Flores pequeñas terminales y/o panículas laterales; brácteas y bracteolas usualmente pequeñas y caducas. Cáliz campanulado, 5-lobado. Corola más o menos exserta, blanca, amarilla o púrpura o violeta, frecuentemente fragante; estandarte orbicular, obovado a oblongo, con uña bien desarrollada; alas libres, oblongas, estrecho o auriculadas en la base de la lámina; estambres 9-10, monadelfo o diadelfo, en la parte superior algunas veces en dos paquetes laterales de 5, o solo el vexilar libre; anteras pequeñas, erectas, uniformes, basifijas, usualmente gemelos rara vez solitarios, con apertura en el ápice. Ovario estipitado, pocos óvulos; Estilo corto, usualmente incurvado; estigma pequeño. Vainas usualmente delgadas, indehiscentes, oblongas o en forma de correa, claramente engrosadas y con la reticulación más densa sobre la cámara seminal, raramente delgadas en su totalidad. Semillas reniformes (Niyomdham, 2002).

1.1.4.2 DISTRIBUCIÓN, HÁBITAT Y FENOLOGÍA

El género *Dalbergia* es de distribución pantropical, se compone por especies leñosas, de hábito generalmente arbóreo o arbustivo, aunque varias de ellas tienen hábito trepador y crecen como lianas o arbustos escandentes (Klitgaard & Lavin, 2005). Las especies del género *Dalbergia* habitan una amplia gama de asociaciones vegetales, tales como el bosque tropical perennifolio, bosque tropical subcaducifolio y caducifolio, bosques nubosos, sabanas tropicales y dunas costeras (de Carvalho, 1997; Hassold et al., 2016; Lavin et al., 2005).

Ocasionalmente se le puede encontrar en zonas de transición entre estos tipos de vegetación y bosques templados (Cervantes et al., 2019). Muchas de sus especies son endémicas y sólo se les conoce de una o muy pocas localidades (Adema et al., 2016; Cervantes et al., 2019; Linares & Sousa, 2007). Sus principales centros de diversificación son la Amazonia, Madagascar, el subcontinente Indio y el sudeste Asiático (Hassold et al., 2016; Ribeiro et al., 2007; Vatanparast et al., 2013). En Australia no existen especies nativas, pero *D. latifolia* Roxb. que fue introducida por el hombre, se ha adaptado con tanto éxito que se comporta como una maleza (Randall, 2007).

Las especies de *Dalbergia* se consideran heliófilas, y se les suele observar creciendo en zonas abiertas pero también se les encuentra en el subdosel del bosque (Cervantes et al., 2019), lo que sin duda se debe a la alta plasticidad fenotípica de sus hojas que les brinda la capacidad de adaptarse a distintos ambientes (Moreira et al., 2013). Algunas especies se ven favorecidas por los disturbios y se les suele encontrar en lugares perturbados, e incluso el hombre las tolera en cercos vivos y en huertos familiares (Rzedowski & Guridi-Gómez, 1988; Suárez-Islas et al., 2020), o como árbol de sombra en cafetales (obs. pers.).

La floración ocurre durante un corto periodo del año, un poco antes acontece una pérdida total del follaje, algunas especies están totalmente desprovistas de hojas durante la floración mientras que otras apenas presentan brotes incipientes (Martínez-Peralta et al., 2022; Rzedowski & Guridi-Gómez, 1988), esta fenología se presenta incluso en especies que habitan en lugares donde la disponibilidad del agua no es limitante (obs. pers.). En el género *Dalbergia* la principal vía de reproducción es la sexual mediante la producción de semillas, estas son intermedias entre ortodoxas y recalcitrantes (Knoblauch, 2001), con una elevada tasa de germinación bajo condiciones de laboratorio, pero se estima que la tasa de reclutamiento de las plántulas en el campo es baja (Regnier, 2019; Seng & Cheong, 2020).

La propagación vegetativa también es posible en el género *Dalbergia*, este modo de reproducción se ha reportado en *D. cochinchinensis* Pierre y *D. oliveri* Gamble ex Prain a través del rebrote de la raíz (Hartvig et al., 2017), nosotros hemos observado que tocones talados de *D. granadillo* Pittier son capaces de rebrotar. El principal vehículo de dispersión en el género *Dalbergia* es el fruto (Ibarra-Manríquez et al., 2015), los cuales son sámaras que se asocian a la dispersión por viento, pero también existen frutos tipo drupa o núcula que son dispersados por agua (de Lima, 1989).

1.1.5 MÉXICO Y AMÉRICA CENTRAL UN CENTRO DE DIVERSIDAD

En el continente Americano, el género *Dalbergia* cuenta con dos centros de diversidad, uno es América del Sur mientras que el otro corresponde a México y América Central. No conocemos el número exacto de especies que habitan en América del Sur, pero tan solo para Brasil se han reportado 41 taxa, que corresponden 39 especies y 2 variedades (de Carvalho, 1997); por otra parte, para México y América Central se han registrado 27 taxa, los que corresponden a 26 especies y una subespecie (Linares & Sousa, 2007). De las especies que habitan en México cinco son endémicas (Cervantes et al., 2019).

Al día de hoy, no existe ningún trabajo que haya explorado las afinidades morfológicas entre las especies de México y América Central, pero sabemos que Rudd (1995) conjeturó 4 grupos, sin embargo no los formalizó (Richter et al., 1996). En un primer grupo, reconoció la afinidad entre *Dalbergia retusa*, *D. hypoleuca*, *D. granadillo*, *D. lineata*, con la probable inclusión de *D. cuscatlanica* y *D. pacifica*; en el segundo, agrupó a *D. tucurensis* (= *D. cubilquitzensis*), *D. melanocardium*, *D. glomerata*, *D. congestiflora* (= *D. funera*) y probablemente *D. stevensonii*; el tercer grupo incluyó a *D. calycina* y *D. intibucana*; mientras que reservó el cuarto grupo para *D. brownei*. Actualmente no todas estas especies se consideran válidas, varias se han reconocido como sinónimos, por ejemplo *D. lineata*, *D. pacifica* y *D. cuscatlanica* se reconocen ahora como sinónimo de *D. retusa*, por su parte *D. intibucana* es sinónimo de *D. calycina*, mientras que *D. funera* es ahora *D. calderonii*, finalmente se considera que *D. cubilquitzensis* y *D. tucurensis* son especies distintas.

El estudio más exhaustivo hasta la fecha que explora las relaciones filogenéticas entre las especies del género *Dalbergia* de México y América Central, es el publicado por Sotuyo et al. (2022). En este trabajo se corroboró que las especies de esta región no conforman un grupo monofilético, por el contrario se reconocieron cuatro clados distintos. Dos de

1 Introducción

los clados reconocidos agrupan a especies de hábito lianoide, uno de ellos está asociado a *D. ecastaphyllum* que agrupa a dos especies, y el otro a *D. glabra* con cuatro especies, los otros dos clados corresponde a especies arbóreas o arbustivas, el relacionado a *D. granadillo* incluye a tres especies, mientras que el relativo a *D. glomerata* cuenta con 12 especies.

Estos resultados corroboraron en cierto modo la validez de los grupos previstos por Rudd, con la excepción de que ella separa a las especies del clado *D. granadillo* en dos grupos, en uno de ellos segrega a *D. calycina* del resto, lo cual puede entenderse porque esta es la especie más divergente de este clado; por otra parte de las especies de hábito liana solo menciona *D. brownei* por lo cual no conocemos su opinión respecto a las otras especies. El listado de las especies del género *Dalbergia* de México y América central se presenta en el cuadro 1.1, en él se indica para cada especie el clado genético al que corresponden sensu Sotuyo et al. (2022) y su hábito.

1 Introducción

Cuadro 1.1: Especies de *Dalbergia* para México y América Central, el clado genético al que pertenece cada especie esta anotado *sensu* Sotuyo et al. 2022. La especie *D. salvanaturae*, no ha sido incorporada a ningún estudio filogenético pero por sus afinidades morfológicas con *D. melanocardium* en este trabajo se considera como parte del clado *D. congestiflora*.

Clado	Especie	Hábito
congestiflora	<i>D. agudelo</i> J. Linares & M. Sousa	Árbol
	<i>D. calderonii</i> Standl.	Árbol
	<i>D. congestiflora</i> Pittier	Árbol o Arbusto
	<i>D. cubilquitzensis</i> (Donn. Sm.) Pittier	Árbol
	<i>D. glomerata</i> Hemsl.	Árbol
	<i>D. longepedunculata</i> J. Linares & M. Sousa	Árbol
	<i>D. luteola</i> J. Linares & M. Sousa	Árbol
	<i>D. melanocardium</i> Pittier	Árbol
	<i>D. modesta</i> J. Linares & M. Sousa	Árbol
	<i>D. palo-escrito</i> Rzed. & Guridi-Gómez	Árbol
	<i>D. rhachiflexa</i> J. Linares & M. Sousa	Árbol
	<i>D. ruddae</i> J. Linares & M. Sousa	Árbol
	<i>D. salvanaturae</i> J. Linares & M. Sousa	Árbol
	<i>D. stevensonii</i> Standl.	Árbol
	<i>D. tilarana</i> N. Zamora	Árbol
<i>D. tucurensis</i> Donn. Sm.	Árbol	
ecastaphyllum	<i>D. ecastaphyllum</i> (L.) Taub.	Liana
	<i>D. monetaria</i> L. f.	Liana
glabra	<i>D. brownei</i> (Jacq.) Schinz	Arbusto o Liana
	<i>D. chontalensis</i> Standl. & L.O. Williams	Árbol
	<i>D. glabra</i> (Mill.) Standl.	Liana
	<i>D. tabascana</i> Pittier	Liana
granadillo	<i>D. calycina</i> Benth.	Árbol
	<i>D. granadillo</i> Pittier	Árbol
	<i>D. retusa</i> Hemsl.	Árbol
desconocido	<i>D. darienensis</i> Rudd	Liana

1.1.6 CLADO *DALBERGIA CONGESTIFLORA*

El clado *Dalbergia congestiflora* es uno de los cuatro linajes que Sotuyo et al. (2022) encontraron para las especies del género *Dalbergia* en México y América Central, este clado cuenta con el mayor número de especies de este género en la región, actualmente agrupa a quince especies de hábito arbóreo y/o arbustivo. Fue nombrado originalmente clado *D. glomerata* porque los autores estimaron que era la especie de más amplia distribución, no obstante, es *D. congestiflora* quien posee esta característica, por ello en este trabajo usamos a esta última especie para referirnos al clado.

Todos los estudios filogenéticos que han incluido en su muestreo a alguna especie del clado *Dalbergia congestiflora*, reportan que tiene como grupo hermano a las especies de América del Sur de la sección *Triptolemea*, que incluye a especies como *D. cearensis*, *D. frutescens* y *D. variabilis*, entre otras (Ribeiro et al., 2007; Sotuyo et al., 2022; Vatanparast et al., 2013).

La sección *Triptolomea* fue propuesta por de Carvalho (1997) en su revisión del género *Dalbergia* para Brasil, quien la circunscribe por sus inflorescencias cimosas, generalmente grandes y planas en la parte superior, con racimos florales secundarios terminales; de frutos oblongos a oblongo-elípticos, samaroides, membranosos a submembranosos, con venación reticulada prominente sobre la cavidad seminal. Esta descripción bien puede aplicar a todas las especies del clado *D. congestiflora*, por lo cual es entendible que sean grupos hermanos.

Las especies del clado *Dalbergia congestiflora* habitan en tres de los cinco tipos de vegetación que Villaseñor & Ortiz (2014) establecieron para México, los cuales son el bosque húmedo de montaña, el bosque tropical estacionalmente seco y el bosque tropical húmedo. Pero también se les ha reportado en vegetación secundaria y zonas de transición entre los tipos de vegetación anteriores y bosques de pino-encino (Rzedowski & Guridi-Gómez, 1988).

De entre las especies de este clado, *Dalbergia stevensonii* (“Honduras rosewood”) y *D. tucurensis* (“Yucatan rosewood”) se explotan con fines de exportación (Wiemann & Ruffinatto, 2012), mientras que *D. congestiflora* y *D. palo-escrito* se usan localmente para la confección de guitarras (Pérez Olvera, 1993). Pero debido a su hábito arbóreo todas las especies de este clado son susceptibles de aprovechamiento forestal.

La especie que da nombre al clado *Dalbergia congestiflora*, es la que posee la mayor área de distribución, la podemos encontrar en la cuenca del Río Balsas y a largo de costa del Pacífico desde estado de Jalisco en México hasta El Salvador (Cervantes et al., 2019; Richter et al., 1996).

Algunas especies cuentan con una área de distribución regional, por ejemplo, *D. palo-escrito* se le conoce únicamente de los bosques de niebla de los estados de Hidalgo y Querétaro (Rzedowski & Guridi-Gómez, 1988); *D. glomerata* se restringe a la planicie costera del Golfo de México en los estados de Veracruz, Oaxaca y Chiapas (Cervantes et al., 2019); *D. stevensonii* habita sólo en las selvas altas de Chiapas, Guatemala y Belice; *D. cubilquitzensis* y *D. tucurensis*, especies que algunos autores consideran como sinónimos (Standley, 1946), se han reportado de Chiapas a Honduras (Cervantes et al., 2019; Knoblauch, 2001).

El resto de las especies tiene un área de distribución aún más restringida, algunas de ellas solo las conocemos de sus localidades tipo, o de poblaciones bastantes cercanas a ella, tal es el caso de *Dalbergia luteola*, *D. modesta*, *D. rachyflexa* y *D. ruddiae*.

1.2 LA ESPECIE COMO UNIDAD BIOLÓGICA

En un intento de entender a la diversidad biológica, los biólogos las agrupamos en unidades más o menos discretas, de entre todas ellas, la especie es considerada una unidad fundamental en la biología (Barraclough & Humphreys, 2015; Hausdorf, 2011). A pesar de ello, hoy en día no podemos definir con exactitud lo que una especie es, lo cual no ha impedido que podamos discutir acerca de ellas con regularidad, pero es cierto que lo hacemos sin hacer referencia explícita a lo que entendemos por especie (Hey, 2006).

Actualmente, existen en la comunidad científica muchos conceptos de especie, pero ninguno de ellos cuenta con el consenso suficiente como para ser considerado el definitivo. Esta incapacidad de tener una visión unificada respecto al concepto de especie se conoce como el problema de la especie y es un problema clásico en la Biología (Valencia-Ávalos, 1991). Trabajar con esta pluralidad de conceptos no representa problema alguno, porque por lo general cada investigador elige aquel que a su criterio es el más adecuado a su grupo de estudio o los objetivos de su trabajo (de Queiroz, 2005). Lo que sí es claro, es que, estudios en ecología, evolución, conservación y muchas otras disciplinas requieren que podamos delimitar de manera clara y consistente a las especies (Shanker et al., 2017).

1 Introducción

El debate moderno respecto al concepto de especie se inició con Ernest Mayr (1942), en su libro *Systematics and the Origin of the Species* hace un recuento de cómo el concepto de especie había cambiado a lo largo del tiempo, así mismo, nombra y eleva a la categoría de conceptos distintas aproximaciones que venían utilizándose para la identificación de las especies, pero sobre todo hace hincapié en la necesidad de un nuevo concepto de especie.

Al hacer esto Mayr introdujo un cambio semántico, en el que los procedimientos para identificar a las especies fueron elevados a conceptos, lo condujo a un gran debate respecto al concepto de especie; gran parte de la discusión actual, como por ejemplo la controversia de monismo versus pluralismo, es sólo es una consecuencia innecesaria de tratar a los criterios de identificación de las especies como si fuesen conceptos fundamentales; antes de Mayr se asumía que las distintas definiciones de especies hacían referencia a una misma realidad biológica, después de él, el concepto mismo de especie es lo que está sujeto a debate, generando con ello una amplia gama de nuevos conceptos (Hey, 2006).

Por otra parte, Dobzhansky (1935) dejó constancia de ello en su obra *A critique of the Species Concept in Biology* al señalar:

El concepto de especie, es uno de los más viejos y más fundamentales en biología. Y aún así es casi universalmente admitido que no se ha propuesto una definición satisfactoria de lo que constituye una especie.

En estas palabras Dobzhansky ve a la especie como algo mayor que cualquier definición del término, no reconoce que existen distintos conceptos de especie, únicamente existe un debate respecto a lo que constituye la especie (Hey, 2006). De este modo, él nos muestra el consenso que existía en el momento de la síntesis moderna, donde las especies se reconocían como reales pero había una amplia gama de opiniones respecto a lo que esto podía significar (Wilkins, 2009).

Como efecto del planteamiento de Mayr y de los distintos conceptos de especie que surgieron en consecuencia, se propuso que había que adoptar algún tipo de vista pluralista sobre las especies, motivado principalmente por el hecho de que los conceptos de especie propuestos no eran aplicables a todas las situaciones. En cierto sentido, mucho del debate se centró en los mecanismos para identificar a las especies y muy poco en las ideas teóricas respecto a lo que las especies representan y a lo que causa su existencia (Hey, 2006).

Una de las primeras reacciones a las ideas de Mayr provino de Simpson, quien consideró a las especies como linajes que evolucionan separadamente unos de otros, y que mantienen su propia tendencia y papel evolutivo; al hacer esto Simpson antepone el criterio evolutivo

para concebir a las especies, él mismo no lo nombró así, pero su propuesta sería conocida más adelante como el concepto evolutivo de especie (Wiley, 1978).

Para una revisión histórica de los numerosos conceptos de especie referimos al trabajo de Wilkins (2009), quien revisó las distintas ideas que fueron propuestas como concepto de especie y analizó cómo cada una de ellas respondía a las necesidades de la época en la que se plantearon. Para este autor las distintas concepciones de especie pueden agruparse en unas pocas categorías, según hagan énfasis en el aislamiento reproductivo, el aspecto ecológico, el evolutivo o el filogenético; aunque reconoció que algunos conceptos no encajaban en las categorías anteriores.

En la actualidad, existen varios intentos para llegar a un entendimiento unificado respecto del concepto de especie, pero solo dos han logrado fomentar el debate en tiempos recientes, estos son el concepto unificado de especie de Kevin de Queiroz (2005) y la jerarquía de conceptos de especie de Richard L. Mayden (1997), a continuación revisaremos los planteamientos de ambos.

Para Mayden (1997), la raíz del problema es que intentamos conjuntar criterios tan distintos en un único concepto, concepciones teóricas *versus* aplicaciones prácticas; él cree que se puede evitar este problema si se piensa en un esquema jerárquico donde cada concepto se evalúe de acuerdo a su capacidad de unir, o conciliar, a los distintos conceptos existentes; para él, el concepto teórico de especie evolutiva es el único capaz de conciliar al resto de los conceptos existentes y al mismo tiempo explicar los hechos observados.

Mayden afirma que el resto de los conceptos falla en su capacidad de abarcar a gran parte de la diversidad existente porque se basan en muy pocos criterios, los que generalmente son bastantes restrictivos, por lo que con frecuencia son incompatibles entre sí; él nombra a estos conceptos como operativos y reconoce su utilidad para identificar y delimitar a la diversidad biológica en contextos específicos. De este modo, él establece una jerarquía de conceptos, donde el concepto evolutivo de especie es el primario mientras que todos los demás son secundarios.

De manera similar, de Queiroz (2007) realiza una revisión de los conceptos de especie existentes y concluye que las diferencias entre ellas no son absolutas, él afirma que los conceptos modernos de especie están de acuerdo en lo esencial, que de manera implícita o explícita reconocen a las especies como segmentos de linajes en el nivel poblacional de la organización biológica; para este autor, los requerimientos impuestos por los distintos conceptos de especie, tales como el aislamiento reproductivo, la monofilia, la diagnosti-

cabilidad o cualquier otro, no son más que propiedades secundarias cuya única utilidad es proporcionar la evidencia necesaria para establecer la separación de los linajes.

Con razonamientos distintos y de manera independiente ambos autores llegan a la conclusión que los conceptos de especie tienen serias fallas de lógica porque no establecen una clara distinción entre conceptualización y delimitación de las especies; cada uno de estos autores, revisó e integró los distintos conceptos de especie en su propio marco teórico, los cuales no son diferentes entre sí y son sólo una versión revisada del concepto evolutivo de especie propuesto previamente por Wiley (1978); la diferencia entre ambos es en la forma en la que integran a los distintos conceptos de especie existentes, aunque los dos están de acuerdo en diferenciar entre el concepto de especie de los criterios operativos que podemos utilizar para distinguir a las especies (Naomi, 2011).

1.3 DELIMITACIÓN DE ESPECIES BASADA EN SECUENCIAS

Cada vez existe más consenso de que una delimitación fidedigna de las especies necesariamente implica el contraste de distintas fuentes de información. Esta tendencia se ha denominado taxonomía integrativa (*“Integrative Taxonomy”*) y su principal tesis es que la correcta delimitación de las unidades de la diversidad biológica requiere del uso de múltiples y complementarias fuentes de información (Dayrat 2005). La taxonomía con enfoque integrador aboga por comparar y contrastar información tan diversa como la morfológica, la genética, la ecológica y la del desarrollo ontogenético, entre otras.

Sin duda, tales estudios meticulosos y exhaustivos son deseables, más no siempre son posibles y/o prácticos, en estos casos es necesario contar con metodologías que nos permitan obtener de forma rápida de unidades de comparación. Esto ha llevado al reconocimiento de categorías que no requieren de una descripción precisa, tales como las Unidades Taxonómicas Operativas Moleculares o Unidades Taxonómicas Reconocibles, estas son entidades no tenemos claro qué representan y en qué casos pueden corresponderse con las especies (Kapli et al., 2017).

Con los avances en la teoría y los métodos de coalescencia, así como una mayor disponibilidad de las técnicas de secuenciación, cada vez es más frecuente el uso de información genética como fuente de evidencia primaria para la delimitación de las especies, en este caso el uso de múltiples loci y el empleo de métodos coalescentes es siempre deseable. En particular por el hecho de que la historia evolutiva de un único gen no necesariamente se

corresponde con la historia evolutiva de las especies, sólo recordemos que los árboles de genes no necesariamente tienen correspondencia con los árboles de las especies. A pesar de ello, aún es común el uso de uno o unos pocos loci, la mayoría de las veces concatenados, para realizar estudios de delimitación de especies, y no queda duda que aún son una herramienta útil.

En los próximos párrafos se realizará una revisión de los distintos métodos propuestos para la delimitación de las especies a partir de información molecular. Iniciando por una descripción de los códigos de barras genéticos, porque aunque en un sentido estricto no son un método de delimitación de especies, su aporte es fundamental en el desarrollo de esta historia.

1.3.1 CÓDIGOS DE BARRA GENÉTICOS

Cuando queremos incrementar nuestro conocimiento de la diversidad biológica mediante el uso de marcadores moleculares, en general tenemos dos estrategias. La primera es la secuenciación de un único locus en cientos o miles de individuos, esto nos permite un inventario rápido de la diversidad al contrastarse contra bases de datos de secuencias pre-existentes, pero también tiene el potencial de descubrir nuevas taxas. El segundo enfoque, es el estudio exhaustivo de uno o pocos individuos a nivel genómico, con el muestreo de miles de loci, esta estrategia es útil cuando se desea estudiar de forma detallada una taxa que previamente conocemos (Talavera et al., 2013).

Como ejemplo de la primera estrategia podemos mencionar las iniciativas en código de barras genéticos, que no son más que una asociación no ambigua entre secuencias específicas de loci estandarizados con las especies a las que pertenecen (Hebert & Gregory, 2005). Este tipo de estudio son cada vez más frecuentes, dada su facilidad de implementación y por su potencial para ser automatizados. La mayoría de ellos se han centrado en tres aspectos: 1) validar la técnica en taxas específicas, 2) identificar los marcadores correctos y 3) poner a prueba hipótesis taxonómicas de grupos conocidos (Hebert & Gregory, 2005; Puillandre et al., 2012). Quizá la aplicación más práctica de estas técnicas, es que nos permite identificar especies en circunstancias que de otro modo no sería posible, como cuando se dispone de muy poco material o éste se encuentra incompleto y no cuenta con atributos necesarios para su correcta determinación.

Algunos de estos estudios han revelado la presencia de linajes crípticos, es decir, que no están diferenciadas morfológicamente pero sí a nivel genético. Sin embargo, estos procedimientos no están exentos de obstáculos de implementación, como el haber seleccionado los loci adecuados o que el nivel de variación que exista entre las especies nos permita discriminar entre ellas (Pons et al., 2006). La mayoría de las veces nos enfrentamos a situaciones de ensayo y error al tratar de elegir los marcadores adecuados para el grupo de nuestro interés.

En el género *Dalbergia*, Hartvig et al. (2015) ensayaron esta técnica en 95 accesiones de 31 especies, con las regiones *rbcL*, *matK* e *ITS* y concluyeron que la combinación de *matK* + *rbcL* era la más efectiva para distinguir entre las especies. Por su parte, Yu et al. (2017), exploraron ocho loci distintos en nueve especies y recomendaron la combinación de *ITS* + *trnH* para el mismo objetivo de identificar a las especies. Estos estudios suelen ser una adecuada estrategia cuando las especies son distantes pero su efectividad ha sido puesta en duda cuando se trata de especies cercanamente relacionadas (Qin et al., 2020). También se ha criticado que muchos de estos estudios se hayan realizado con un muestreo limitado de accesiones por especie, sin un muestreo previo de la variabilidad al interior de las especies para tener la certeza de que los marcadores seleccionados son los adecuados.

1.3.2 USO DE DISTANCIAS *VERSUS* USO DE ÁRBOLES

La premisa fundamental de los distintos métodos de delimitación de especies, es poder clasificar de forma más o menos automatizada a las especies. En general podemos dividir a estos métodos en dos grandes categorías, la primera, aquellos que hacen uso de distancias genéticas entre las secuencias, pero que no toman en consideración las posibles relaciones evolutivas que puedan existir entre ellas. la segunda categoría, son aquellos métodos que consideran dichas relaciones, por lo cual normalmente operan a partir de un árbol filogenético.

Ambas estrategias tienen sus inconvenientes, por ejemplo, los métodos basados en distancias asignan una secuencia problema a un especie a partir de un umbral de similitud, pero ignoran que la profundidad a la coalescencia no es la misma para todos taxa, además de que el traslape de distancias en y entre especies también interfiere (Zou et al., 2011). Por su parte los métodos que emplean árboles, asignan una secuencia problema a una especie, con base en su membresía a un clado dentro de un árbol, sin considerar que situaciones

como la parafilia o la profundidad a la coalescencia puedan conducir a identificaciones ambiguas (Yassin et al., 2010).

1.3.3 GENERALIZACIÓN DEL MODELO YULE-COALESCENTE (GMYC)

G. Udny Yule (1925) se cuestionó cuál era la relación entre el tamaño de un género respecto al tiempo, entendiendo tamaño como el número de especies que lo conforman, además se preguntó sobre cómo era la distribución de tamaños para todos los géneros de la misma edad. Él mostró que el primer escenario puede modelarse como un proceso estocástico, actualmente conocido como proceso de Yule, el cual describe cómo se incrementa el número de especies bajo un modelo de especiación constante, por lo que de este modo formuló un modelo nulo para entender el proceso de especiación (Steel & McKenzie, 2002).

Más tarde se adaptó el modelo de Yule para que considerase los eventos de extinción, lo que fue más adecuado para su aplicación sobre reconstrucciones filogenéticas empíricas, las cuales por lo general sólo se realizan con la información de los taxa actuales porque se desconocen los linajes extintos (Nee et al., 1994).

El modelo Yule-Coalescente, combina el modelo de Yule con la teoría de la coalescencia. Asume que los eventos de bifurcación sobre un árbol filogenético deben comportarse según el modelo de Yule cuando estos representan eventos de especiación, mientras que los mismos eventos de bifurcación al interior de las especies se espera se comporten según un modelo neutral coalescente. Así el método GMYC clasifica las ramas de un árbol ultramétrico mediante la selección del umbral de tiempo en la cual ocurre esa transición entre el modelo de Yule y el proceso coalescente. Dicho umbral se obtiene al maximizar la verosimilitud bajo ambas condiciones (Pons et al., 2006).

1.3.4 PROCESO DE ÁRBOL DE POISSON (PTP)

El modelo PTP (Poisson Tree Process), también trata de encontrar el umbral de transición entre eventos en y entre especies, pero a diferencia del GMYC, este método requiere como entrada un árbol cuyo largo de las ramas sea proporcional al cambio genético, comúnmente se emplea este método con árboles bayesianos o de máxima verosimilitud.

La hipótesis que subyace a este modelo es que el número de sustituciones entre especies es mayor que las que puedan existir al interior de las mismas, y que en general los eventos

de sustitución tienen baja probabilidad de causar especiación. De este modo, los eventos de bifurcación serán más frecuentes al interior de las especies que entre ellas, por ello, el número de eventos que se pueden observar, dadas cierto número de sustituciones se comporta como un proceso de Poisson, mientras que el número de sustituciones estimadas para el siguiente proceso de especiación se espera se comporte exponencialmente (Zhang et al., 2013).

Una variante de este método, ha sido propuesta para permitir distintos niveles de variación intraespecífica, a la vez que relaja la condición de que los eventos de ramificación entre especies se ajusten a una distribución exponencial. Dicha implementación ha sido denominada proceso de árbol de Poisson de tasas múltiples (“*Multi-Rate Poisson Tree Process*”) o mPTP y que promete ser más adecuado para aquellos casos donde no se cumplen los supuestos de modelo original. Es además una implementación más eficiente que la propuesta original, por lo que es capaz de procesar un mayor número de secuencias en menor tiempo y conduce delimitaciones más precisas (Kapli et al., 2017).

1.3.5 DETECCIÓN AUTOMÁTICA DE DISCONTINUIDADES EN CÓDIGOS DE BARRAS (ABGD)

Este método se basa en la distancia genética que existe entre las secuencias, por lo que no asume nada respecto a la estructura de los datos o a la historia evolutiva de las especies. La premisa fundamental de este método es que las distancias entre secuencias de diferentes especies son siempre mayores a las que pueda haber al interior de las mismas.

Este método asume que se pueden encontrar discontinuidades al analizar la distribución de distancias pareadas entre todas las secuencias de un alineamiento dado, la cual se conoce como discontinuidad de código de barras (“*Barcode gap*”) (Puillandre et al., 2012). Evidentemente la distancia de la discontinuidad no es la misma para todos los grupos, por lo que se tiene que proporcionar una gama de distancias a probar. Dada un valor de distancia el método divide el conjunto de secuencias en el máximo número de grupos posibles, siempre que la distancia de dos secuencias de grupos distintos sea mayor que la existente entre secuencias del mismo grupo (Puillandre et al., 2012).

1.3.6 ENSAMBLE DE ESPECIES POR SUBDIVISIÓN AUTOMÁTICA (ASAP)

Este método abreviado ASAP por sus siglas en inglés (“*Assemble Species by Automatic Partitioning*”), implementa un algoritmo de agrupamiento jerárquico para clasificar secuencias con base a su distancia genética. A diferencia del método ABGD que requiere que el usuario proporcione una gama de distancias genéticas preestablecidas para poder separar a las especies, el método ASAP propone automáticamente la división en especies, al clasificar a las secuencias mediante sistema de puntuación que no emplea el conocimientos biológicos previos de la diversidad intraespecífica (Puillandre et al., 2021).

En este método, el algoritmo realiza un agrupamiento jerárquico ascendente, fusionando secuencias en grupos que se fusionan sucesivamente hasta que todas las secuencias forman un único grupo. El método ASAP proporciona varios conjuntos de particiones, el primero contiene tantos grupos como secuencias porque todavía no se ha realizado ningún agrupamiento, mientras que la última partición es un solo grupo que contiene todas las secuencias.

Todas las particiones generadas por este método se evalúan mediante dos métricas, una establece la probabilidad de que cada nuevo grupo creado corresponda a una misma especie, mientras que la otra mide el tamaño del espacio de código de barras, una combinación de ambos parámetros es utilizada para asignar una puntuación a cada partición propuesta.

2 MOLECULAR SPECIES DELIMITATION IN THE *DALBERGIA CONGESTIFLORA* (PAPILIONOIDEAE) CLADE REVEALS REGIONAL ENDEMISM AND CRYPTIC DIVERSITY

Pedraza-Ortega Euler¹, Martínez-Salas Esteban¹, Sotuyo Solange^{1*}

¹Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Cto. Zona Deportiva S/N, C.U., Coyoacán, 04510 Ciudad de México, México

*corresponding author jssotuyo@ib.unam.mx

2.1 ABSTRACT

2.1.1 PREMISE

Dalbergia is a group of species seriously threatened, due to the increasing demand for its timber on international markets. It is a group with at least 275 pantropical distributed woody species. However, our knowledge of the genus and its species is scarce. In this paper, we address the uncertainty about species diversity in the *D. congestiflora* clade, the most diverse group of the genus in Mexico and Central America.

2.1.2 METHODS

We used a single locus strategy and four different methods (ABGD, ASAP, GMYC and PTP) for molecular species delimitation, to assess the cryptic diversity of the *D. congestiflora* clade.

2.1.3 RESULTS

The results indicate that the nuclear marker *ITS* has sufficient variability to distinguish between different species within the clade. In total, we found 19 candidate species, more than the number morphologically of recognized species, including one new taxon.

2.1.4 CONCLUSIONS

We found that only two of the candidate species are widely distributed, the remaining are regionally endemic or microendemic. As for their evolutionary history, we can infer that their ancestors inhabited the dry tropical forest and that niche shifts have been involved in their diversification.

2.2 KEY WORDS

Central America, habitat shifts, Neotropics, Mexico, tropical tree, speciation

2.3 INTRODUCTION

Dalbergia L.f. is a monophyletic pantropical genus of Papilionoideae (Leguminosae) with around 275 species (Cowell et al., 2022). The genus consists of trees, shrubs, and woody lianas (Klitgaard & Lavin, 2005), that grow in a wide range of habitats from tropical rainforests, tropical dry forests, montane cloud forests, savannas, and coastal dunes (Adema et al., 2016; de Carvalho, 1997; Linares & Sousa, 2007). The genus can be recognized by its alternate, imparipinnate leaves with alternate leaflets. The plants have small papilionaceous flowers often in racemes or panicles, with five-lobed calyx and basifixed anthers

that are dehiscent by transverse or oblique slits; the fruit is usually an indehiscent samaroid pod (Adema et al., 2016; de Carvalho, 1997).

The tree species of *Dalbergia* are well known and valued for the quality and beauty of their heartwood (Richter et al., 1996; Rzedowski & Guridi-Gómez, 1988), which have the mechanical and acoustic properties to be used in the production of luxury furniture, cabinets and musical instruments (Qin et al., 2020). For some species, the heartwood is also used in traditional medicine and has antibiotic, antioxidant, and cytotoxic activities (Zhao et al., 2020).

In the last ten years, *Dalbergia* has been one of the main groups trafficked internationally, mainly due to the high price of its heartwood in international timber markets (Basik, 2015). As a result, all species in the genus are currently highly threatened by illegal logging and habitat fragmentation (Vardeman & Runk, 2020), which has driven these species closer to extinction (Qin et al., 2020).

The uncontrolled global trade in illegally logged *Dalbergia* timber has led to include all species on Appendix II of the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Flora and Fauna (CITES), except for all species previously added to Appendix I (Cowell et al., 2022). A major constraint to implementing CITES and the local laws and regulations is our limited ability to reliably and accurately identify *Dalbergia* timber, a task that is practically impossible because they lack reproductive structures (Hassold et al., 2016). Some advances have been made using anatomy (Richter et al., 1996) and molecular techniques such as DNA barcoding (Bhagwat et al., 2015; Richter et al., 1996), but are limited by our poor knowledge of species diversity within the genus.

Although of economic interest, botanical information on *Dalbergia* is scarce. The last major revision of the genus was carried out by Bentham (1860) and nowadays there is no updated revision that includes all known species, except for regional treatments (Adema et al., 2016; de Carvalho, 1997; Linares & Sousa, 2007). For many species, there are only the original descriptions, which are vague, brief, and based on flower or leaf characters (Espinoza et al., 2015). These descriptions are frequently unreliable and based only on one or very few herbarium specimens. As more *Dalbergia* herbarium material becomes available, considerable intergradation of characters and subtle differences between species have become evident (Rudd, 1995). Adding to the taxonomic uncertainty among the species is the limited sampling of many of these species, which are known only from one or few localities, and therefore there are no collections documenting their full range of

morphological, ecological, and geographic variation. As such morphological recognition and differentiation of *Dalbergia* species are major challenges for taxonomists.

The publication of DNA-based phylogenies has shed some light on the inter- and infrageneric relationships in *Dalbergia*. We know now that genus is monophyletic and its sister group is the clade comprising the genera *Machaerium* and *Ctenodon* (Cardoso et al., 2020; Ribeiro et al., 2007; Sotuyo et al., 2022; Vatanparast et al., 2013). Within *Dalbergia* itself, the scenario is more complex, where species relationships are not fully resolved, and only some previously recognized morphological sections have resulted in monophyletic groups (*Ecastaphyllum*, *Triptolemea*, and *Dalbergaria*) (Rahaingoson et al., 2022; Vatanparast et al., 2013). Perhaps one of the most unexpected results within *Dalbergia* is the lack of correlation between geography and phylogeny. The genus is divided into four to five big lineages where the basal group has species from South America only, but the others have an intricate mix of lineages from all continents. The most likely hypothesis explaining this pattern is the origin of *Dalbergia* in South America during the early Miocene and achieving its current distribution through several long-distance transoceanic dispersal events (Rahaingoson et al., 2022; Sotuyo et al., 2022; Vatanparast et al., 2013).

Recent revisions of the *Dalbergia* for Mexico and Central America have contributed to a better species circumscription, but our knowledge of the genus remains scarce (Cervantes-Maldonado, 2006; Linares & Sousa, 2007; Rudd, 1995). The last major revision of *Dalbergia* for the region added seven new species, recognizing this region as an important center of diversity with a total of 27 species reported (Cervantes et al., 2019; Linares & Sousa, 2007). Phylogenetic analysis shows that Mesoamerican species are not a monophyletic group but rather are grouped into four distinct clades, each of these clades appearing related to species from Africa, Asia, or South America (Sotuyo et al., 2022; Vatanparast et al., 2013).

The clade *Dalbergia glomerata* clade was first recognized by Sotuyo et al. (2022) to include 15 tree or shrubby species with a restricted distribution to Mesoamerica. Here we choose to refer to it here as *D. congestiflora* clade because it is a distinctive species with the widest distribution. The clade is the most species-diverse among the four groups recognized for *Dalbergia* in Mexico and Central America.

Species of the *Dalbergia congestiflora* clade are found in seasonally dry tropical forest, tropical rainforest, and montane cloud forests, or in secondary vegetation derived from these. *Dalbergia congestiflora* is the species with the widest distribution, and can be found

along the Pacific Coast of Mexico, from Nayarit to El Salvador, as well as in the Rio Balsas Depression. The remaining species, however, have a more regional or rather restricted distribution, for example, *D. palo-escrito* is known from the cloud forests in Hidalgo and Queretaro, which is probably the Northern limit of the genus in the area, and in one isolate locality in Oaxaca cloud forests. *D. glomerata* seems to be restricted to the Coastal Plain of the Gulf of Mexico, in Veracruz, Oaxaca and Northern Chiapas. *D. stevensonii* has only been reported from the lowland tropical rain forests of Chiapas, Guatemala and Belize. *D. cubilquitzensis* occurs in the same areas of *D. stevensonii* but with a longer range of distribution that reach into Honduras and Nicaragua and probably Costa Rica. *D. tucurensis* has been reported from the cloud forests of Chiapas, Guatemala and El Salvador. *D. melanocardium* has been found in montane forests from Chiapas to Costa Rica. The other species in the clade are only known to occur in a few localities.

In recent years several methods have been proposed to survey species diversity based on DNA sequences. Methods such as the Automatic Barcode Gap Discovery (Puillandre et al., 2012), the Assemble Species by Automatic Partitioning (Puillandre et al., 2021), the Poisson Tree Process algorithm (Zhang et al., 2013), and the Generalized mixed Yule-Coalescent model (Fujisawa & Barraclough, 2013) have been successfully used to explore biodiversity using single-locus data across multiple groups (Fujisawa & Barraclough, 2013; Lang et al., 2015; Young et al., 2021). The methods for molecular species delimitation are considered useful in groups of organisms with poor taxonomic knowledge where species boundaries are unclear (Lang et al., 2015). Given the potential of these methods to contribute to the species circumscription in *D. congestiflora* clade, the aim of the present work is to explore a *de novo* species delimitation in the group with extensive sampling and to test the current species hypothesis based solely on morphological information. We consider all previously morphological species as hypotheses that need to be tested as new lines of evidence become available. In this sense, molecular data are a new source of evidence that has the potential to improve species delimitation in this complex group of species.

2.4 METHODS

2.4.1 SPECIES SAMPLING

Leaflet samples were obtained from herbarium specimens (MEXU), silica gel preserved samples from the Inventario Nacional Forestal y de Suelos (INF), and all others collected in the field (2018-2021). For field collected samples, we attempt to determine the species based on morphology and geographic distribution, for many accessions we were unable to do so because they lacked flowers or pods and were annotated as *Dalbergia* sp.

2.4.2 DNA EXTRACTION AND SEQUENCING

Total genomic DNA was extracted from 10–20mg of dried tissue using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), following the manufacturer’s recommendations and slightly modified adding DTT at 1%. The *ITS* intergenic spacers were amplified using primers AB101 and AB102 (Sun et al., 1994). The PCR reaction was performed with a total volume of 10 μ l using Thermo 2x PCR Master Mix, adding 0.2 μ l of BSA, plus 20ng of template. The quality and quantity of PCR products were determined by 1% agarose gel electrophoresis. The PCR templates were purified with QIAQuick PCR Purification Kit (Qiagen). Sequencing was performed in both forward and reverse directions with BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit V 3.1 (Thermofisher, Foster City, CA, USA) and sequenced on an ABI PRISM 3730 DNA Sequencer (Applied Biosystems) at Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y la Salud, Instituto de Biología, using the same primers as for amplification. Forward and reverse chromatograms were visualized, aligned, and edited using Seqtrace software (Stucky, 2012). All sequences were aligned in MAFFT 7 software with the default options (Katoh & Standley, 2013). Alignment was manually adjusted as needed with the AliView software (Larsson, 2014).

In addition to the above, we performed a BLAST search against the GenBank to download *ITS* sequences of *Dalbergia* species and closely related genera to use as outgroups. We performed a filtering and cleaning process on the GenBank accessions by removing sequences with a length of less than 500 bp, with more than three changes in the conserved region of the 5.8S gene, and we carefully reexamined those sequences with long branches in a preliminary phylogenetic analysis to remove them from the final matrix. All filtering,

cleaning, and fasta file manipulation were performed with the Seqkit command-line tool (Shen et al., 2016).

2.4.3 PHYLOGENETIC ANALYSIS

We determine the best fit model of nucleotide substitution for our dataset, using the Akaike information criterion (AIC) implemented in the jModelTest2 software (Darriba et al., 2012), all subsequent phylogenetic analyses were run with the selected model. We prepared two datasets, the first one is the all-dalbergia dataset, in this dataset in addition to our sequences we added all filtered GenBank accessions for the genera *Dalbergia*, *Machaerium*, and *Ctenodon* and some accessions for the genera *Acosmium*, *Aeschynomene*, *Centrolobium*, *Diphysa*, *Ormocarpum*, *Pictetia* and *Pterocarpus* as outgroups. We cut the ends of the alignment to discharge possible sequencing errors and to ensure that all positions in the matrix had a minimum of 80% of coverage. Finally, unique sequences were selected by retaining only one accession for each set of identical sequences. The second dataset was named “congestiflora”, in which we include all our sequences plus the species of the section *Triptolemea* from South America, and only one accession from each of these species: *D. benthamii*, *D. canescens*, *D. glabra*, *D. odorifera* and *D. rimosa* as outgroups. In this dataset, we retained all accessions without removing any repeated sequences, but cut the alignment as described above, this dataset was used to perform all our species delimitation methods.

On the all-dalbergia dataset, we performed Bayesian and maximal likelihood phylogenetic analysis. The first was done with MrBayes (Ronquist et al., 2012), with two independent runs of the Markov Chain Monte Carlo (MCMC) algorithm, that were executed for up to 7×10^6 generations sampling each 1000. We construct a major rule consensus tree after discharging the first 20% of generations as burn-in. The maximum likelihood phylogenetic analysis was executed with RAxML software (Stamatakis, 2014) using the default parameters, and the branch support in this analysis was assessed with 1000 replicates of the fast bootstrap strategy.

With the congestiflora dataset, we performed two Bayesian phylogenetic analyses. The first one was conducted with MrBayes (Ronquist et al., 2012), with two independent MCMC runs executed for 5×10^6 generations, and sampling every 1000. The majority rule consensus tree was constructed after discharging the first 20% of the trees as burn-in. A second analysis was done to build an ultrametric tree with BEAST 2 (Bouckaert et al., 2019).

Branch lengths were estimated under a Yule prior model, using a random starting tree and a relaxed lognormal clock. The MCMC was run for 20×10^6 generations sampling each 1000. The majority rule consensus tree was built with TreeAnnotator after removing 20% of samplings as burn-in.

For all phylogenetic analyses, the convergence of the MCMC was evaluated with the Bestiary software (Wirth & Duchene, 2022) by examining the log likelihood plots and ensuring that the estimated size of the sample (ESS) of all parameters was greater than 200. We use the ggtree package (G. Yu et al., 2017) of the R statistical environment (R Core Team, 2020) to visualize all phylogenetic trees.

2.4.4 SPECIES DELIMITATION

To estimate the species boundaries, we explore multiple lines of evidence by running four different methods. The first two are distance based and were done with the congestiflora dataset after removing the outgroup accessions and the sequences of which only a partial length was available. The first method divides the species candidate into the datasets by assuring that the inter- and intra- specific genetic distances do not overlap, this method is named Automatic Bar Gap Discovery (ABGD) (Puillandre et al., 2012), for which we use the software that the author provides in his website (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/>). The second method, named Assembling Species by Automatic Partitioning (ASAP), is similar to ABGD in which genetic distances are used to identify the transition between intraspecific variation and interspecific divergence, also incorporates a scoring system to identify the best set of partitions (Puillandre et al., 2021). To run ASAP we use the online version of the software (<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/>) with the default options and distances based on the K80 substitution model.

The other two methods are tree-based, for which we utilize the phylogenetic trees from the previous section. The first was the Generalized Mixed Yule-Coalescent (GMYC), which is a likelihood method that delimited the species by fitting the within and between species branching models into the input tree (Fujisawa & Barraclough, 2013), to execute this method we utilized the package splits: SPecies of the R environment (Fujisawa & Ezard, 2009) and the ultrametric tree generated with BEAST 2. The latter was the Bayesian version of the Poisson Tree Process (bPTP) (Zhang et al., 2013), which is a phylogeny-aware method that identifies the transition points between inter- and intraspecific branching events, but unlike GMYC, it requires a tree with branch length proportional to the

amount of genetic change so we use the tree generated with MrBayes and the author's published software.

Candidate species were generated by examining all proposed partitions and agreeing on them as long as they were consistent with morphological, ecological, and geographical evidence. To avoid over-partitioning, we placed all samples from the same monophyletic group into the same candidate species, and tried to avoid proposing candidate species composed of a single accession unless there was strong evidence to support this. In this work, we follow the suggestion made by (Puillandre et al., 2012) and present only those species hypotheses with a number of partitions closest to that expected from the number of morphological species.

2.5 RESULTS

2.5.1 SEQUENCES ANALYSIS

In this work, we generated 269 new sequences that were deposited at the GenBank. The BLAST search returned us with 669 sequences for *Dalbergia*, *Machaerium*, *Ctenodon*, and the selected external groups, after cleaning and filtering we preserve 405 accessions. The all-dalbergia dataset was composed of 475 unique sequences representing 739 accessions while the congestiflora dataset was composed of 314 distinct accessions; the characteristics of both matrices are summarized in Table 2.1.

2.5.2 PHYLOGENETIC ANALYSIS

The nucleotide substitution model that best fitted our *ITS* dataset was GTR+GAMMA, and therefore this model was used in all subsequent phylogenetic analyses.

The Bayesian analysis for *ITS* resolves four Mesoamerican clades in *Dalbergia* with high support values for the *D. congestiflora* clade (0.99 of posterior probability), and the other three clades (1.0 pp). The same topology is recovered by the maximum likelihood analysis for *D. congestiflora* clade (80% bootstrap, Fig S1). In both trees, the *D. congestiflora* clade has a group of species belonging to *Triptolemea* from South America as a sister group (Figure 2.1 and 2.2). On the other hand, the Asian species clade of *D. benthamii* and *D. canescens* are the sister group of all *D. congestiflora*-*D. frutescens* clade (Figure 2.1).

The Bayesian analysis of the ITS region with the *congestiflora*-only dataset produced a tree with seven subclades within the *D. congestiflora* clade. Six of these subclades have high support values (0.95 pp) and one has a moderate support value of 0.62 (Figure 2.2).

We named each subclade by selecting the first of its morphological species as they appear in alphabetical order. The subclades found are I) the *Dalbergia agudelo* subclade, which has samples associated with the morphological species *D. agudelo*, *D. melanocardium*, and *D. longepedunculata*, as well as some accessions identified as *D. calycina*, *D. modesta* and *D. palo-escrito* (Figure 2.2); II) the *D. calderonii* subclade, including the species *D. calderonii*, *D. stevensonii*, *D. tilarana* and *D. rachiflexa*; III) the *D. congestiflora* subclade with samples only from *D. congestiflora*; IV) the *D. cubilquitzensis* subclade containing samples associated with all accessions of *D. cubilquitzensis*, plus several samples identified as *D. glomerata* and one sample each of the morphological species *D. modesta*, *D. tilarana* and *D. ruddiae*; V) the *D. glomerata* subclade including samples of *D. glomerata* and *D. tucurensis*; VI) the *D. luteola* subclade with samples of *D. luteola*; VII) finally, the *D. palo-escrito* subclade consisting of samples of *D. palo-escrito* and *D. tucurensis*.

2.5.3 SPECIES DELIMITATION

We begin by presenting the partitions proposed by the distinct species-delimitation methods, and subsequently, we summarize the consensus into the candidate species and explain how the disagreements between methods were resolved. For better visualization, we plot the partitions found by each method against the tree generated by MrBayes with the *congestiflora*-only dataset (Figure 2.2).

The distance-based method ABGD was the least efficient and partitioned the samples into seven groups, the subclades *Dalbergia congestiflora* and *D. luteola* with one partition each, the subclade *D. calderonii* with four partitions, and one partition for the remaining four subclades. The partitions within the *D. calderonii* subclade correspond to the expected morphospecies in this group.

The GMYC method with the single threshold option was one of the most conservative with eight proposed partitions, where each previously identified subclades has a correspondence with a proposed partition, with the exception of *Dalbergia calderonii* subclade that is divided into two partitions, one of them corresponding to the most divergent morphospecies of this group, *D. tilarana*. Furthermore, the multiple threshold version for the same

method, or mGMYC has resulted in 13 partitions but with a strong tendency to over-split. In addition to splitting the *D. calderonii* and *D. congestiflora* subclades into two partitions each, this method considers the subclade *D. cubilquitzensis* as consisting of five partitions, being the only method that gives this result among all those tested.

The distance-based ASAP method divides the data into 20 partitions suggesting that the *Dalbergia cubilquitzensis* and *D. luteola* subclades consist of a single partition. This method also showed three partitions for the subclades *D. agudeloii*, *D. congestiflora* and *D. palo-escrito*, four partitions for the *D. glomerata* subclade and five for the *D. calderonii* subclade. This method proposes more partitions than the expected morphospecies, but with minor errors, and in general with great agreement with the proposed morphological species.

The maximum likelihood version of the PTP (mlPTP), reports 23 partitions, in a similar scheme to ASAP method, differing in that it suggests five partitions for the *Dalbergia agudeloii* subclade instead of the three of ASAP, and four for the *D. palo-escrito* subclade instead of three. Associated with this method, the Bayesian version of the PTP (bPTP) gives 29 partitions, with similar results to mlPTP but with more over-splitting, one extra partition in the *D. agudeloii* and *D. glomerata* subclades and four extra partitions for the *D. palo-escrito* subclade.

Overall, we consider the ASAP and mlPTP methods to be more congruent with the morphological species hypothesis, even when they report considerably more candidate species than the original fifteen morphospecies. The reason for this is that some morphospecies are divided into two distinct lineages, such as the morphospecies *Dalbergia calderonii*, *D. melanocardium* and *D. palo-escrito* where the two lineages of each species are sister groups. However, there is a case of the morphospecies *D. tucurensis* which is divided into two lineages that are not sister to each other and belong to different subclades. In all cases, these lineages make geographic sense, hence we choose to keep them as separated candidate species (Figure 2.3).

Perhaps the major inconsistency that we need to resolve is in the *Dalbergia congestiflora* subclade, where several methods (ASAP, mlPTP, and bPTP) reports three partitions, one with a single accession, another with two, and the remaining accessions in a third partition. In this case, we carefully examined the three problematic accessions which are from El Salvador and are not morphologically distinct from other samples from the same locality. Moreover, the morphospecies *D. congestiflora* is one of the few that can be dis-

tinguished from others in the clade by synapomorphies on morphological features such as highly congested racemes with sessile flowers and the orbicular leaflets that contrasts with the elliptical or oblong leaflets in the remaining species. Therefore, we consider that all samples in the *D. congestiflora* subclade belong to the same candidate species.

Another similar case is the morphospecies *Dalbergia agudeloii* which ASAP method is not able to differentiate from other species of this subclade, whereas mlPTP and bPTP are split into two separate partitions, we merge both partitions into one, because this species is characterized by very small leaflets, the smallest of this group of species, and the sample is geographically grouped with the other samples of this morphospecies.

In summary, after removing the extra partitions within *Dalbergia agudeloii* and *D. congestiflora* morphospecies, we proposed 19 candidate species (Figure 2.3). Two of these candidate species are supported by a single accession, the first being a specimen associated with the morphospecies *D. rachiflexa* that is morphologically very distinctive with its marked flexuous rachis and phylogenetically very distinct from other species in the *D. calderonii* subclade. The second, is a specimen determined as *D. longepedunculata* in the *D. agudeloii* subclade, which does not show a very distinctive morphology but is phylogenetically sister to *D. agudeloii* morphospecies from which can be unequivocally distinguished.

2.6 DISCUSSION

2.6.1 PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF THE *DALBERGIA CONGESTIFLORA* CLADE

Our results are in agreement with that reported by Sotuyo et al. (2022), who found the clade *D. congestiflora* as a monophyletic group and sister to the South American species of section *Triptolemea*. The same relationships have been found in other studies with a more limited sampling (Ribeiro et al., 2007; Vatanparast et al., 2013). These two clades are also closely related morphologically. The sect. *Triptolemea* sensu Carvalho (1997), has been traditionally characterized by the cymose inflorescences, usually large, with more or less flat tops and secundiflorous terminal racemes; fruits oblong to oblong-elliptical, samaroid, membranaceous to submembranous and reticulate venation more prominent over the seed cavity. All these features are also found in the species of the *D. congestiflora* clade.

2 *Molecular species delimitation in the Dalbergia congestiflora (Papilionoideae) clade reveals regional endemism and cryptic diversity*

Whereas the *Dalbergia congestiflora* clade has species that are mainly trees and rarely shrubs, the clade of sect. *Triptolemea* has species with more diverse habits consisting of trees, shrubs, scandent shrubs, and woody lianas. The climbing habit has been found to be highly plastic at evolutionary times as evidenced by the existence of two distinct lineages of woody lianas in the Mesoamerican species of *Dalbergia* (Sotuyo et al., 2022). In fact, some studies suggest that the lianescent habit has evolved from ancestral tree species through evolutionary increment in the genome size (Hiremath & Nagasampige, 2004).

Regarding floral morphology, their differences are minimal, as Rudd recorded in her description of *Dalbergia cubilquitzensis* for the Flora of Nicaragua, a species first described as a variety of *D. variabilis* (= *D. frutescens*) and part of sect. *Triptolemea*, noted that South American (*D. frutescens*) specimens consistently have ten stamens while the Central American samples (*D. cubilquitzensis*) have only nine (Rudd, 2001). In Linares and Sousa's (2007) review describing new species, we can corroborate that all species of the *D. congestiflora* clade have nine stamens. However, for sect. *Triptolemea*, we only know that *D. frutescens* has ten stamens. More detailed studies are needed to confirm if this morphological feature can be used to discriminate between both groups.

In contrast to the subtle morphological differentiation, their non-overlapping geographical distribution reinforces their phylogenetic separation. While the species of the sect. *Triptolemea* in the Americas are restricted to South America, the species of the *Dalbergia congestiflora* clade are found in Mexico and Central America. Biogeographical studies within *Dalbergia* have suggested two dispersal events from South America to Central America (Rahaingoson et al., 2022). However, our results show at least three dispersal events, for the number of Mesoamerican groups related to South American species (Figure 2.1). In any case, one of these dispersal events coincides with the origin of the *D. congestiflora* clade, whose divergence is dated between 12 and 10 myr during the Miocene (Rahaingoson et al., 2022; Sotuyo et al., 2022), an age prior to the origin of the Isthmus of Panama, thus supporting the long-distance dispersal hypothesis, this pre Isthmus dispersion pattern was reported for many other groups (Gutiérrez-García & Vázquez-Domínguez, 2013). Even though there are studies that suggest the existence of a previous linking bridge since the Oligocene (Gutiérrez-García & Vázquez-Domínguez, 2013; Mastretta-Yanes et al., 2015).

2.6.2 EVOLUTIONARY TRENDS IN THE *DALBERGIA CONGESTIFLORA* CLADE

Our results show that the nuclear *ITS* region has enough variability to discriminate most species of the *Dalbergia congestiflora* clade, notwithstanding their minimal genetic distance. These species are distributed in seven subclades, of which *Dalbergia congestiflora*, *D. cubilquitzensis*, and *D. luteola*, have one candidate species, all others include multiple candidate species. Altogether, we recovered a distinct lineage for all previously described morphological species, with the exception of *D. modesta* and *D. ruddiae*. In the case of *D. modesta*, we sampled two accessions which were found to be paraphyletic, as they belong to distinct candidate species. This suggests that *D. modesta* is an artifact and not a real species. In the original description of this species, Linares and Sousa (2007) pointed that it lacks notable features that can easily differentiate it from others, stating that it is very similar to *D. glomerata*, but unlike the latter, the former has a ciliate stigma as opposed to the truncated stigma of the second. In the case of *Dalbergia ruddiae*, the two accessions are part of *D. cubilquitzensis* and not a distinct species. *D. ruddiae* is known only from small areas of Chiapas and Costa Rica, and similar to *D. cubilquitzensis* grows in tropical lowland evergreen forest (2007) and it is not surprising that they are the same species.

Another problematic morphospecies is *Dalbergia rachiflexa*, where the two accessions gave rise to distinct species, one of them being part of one of the lineages of *D. calderonii* and the other is clearly a distinct species, we identify the candidate species *D. rachiflexa* with the latter. These examples illustrate the difficulty of establishing species on the basis of very few specimens.

After the removal of *Dalbergia modesta* and *D. ruddiae*, which have no genetic support, we obtained more candidate species than the fifteen species originally sampled. This is because five of them, *D. calderonii*, *D. melanocardium*, *D. longepedunculata*, *D. paloescrito* and *D. tucurensis*, are divided into two distinct lineages, which are sister groups but show a clear geographical separation (Figure 2.3). Only *D. tucurensis* morphospecies is split into two non-sister candidate species and each candidate species belongs to a different subclade. A new lineage is also found within the *D. glomerata* subclade which is probably a new species. The new species was found in southern Puebla, inhabiting the same area but at different altitudes with *D. cubilquitzensis*, and very near where *D. glomerata* is common. Unlike the two species, the new lineage inhabits the edge of the cloud forest near 1000 m of altitude, therefore this new species is ecologically separate from the other

two. Taking into account the unsampled *D. salvanaturae*, we have 20 candidate species for the *D. congestiflora* clade.

Two subclades are clearly under-represented in our sampling, *Dalbergia calderonii* and *D. agudeloii*. The species *D. calderonii* can be unambiguously distinguished genetically and morphologically, two candidate species separated by the Isthmus of Tehuantepec are observed in the analyses (Figure 2.3). In the case of *Dalbergia agudeloii*, a poorly known species collected from a couple of localities, it is morphologically distinguishable from the others, related to *D. melanocardium* and *D. longepedunculata*. Some of the accessions sampled were determined as *D. longepedunculata*, but molecularly correspond to *D. melanocardium*. For the subclade consisting of the above species we found five candidate species, as the two latter species are divided into two lineages each.

Two of the subclades concentrate species inhabiting cloud forests (*D. glomerata* and *D. palo-escrito*), in which we observed six candidate species, of those the morphospecies *D. glomerata* inhabits the tropical rainforest. Both subclades are genetically close to *D. cubilquitzensis*, the most widely distributed species in the tropical rainforest. There has been much discussion about the effects of glaciations on vegetation in the neotropics, and it is clear that for temperate environments it had significant effects by notably constricting the distribution areas of many species (Mastretta-Yanes et al., 2015), but, it is unclear what effect it may had in the tropics. In the case of cloud forests, Ramírez-Barahona and Eguiarte (2013), proposed two hypotheses, depending on whether the climate was drier or wetter during the glacial periods. The first scenario, the “dry refugia”, implies the severe constriction of the habitable area, resulting in a strong demographic restriction and a severe loss of genetic diversity, promoting the emergence of different isolated lineages. The second hypothesis, the “moist forests”, where the cloud forest not only remains intact but is interconnected as a consequence of altitudinal decrease, here favouring the contact of populations, their demographic expansion and the increase of their genetic diversity, preventing the diversification of the lineages. The distribution we found for cloud forest species in *Dalbergia*, indicating the presence of five isolated and regionally endemic lineages, supports the dry refugia hypothesis, lessening support for the hypothesis of Cervantes et al. (2019) that species such as *D. palo-escrito* had a wider distribution in the past and today we observe isolated populations as an effect of vicariance. In addition, it has been proposed that cloud forests not only migrate altitudinally, but also in latitude and longitude (2020). The above, allied to the complex geology of Mexico and Central America may have accentuated its effect on the diversification of lineages.

2 *Molecular species delimitation in the Dalbergia congestiflora (Papilionoideae) clade reveals regional endemism and cryptic diversity*

The *Dalbergia congestiflora* clade is an ideal group for comparative phylogeography studies, since the effects of different historical events can be contrasted between species inhabiting different vegetation types, the tropical dry forests, the tropical rain forests and montane cloud forests.

An interesting phylogenetic pattern that we can observe among the species of the group of study is that three more early divergent subclades (*Dalbergia congestiflora*, *D. calderonii* and *D. luteola*), concentrate species that inhabit the seasonally dry tropical forest, with the exceptions of *D. stevensonii* and *D. tilarana* that are found in the tropical rainforest and cloud forest respectively. On the other hand, the four more derived subclades have only species that inhabit humid environments such as tropical rainforest, tropical semi-deciduous forest, and cloud forest. With the aforementioned, we hypothesize that the ancestral habitat for the species in *Dalbergia congestiflora* clade was the seasonally dry tropical forest, with habitat shift as a mechanism of speciation which has played a key role in the process of diversification within the group. This is in accordance with the geographical distribution of the species in the three early divergent subclades that are laid out along the Pacific coast from Jalisco in Mexico to Guanacaste in Costa Rica. The current and ancestral distribution area for the seasonally dry tropical forest (T. Pennington et al., 2000). The exception to this pattern is *D. stevensonii* which is the sole species in the group that inhabits the tropical rainforest of the Atlantic coast and that probably may have originated from a recent migration event.

Moreover, the three most derived subclades (*Dalbergia glomerata*, *D. palo-escrito* and *D. cubilquitzensis*) are the only ones with species that reached the tropical rainforest and cloud forest along the Atlantic coast, from San Luis Potosi in Mexico to Nicaragua, but not as far as the Yucatan peninsula. This is important because it is most likely that they derived from an ancestral species that thrived in a humid environment and no species of the clade has colonized the dryer environment of the north of the Yucatan peninsula. In the subclades we also find species with populations on the Pacific coast, but in range they are minimal compared with the Atlantic populations. Species with these characteristics are the two candidate species associated with *D. tucurensis*, the *D. palo-escrito* from Oaxaca and *D. cubilquitzensis*. For both of them the most plausible scenario is a single ancestral event of migration from the Pacific to the Atlantic where the Pacific populations are a relict of their ancestral distribution.

A further observation that reinforces the hypothesis of tropical dry forest as an ancestral habitat of the *Dalbergia congestiflora* clade, is the phenological pattern of replacement of

all foliage just before of flowering period, this pattern has been reported even in species growing in habitats without hydric restrictions as noted for *D. palo-escrito* (Rzedowski & Guridi-Gómez, 1988), *D. stevensonii* and *D. tucurensis* (Ruíz-Mazariegos, 2017) and observed in *D. cubilquitzensis*.

One of the most interesting results of this work is the wide distribution range for *Dalbergia cubilquitzensis*, a species thought to be mainly from Central America, with Chiapas as the North limit of its distribution; the species is common in lowland Atlantic rainforest. The results show that the northern limit of this species reaches as far as central Veracruz near Xalapa, extending the known range of the species, becoming one of the species with the widest range for this clade, only comparable in extent with *D. congestiflora*. Furthermore, the results show that this candidate species also reached the Pacific lowlands in Oaxaca and Chiapas, in the latter locality corresponding with specimens morphologically associated with *D. ruddiae*, the genetic data supports that this morphospecies is part of the candidate species *D. cubilquitzensis*.

The results show high levels of microendemism that may be indicative of small-scale allopatric diversification and the persistence of isolated lineages over geological times (Vitecek et al., 2017). This is particularly true for all lineages in the cloud forest, the six candidate species in the *Dalbergia palo-escrito* and *D. glomerata* subclades, which have a restricted distribution, in contrast to a wider distribution of two low-elevation species, *D. congestiflora* in the tropical dry forest, and *D. cubilquitzensis* in the tropical rainforest.

2.6.3 LIMITATIONS OF THE MORPHOLOGY AND TAXONOMIC IMPLICATIONS

A major surprise found in this work is the existence of discrepancies between the morphologically assigned species and the molecular circumscription for specimens in the collections (MEXU and INF). This confirms our lack of knowledge of *Dalbergia* and our limited information on the range of morphological variation within and between species (Rudd, 2001; Rzedowski & Guridi-Gómez, 1988). The probable cause is the limited sampling of many species coupled with the dearth of discrete morphological characters to help distinguish species unequivocally.

These subtle morphological differences between Mesoamerican *Dalbergia* species have been previously recognized by Rudd (1995). Moreover, morphometric statistical analyses of *Dalbergia* leaflets from Madagascar show that they are insufficient to differentiate bet-

ween species (Hassold et al., 2016). Morais et al. (2019) demonstrated that leaf shape and size of *D. ecastaphyllum* are influenced by the environment.

A recent criticism of species delimitation methods using molecular information is that they are unable to distinguish between the associated genetic structure between species versus population structure within species, resulting in taxonomic over-splitting (Huang, 2020; Sukumaran et al., 2021). Nonetheless, our results are congruent with the species previously defined on the basis of morphology, with the difference that we found a larger number of potential species, and these candidate species have ecological and geographical support.

We agree with Cervantes et al. (2019) in their mention that the record of *Dalbergia tilarana* from Oaxaca (Calzada 16905) resulted from misidentification, but although these authors identify the specimen as *D. glomerata*, our results show that it belongs to *D. cubilquitzensis*. Numerous other misidentifications exist between *D. glomerata* and *D. cubilquitzensis*, particularly eight specimens previously identified as *D. glomerata* in the Lacandona rain forest of Chiapas that genetically group into *D. cubilquitzensis*. With these findings, we are able to establish that *D. glomerata*'s range is more constrained than previously believed, and that it is solely restricted to the lowlands of the Mexican Gulf, as suggested by Cervantes et al (2019).

2.7 CONCLUSIONS

Not all studies that successfully use delimitation tools result in species formalization, even when delimitation of taxa with DNA sequences is useful for proving species hypotheses. This is related to the complex taxonomic procedures associated with formal species description. Most often, sequence-based species hypotheses are ignored when they have weak ecological, geographical or morphological support. However, these should be implemented in integrative analyses that take into account all lines of evidence.

In this sense, our results can be taken as the base of any future review and possibly a botanical re-assessment in order to make a better circumscription of the species in the *D. congestiflora* clade. But at the moment they are very valuable for any conservation strategies for the *Dalbergia* genus in Mexico and Central America.

2.8 ACKNOWLEDGMENTS

We thank Leticia Julio-Catarino for her help in the field collecting *Dalbergia* plants for the study. We thank Laura Márquez and Nelly López (LSGBS laboratory) for their support in sequencing the samples used. We thank the curators of the herbaria who provided herbarium material. We are grateful for funding under the PAPIIT project IT200519 and to CONACyT for the grant awarded to Euler Pedraza-Ortega. This work is part of Euler Pedraza-Ortega's M. Sc. studies presented as a requirement to obtain a master's degree at Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México.

2.9 AUTHORS CONTRIBUTIONS

The experiment and sampling strategy were designed by EPO and SS. EMS, EPO and SS made field work and chose the herbarium material. The laboratory work and data analysis were completed by EPO. EPO wrote the draft and the final version of the manuscript was read and approved by all authors.

2.10 CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

2.11 DATA AVAILABILITY

All new sequences generated were stored in the GenBank under the following accession numbers. Detailed information regarding the accessions used in this work can be found in Supplementary material file 1.

2.12 REFERENCES

- Adema, F., Ohashi, H., & Sunarno, B. (2016). Notes on Malesian Fabaceae (Leguminosae-Papilionoideae) 17. The genus *Dalbergia*. *Blumea - Biodiversity, Evolution and Biogeography of Plants*, 61(3), 186-206. <https://doi.org/10.3767/000651916X693905>
- Basik, N. (2015). *China's hongmu consumption boom: Analysis of the chinese rosewood trade and links to illegal activity in tropical forested countries* (Forest trends reports series). Uk Aid. United Kingdom.
- Bentham, G. (1860). A synopsis of the Dalbergieae, a tribe of the Leguminosae. *Journal of the Proceedings of The Linnean Society*, 4, 1-134.
- Bhagwat, R. M., Dholakia, B. B., Kadoo, N. Y., Balasundaran, M., & Gupta, V. S. (2015). Two new potential barcodes to discriminate *Dalbergia* species. *PLOS ONE*, 10(11), e0142965. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142965>
- Bouckaert, R., Vaughan, T. G., Barido-Sottani, J., Duchêne, S., Fourment, M., Gavryushkina, A., Heled, J., Jones, G., Kühnert, D., De Maio, N., Matschiner, M., Mendes, F. K., Müller, N. F., Ogilvie, H. A., du Plessis, L., Poppinga, A., Rambaut, A., Rasmussen, D., Siveroni, I., ... Drummond, A. J. (2019). BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis (M. Pertea, Ed.). *PLOS Computational Biology*, 15(4), e1006650. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1006650>
- Cardoso, D., Mattos, C., Filardi, F., Delgado-Salinas, A., Lavin, M., Moraes, P., Tapiapastrana, F., & Lima, H. (2020). A molecular phylogeny of the pantropical papilionoid legume *Aeschynomene* supports reinstating the ecologically and morphologically coherent genus *Ctenodon*. *Neodiversity*, 13(1), 1-38. <https://doi.org/10.13102/neod.131.1>
- Cervantes, A., Linares, J., & Quintero, E. (2019). An updated checklist of the Mexican species of *Dalbergia* (Leguminosae) to aid in its conservation efforts. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 90, 1-11. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2019.90.2528>
- Cowell, C., Williams, E., Bullough, L. A., Grey, J., Klitgaard, B., Govaerts, R., Andriambololonera, S., Cervantes, A., Cramer, S., de Lima, H. C., Lachenaud, O., Li, S.-J., Linares, J. L., Phillipson, P., Rakotonirina, N., Wilding, N., Barker, A., Barstow, M., Beentje, H., & Plummer, J. (2022). CITES *Dalbergia* checklist, 338.

- 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. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- de Carvalho, A. M. (1997). A synopsis of the genus *Dalbergia* (Fabaceae: Dalbergieae) in Brazil. *Brittonia*, 49(1), 87. <https://doi.org/10.2307/2807701>
- de Morais, D. V., Nunes, L. A., da Mata, V. P., Costa, M. A. P. d. C., Sodr e, G. d. S., & de Carvalho, C. A. L. (2019). Leaf geometric morphometrics among populations of *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. *Bioscience Journal*, 35(6). <https://doi.org/10.14393/BJ-v35n6a2019-39814>
- Espinoza, E. O., Wiemann, M. C., Barajas-Morales, J., Chavarria, G. D., & McClure, P. J. (2015). Forensic analysis of cites-protected *Dalbergia* timber from the Americas. *IAWA Journal*, 36(3), 311-325. <https://doi.org/10.1163/22941932-20150102>
- Fujisawa, T., & Ezard, T. (2009). splits: SPecies' limits by threshold statistics.
- Fujisawa, T., & Barraclough, T. G. (2013). Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: A revised method and evaluation on simulated data sets. *Systematic Biology*, 62(5), 707-724. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syt033>
- Guevara, L. (2020). Altitudinal, latitudinal and longitudinal responses of cloud forest species to Quaternary glaciations in the northern Neotropics. *Biological Journal of the Linnean Society*, 130(3), 615-625. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blaa070>
- Gutiérrez-García, T. A., & Vázquez-Domínguez, E. (2013). Consensus between genes and stones in the biogeographic and evolutionary history of Central America. *Quaternary Research*, 79(3), 311-324. <https://doi.org/10.1016/j.yqres.2012.12.007>
- Hassold, S., Lowry, P. P., Bauert, M. R., Razafintsalama, A., Ramamonjisoa, L., & Widmer, A. (2016). DNA barcoding of malagasy rosewoods: Towards a molecular identification of CITES-listed *Dalbergia* species. *PLOS ONE*, 11(6), e0157881. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157881>
- Hiremath, S. C., & Nagasampige, M. (2004). Genome size variation and evolution in some species of *Dalbergia* Linn.f. (Fabaceae). *Caryologia*, 57(4), 367-372. <https://doi.org/10.1080/00087114.2004.10589418>
- Huang, J.-P. (2020). Is population subdivision different from speciation? From phylogeography to species delimitation. *Ecology and Evolution*, 10(14), 6890-6896. <https://doi.org/10.1002/ece3.6524>

2 *Molecular species delimitation in the Dalbergia congestiflora (Papilionoideae) clade reveals regional endemism and cryptic diversity*

- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772-780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Klitgaard, B., & Lavin, M. (2005). *Tribe dalbergieae*. In: *Legumes of the world*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Lang, A. S., Bocksberger, G., & Stech, M. (2015). Phylogeny and species delimitations in European *Dicranum* (Dicranaceae, Bryophyta) inferred from nuclear and plastid DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 92, 217-225. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.06.019>
- Larsson, A. (2014). AliView: A fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*, 30(22), 3276-3278. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>
- Linares, J., & Sousa, M. (2007). Nuevas especies de *Dalbergia* (Leguminosae: Papilionoideae: Dalbergieae) en México y Centroamérica. *Ceiba*, 48(1-2), 61-82. <https://doi.org/10.5377/ceiba.v48i1-2.439>
- Mastretta-Yanes, A., Moreno-Letelier, A., Piñero, D., Jorgensen, T. H., & Emerson, B. C. (2015). Biodiversity in the Mexican highlands and the interaction of geology, geography and climate within the Trans-Mexican Volcanic Belt. *Journal of Biogeography*, 42(9), 1586-1600. <https://doi.org/10.1111/jbi.12546>
- Pennington, T., Prado, D. E., & Pendry, C. A. (2000). Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. *Journal of Biogeography*, 27(2), 261-273. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.2000.00397.x>
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., & Achaz, G. (2012). ABGD, automatic barcode gap discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21(8), 1864-1877. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x>
- Puillandre, N., Brouillet, S., & Achaz, G. (2021). ASAP: Assemble species by automatic partitioning. *Molecular Ecology Resources*, 21(2), 609-620. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13281>
- Qin, M., Zhu, C.-J., Yang, J.-B., Vatanparast, M., Schley, R., Lai, Q., Zhang, D.-Y., Tu, T.-Y., Klitgaard, B. B., Li, S.-J., & Zhang, D.-X. (2020). Comparative analysis of complete plastid genome reveals powerful barcode regions for identifying wood of *Dalbergia odorifera* and *D. tonkinensis* (Leguminosae). *Journal of Systematics and Evolution*, jse.12598. <https://doi.org/10.1111/jse.12598>
- R Core Team. (2020). *R: A language and environment for statistical computing*. manual. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.

- Rahaingoson, F. R., Oyebanji, O., Stull, G. W., Zhang, R., & Yi, T.-S. (2022). A dated phylogeny of the pantropical genus *Dalbergia* L.f. (Leguminosae: Papilionoideae) and its implications for historical biogeography. *Agronomy*, *12*(7), 1612. <https://doi.org/10.3390/agronomy12071612>
- Ramírez-Barahona, S., & Eguiarte, L. E. (2013). The role of glacial cycles in promoting genetic diversity in the Neotropics: The case of cloud forests during the Last Glacial Maximum. *Ecology and Evolution*, *3*(3), 725-738. <https://doi.org/10.1002/ece3.483>
- Ribeiro, R. A., Lavin, M., Lemos-Filho, J. P., Filho, C. V. M., dos Santos, F. R., & Lovato, M. B. (2007). The genus *Machaerium* (Leguminosae) is more closely related to *Aeschynomene* Sect. *Ochopodium* than to *Dalbergia*: Inferences from combined sequence data. *Systematic Botany*, *32*(4), 762-771. <https://doi.org/10.1600/036364407783390700>
- Richter, H. G., Krause, V.-J., & Muche, C. (1996). *Dalbergia congestiflora* Standl.: Wood structure and physico-chemical properties compared with other Central American species of *Dalbergia*. *IAWA Journal*, *17*(3), 327-341. <https://doi.org/10.1163/22941932-90001583>
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, *61*(3), 539-542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Rudd, V. E. (1995). New combinations and a new variety in Mesoamerican *Dalbergia* (Fabaceae: Papilionoideae). *Novon*, *5*(4), 368-369.
- Rudd, V. E. (2001). *Dalbergia* L. f. En *Flora de Nicaragua* (Vol. 58).
- Ruíz-Mazariegos, P. I. (2017). *Estudio fenológico y botánico de las especies Swietenia macrophylla King., Dalbergia stevensonii Standl. Y Dalbergia tucurensis Donn. Smith. En el Departamento del Petén, Diagnóstico y servicios prestados en el laboratorio forense forestal de la FAUSAC, Guatemala, C.A.* [Tesis doctoral, Universidad de San Carlos de Guatemala]. Guatemala.
- Rzedowski, J., & Guridi-Gómez, L. (1988). El palo escrito, árbol de madera preciosa - Una nueva especie mexicana de *Dalbergia* (Leguminosae, Papilionoideae). *Acta Botanica Mexicana*, *4*, 1-8.
- Shen, W., Le, S., Li, Y., & Hu, F. (2016). SeqKit: A cross-platform and ultrafast toolkit for FASTA/Q file manipulation (Q. Zou, Ed.). *PLOS ONE*, *11*(10), e0163962. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163962>

2 *Molecular species delimitation in the Dalbergia congestiflora (Papilionoideae) clade reveals regional endemism and cryptic diversity*

- Sotuyo, S., Pedraza-Ortega, E., Martínez-Salas, E., Linares, J., & Cabrera, L. (2022). Insights into phylogenetic divergence of *Dalbergia* (Leguminosae: Dalbergiae) from Mexico and Central America. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *10*, 910250. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.910250>
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, *30*(9), 1312-1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>
- Stucky, B. J. (2012). SeqTrace: A graphical tool for rapidly processing DNA sequencing chromatograms. *Journal of Biomolecular Techniques : JBT*, *23*(3), 90-93. <https://doi.org/10.7171/jbt.12-2303-004>
- Sukumaran, J., Holder, M. T., & Knowles, L. L. (2021). Incorporating the speciation process into species delimitation (T. G. Barraclough, Ed.). *PLOS Computational Biology*, *17*(5), e1008924. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1008924>
- Vardeman, E., & Runk, J. V. (2020). Panama's illegal rosewood logging boom from *Dalbergia retusa*. *Global Ecology and Conservation*, *23*, e01098. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2020.e01098>
- Vatanparast, M., Klitgård, B. B., Adema, F. A., Pennington, R. T., Yahara, T., & Kajita, T. (2013). First molecular phylogeny of the pantropical genus *Dalbergia*: Implications for infrageneric circumscription and biogeography. *South African Journal of Botany*, *89*, 143-149. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.07.001>
- Vitecek, S., Kućinić, M., Previšić, A., Živić, I., Stojanović, K., Keresztes, L., Bálint, M., Hoppeler, F., Waringer, J., Graf, W., & Pauls, S. U. (2017). Integrative taxonomy by molecular species delimitation: Multi-locus data corroborate a new species of Balkan Drusinae micro-endemics. *BMC Evolutionary Biology*, *17*(1), 129. <https://doi.org/10.1186/s12862-017-0972-5>
- Wirth, W., & Duchene, S. (2022). Real-Time and remote MCMC trace inspection with beastiary (D. Falush, Ed.). *Molecular Biology and Evolution*, *39*(5), msac095. <https://doi.org/10.1093/molbev/msac095>
- Young, M. K., Smith, R., Pilgrim, K. L., & Schwartz, M. K. (2021). Molecular species delimitation refines the taxonomy of native and nonnative physinine snails in North America. *Scientific Reports*, *11*(1), 21739. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-01197-3>
- Yu, G., Smith, D. K., Zhu, H., Guan, Y., & Lam, T. T.-Y. (2017). Ggtree: An R package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. *Methods in Ecology and Evolution*, *9*.

2 *Molecular species delimitation in the Dalbergia congestiflora (Papilionoideae) clade reveals regional endemism and cryptic diversity*

- Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., & Stamatakis, A. (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29(22), 2869-2876. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt499>
- Zhao, X., Wang, C., Meng, H., Yu, Z., Yang, M., & Wei, J. (2020). *Dalbergia odorifera*: A review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology, and quality control. *Journal of Ethnopharmacology*, 248, 112328. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112328>

2 Molecular species delimitation in the *Dalbergia congestiflora* (*Papilionoideae*) clade reveals regional endemism and cryptic diversity

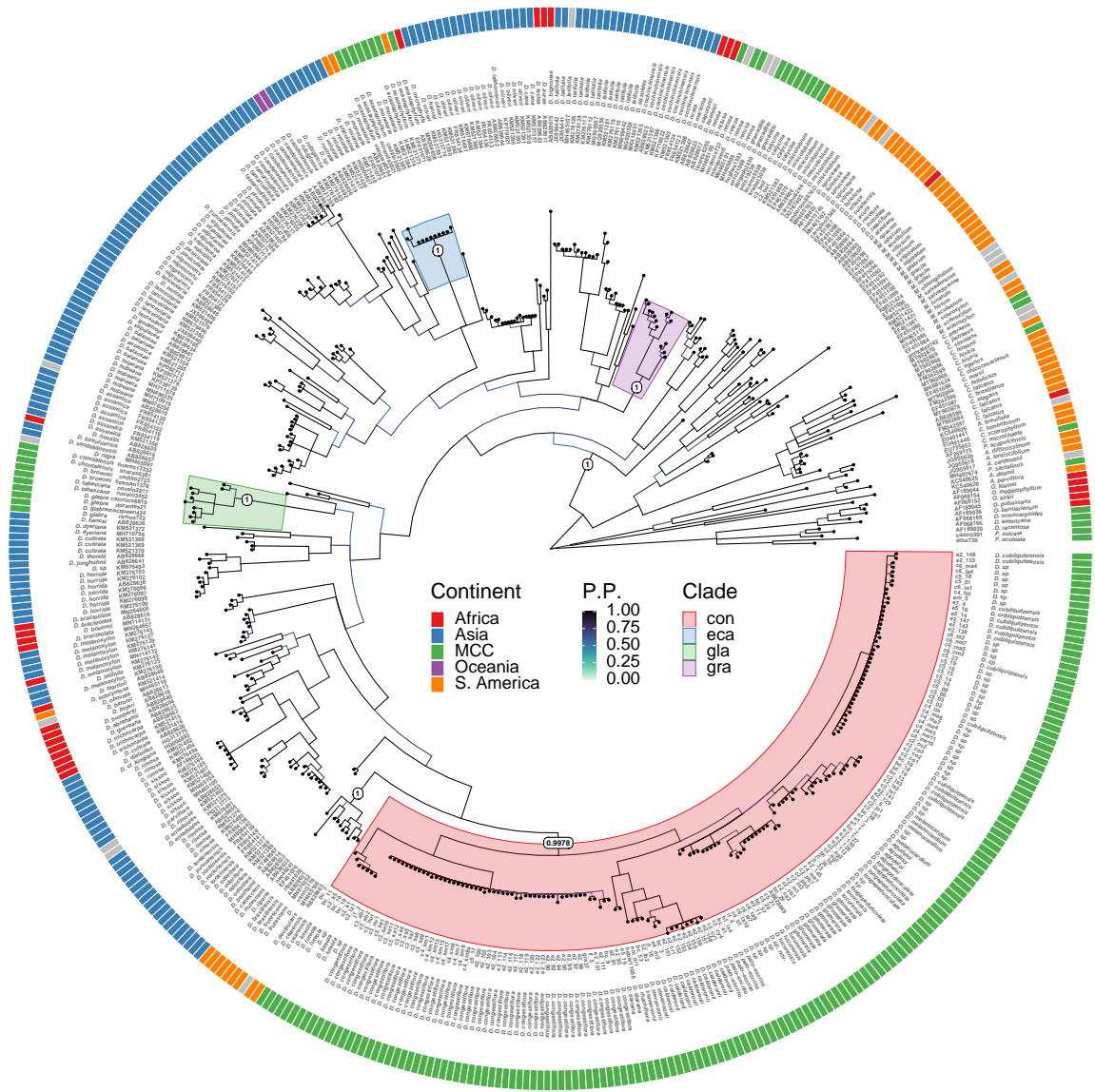


Figura 2.1: Bayesian tree with the nrITS loci for all *Dalbergia*. The highlighted clades correspond to the lineages from Mexico and Central America. The lineage in red is the *D. congestiflora* clade. The continent of each accession is shown at the external ring, accessions for which we are not sure of their location are in gray. Posterior probability are labeled for selected nodes.

2 Molecular species delimitation in the *Dalbergia congestiflora* (*Papilionoideae*) clade reveals regional endemism and cryptic diversity

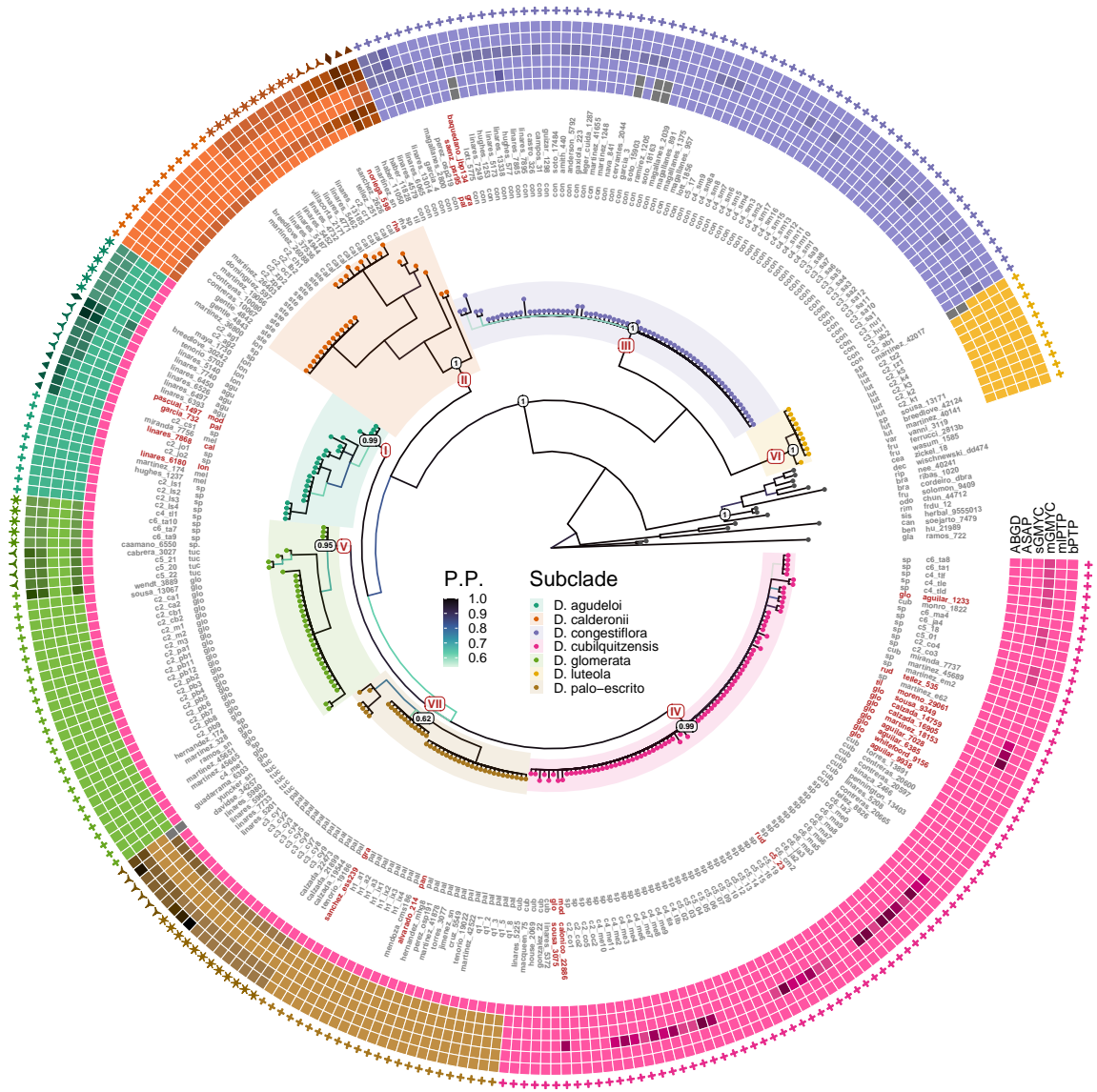


Figura 2.2: Bayesian tree of nrITS for the *Dalbergia congestiflora* clade. The seven subclades are highlighted in colors. The heat map plot rings represent each partition reported by the distinct methods. Similar color represents accessions that belong to the same partition and/or same species, the partition makes sense inside of each distinct method only. The external ring shows candidate species.

2 Molecular species delimitation in the *Dalbergia congestiflora* (*Papilionoideae*) clade reveals regional endemism and cryptic diversity

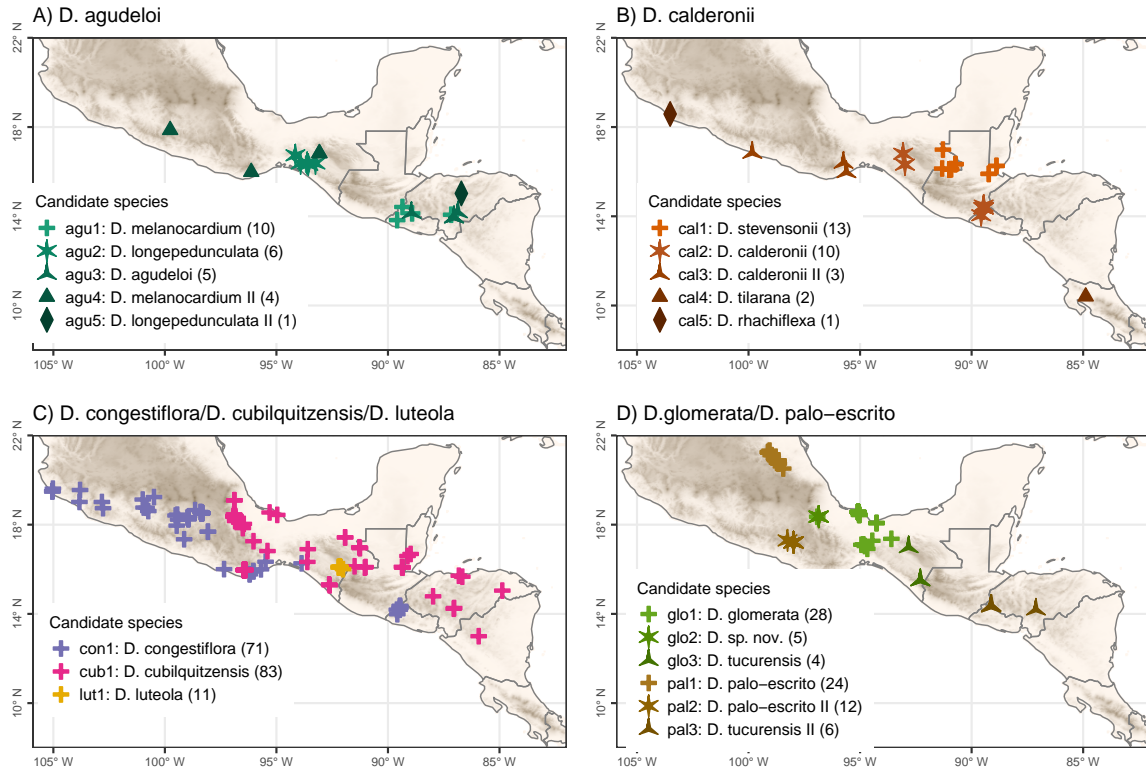


Figura 2.3: Distribution maps of subclades and candidate species of the *Dalbergia congestiflora* clade. The subclades with few candidate species are grouped into the same map (C and D). Each candidate species is highlighted with a distinct shape and color.

2 *Molecular species delimitation in the Dalbergia congestiflora (Papilionoideae) clade reveals regional endemism and cryptic diversity*

Cuadro 2.1: Characteristics of the sequence alignment used in this work. The all-dalbergia data set has only unique sequences to build the phylogeny in the context of all *Dalbergia*, while the congestiflora-only is focused in the samples of this work.

Dataset	Accessions	Alignment length	Missing percent	No. variable sites	Parsimony informative sites	AT content	GC content
all-dalbergia	475	799	23.22	440	370	0.36	0.64
congestiflora-only	314	653	6.16	170	124	352.00	648.00

3 DISCUSIÓN GENERAL

3.1 UTILIDAD Y EFICIENCIA DE LOS MARCADORES SELECCIONADOS

La propuesta de asociar regiones cortas del genoma a especies que ya conocemos, condujo al desarrollo de los códigos de barras genéticos, con el propósito de que regiones estandarizadas y bien caracterizadas del genoma nos ayuden a una rápida identificación de las especies (Hebert & Gregory, 2005). En plantas, no se ha logrado identificar una región que pueda servir como código de barras genético universal y que sea aplicable a todos los grupos, a diferencia de los animales donde el gen mitocondrial de la enzima Citocromo C Oxidasa 1 ha sido ampliamente empleada con este fin (Bhagwat et al., 2015; Hebert & Gregory, 2005).

Los marcadores que ensayamos en este trabajo, la región nuclear del *ITS*, han sido evaluados previamente en el género *Dalbergia* por su utilidad como códigos de barras genéticos, con el interés de poder identificar de forma expedita muestras de madera tomadas de los cargamentos incautados en las aduanas (Bhagwat et al., 2015; Hassold et al., 2016; He et al., 2019; M. Yu et al., 2017). Para el género *Dalbergia* en particular se ha reportado que la combinación de los loci *ITS2* y el espaciador *psbA-trnH* ofrece una eficiencia de de 100% para discriminar entre las distintas especies (He et al., 2019; M. Yu et al., 2017), no obstante en aquellos estudios el número de especies y de individuos por especies han sido pequeños. La ventaja de ambas regiones, es que al ser de tamaño pequeño, pueden ser amplificadas por PCR en muestras donde la cantidad o calidad del ADN no es óptima, como ocurre en aquellas muestras procedentes de ejemplares de herbario o de cargamentos de madera, donde por lo general el ADN se encuentra bastante degradado. Nosotros hemos empleado una región de mayor tamaño y con buenos resultados, pero además esta misma región es susceptible de ser amplificada en sus dos componentes por separado, pero para la caracterización de las especies creemos importante que se estudie la región completa,

comentamos esto, por que la mayoría de estudios de códigos de barras genéticos hace énfasis en sólo uno de los espaciadores, el *ITS2*.

Una de las principales críticas que se le hace a los estudios en códigos de barras es el que la mayoría de las veces se realizan con un muestreo limitado de individuos por especie, lo que puede conducir a conclusiones erróneas, al no haber documentado toda la variabilidad hay dentro y entre las especies. En este trabajo realizamos un muestreo exhaustivo para varias de las especies del grupo y cubrimos un amplio rango de su distribución geográfica, por lo cual hemos documentado razonablemente su variabilidad en estos marcadores. En este trabajo hemos encontrado que la región completa del ITS nuclear nos ayuda a poder discriminar entre las especies del clado *D. congestiflora*, lo cual es congruente con otros estudios como en el género *Alysicarpus* donde emplearon con éxito esta misma región para el mismo proposito (Gholami et al., 2020).

3.2 LIMITACIONES DE LA MORFOLOGÍA EN LA DISCRIMINACIÓN DE ESPECIES DEL GÉNERO *DALBERGIA*

En este trabajo hemos reportado discrepancias entre la especie determinada con base en la morfología de la especie candidata establecida genéticamente, inconsistencias que se presentaron aún muestras depositadas en las distintas colecciones y curadas por los especialistas. Esto puede deberse a que las diferencias morfológicas que existen entre las especies en el género *Dalbergia* en México y América Central región son mínimas (Braga de Oliveira et al., 1971; Rudd, 1995). Pero también a que los estudios que actualmente existen respecto a estas especies aún son insuficientes para documentar su variabilidad morfológica. Debido al pequeño tamaño de sus flores y a que no siempre se tienen a la mano los frutos, muchas de las claves dicotómicas para estas especies, se han elaborado tomando en cuenta la forma y número de los foliolos, pero estudios morfométricos han documentado que no son capaces para discriminar entre las especies del género *Dalbergia* (Hassold, 2015). La morfología de los folios ha sido un carácter con alta plasticidad fenotípica, y en el género *Dalbergia* esta se presenta como respuesta a las condiciones ambientales (de Morais et al., 2019; Moreira et al., 2013), por esto es posible que el mayor número de imprecisiones en la determinación de las especies se haya dado entre *D. glomerata* y *D. cubilquitzensis*, dos especies no solo cercanas filogenéticamente pero que además comparten el mismo hábitat (Figuras 2.2 y 2.3).

Los problemas de determinación incorrecta no solo se presentaron entre especies cercanas, también lo encontramos entre especies de clados distintos, por ejemplo en el ejemplar de Linares 7868 (MEXU) que en un inicio se determinó como *D. calycina* pero por su secuencias resultó afín a *D. melanocardium* y el ejemplar de Araque s.n. (MEXU) que fue determinado como *D. tucurensis* pero que resultó ser *D. calycina*. También existen ejemplos de determinación errónea a nivel de género como el caso *D. palo-escrito* de Alvarado 214(MEXU) que había sido determinado en un inicio como *Acosmium panamense*. Los mayores problemas de este tipo se presentaron en las muestras del inventario nacional forestal, donde varias de ellas resultaron géneros distintos a *Dalbergia*, lo cual es entendible porque por lo común durante la realización de los inventarios forestales sólo es posible obtener material vegetativo, sin flores ni frutos, a partir del cual la determinación a nivel de género puede ser imprecisa y prácticamente imposible a nivel de especie (Hassold, 2015; Hassold et al., 2016).

3.3 RELACIONES FILOGENÉTICAS

El análisis bayesiano para el marcador de *ITS*, corrobora la existencia de los cuatro clados en los que se agrupan las especies de *Dalbergia* en México y América Central, y que previamente fueron reportados por Sotuyo et al. (2022), mediante el empleo de los marcadores *ITS*, *matK* y *rbcL*. Del mismo modo, este análisis muestra que el grupo hermano de las especies del clado *D. congestiflora*, lo constituyen las especies sudamericanas de la sección *Triptolemea*, tal como consistentemente como ha sido reportado en trabajos previos aunque con muestreos más limitados (Ribeiro et al., 2007; Sotuyo et al., 2022; Vatanparast et al., 2013).

La distinción morfológica entre las especies del clado *D. congestiflora* respecto a las especies de la sección *Triptolemea* no es apenas sutil, tal como podemos corroborar por la descripción propuesta por Carvalho (1997) para esta sección. Por ello, es necesario realizar estudios comparativos entre ambos grupos, para comprobar si existen caracteres diagnósticos entre ellos, por el momento lo que sí es claro es que su distribución geográfica respalda su distinción filogenética. Las especies del clado *D. congestiflora* se restringen a México y América Central, mientras que las de la sección *Triptolemea* están confinadas a América del Sur. La relación entre el clado *D. congestiflora* y la sección *Triptolemea* es un patrón muy común en muchos géneros del Neotrópico en el cual se han documentado

eventos de dispersión entre América Central y América del sur y viceversa, en un intercambio que ha estado presente por lo menos desde hace 60 millones de años (Antonelli et al., 2018). Este resultado es congruente con la hipótesis del origen del género *Dalbergia* en América del Sur durante el Mioceno medio (Rahaingoson et al., 2022; Sotuyo et al., 2022; Vatanparast et al., 2013).

Al interior del clado *D. congestiflora* las especies adaptadas a condiciones más estacionales se encuentran en la base del clado, mientras que aquellas que habitan en áreas más húmedas son más derivadas; este parece ser un patrón recurrente en varios géneros y para el Neotrópico ha sido documentado en *Platymiscium*, un género del clado *Dalbergiae*, donde la migración hacia nuevas regiones y el cambio de hábitat son procesos que han fomentado su diversificación (Saslis-Lagoudakis et al., 2008). Este patrón puede observarse en los resultados del análisis filogenéticos, no obstante pensamos que debe formalizarse con estudios de mapeo de caracteres sobre la filogenia para poder corroborar esta hipótesis.

3.4 HISTORIA EVOLUTIVA DEL CLADO *DALBERGIA*

CONGESTIFLORA

El origen del género *Dalbergia* se ha propuesto en América del Sur (Vatanparast et al., 2013), y la separación entre el clado *D. congestiflora* se estima que ocurrió hace entre 9.07 Ma y 16.01 Ma durante el Mioceno (Sotuyo et al., 2022). Este periodo de tiempo coincide con varias disyunciones transoceánicas reportadas para distintos géneros de Leguminosas entre los 6 y los 16 Ma, lo que apoya la idea de que la dispersión transoceánica, y no la vicarianza, fue el proceso que determinó estos patrones (Lavin et al., 2004, 2005; R. T. Pennington et al., 2006). Durante esta ventana de tiempo se encuentra el periodo conocido como óptimo climático del Mioceno que sucedió entre los 14.7 Ma y los 16.9 Ma, este fue un periodo de tiempo durante el cual las temperaturas globales fueron mucho más altas, y se favoreció la expansión de la vegetación adaptada a climas cálidos y húmedos, y la de los bosques esclerófilos (Steinhorsdottir et al., 2021). Estos resultados también son consistentes con estudios que indican que aunque el Istmo de Panamá no se cerró completamente hasta hace 3 a 3.5 Ma (Coates & Obando, 1996), antes de esto existió de islas que conectaban América del Norte y América del Sur, el cual ha estado presente por lo menos desde hace 30 Ma, estas masas de tierra intermedia permitieron la migración de

3 *Discusión general*

plantas y animales entre ambos continentes (O’Dea et al., 2016). Para algunas especies del clado *D. congestiflora* se ha documentado que la unidad de dispersión es el fruto, la cual es una sámara que principalmente por se dispersa por el viento (Ibarra-Manríquez et al., 2015), esta es una vaina indehisciente que no libera la semilla y que mantiene un amplia área que también facilita su flotación en el agua (obs. pers.). El arrastre de restos de vegetación se acumula en los bancos de los ríos, y que tiene la capacidad para flotar, ha demostrado ser un mecanismo efectivo de dispersión a larga distancia en muchos grupos de organismos (Thiel & Haye, 2006).

En un capítulo anterior hemos señalado el patrón biogeográfico observado en el clado *D. congestiflora*, donde las especies más basales, *D. congestiflora* y *D. luteola*, habitan en el bosque tropical estacionalmente seco, en cambio, las especies más derivadas habitan en ambientes más húmedos, como el bosque tropical lluvioso y el bosque nuboso, las cuales son las siete especies candidatas de los subclados *D. cubiltquizensis*, *D. glomerata* y *D. palo-escrito*. Lo cual sugiere que estas últimas se originaron a partir de ancestros que habitaban ambientes más estacionales, y que este cambio de uno a otro bioma fue un factor que promovió su diversificación. Esta hipótesis se sostiene por el hecho de que las especies del clado *D. congestiflora* pierden completamente las hojas antes del periodo de floración (Ruíz-Mazariegos, 2017; Rzedowski & Guridi-Gómez, 1988), lo cual puede ser una característica retenida de cuando sus ancestros habitaban bosques tropicales estacionalmente secos. Este patrón biogeográfico ha sido reportado en muchos grupos de leguminosas, particularmente a niveles superiores al del género, y se ha documentado que el cambio de condiciones más estacionales a condiciones de mayor humedad es el más frecuente (Schrire et al., 2005). Es raro encontrar este mismo patrón dentro de un mismo género, por que por lo general se asume que existe una conservación del hábitat, pero este patrón ha sido reportado en *Platymiscium* (Saslis-Lagoudakis et al., 2008), un género cercano *Dalbergia*, con el cual también comparte su origen en América del Sur y su posterior migración hacia México y América Central.

El último ancestro común para las especies del clado *D. congestiflora*, se ha estimado que pudo habitar a finales del Mioceno hace entre 6.7 y 12.7 Ma, en cambio su diversificación es algo más reciente, pues la mayoría de de las especies tiene una edad menor a 5 Ma (Sotuyo et al., 2022). No es posible atribuir a uno o pocos eventos clave los procesos de especiación que han acontecido en el Neotrópico, por el contrario estos son el resultado de tendencia ecológicas y evolutivas iniciadas por los eventos tectónicos del Neógeno y

de la reorganización paleogeográfica, los cuales se han mantenidos por la acción de los cambios climáticos del Pleistoceno (Rull, 2011, 2015).

Algunos estudios que han documentado el efecto de las glaciaciones en el territorio Mexicano reportan una disminución de la línea de equilibrio de los glaciares en los picos de las montañas de hasta 1500 m durante el último máximo glacial respecto a los valores actuales (Vázquez-Selem & Lachniet, 2017). Estos cambios ocasionaron una reorganización de los pisos de vegetación, donde el límite del bosque de *Pinus* descendió hasta los 3000 m de altitud, unos 1000 m más bajo que la posición actual, y el límite superior para los bosques de *Quercus* paso de los 3050 m actuales hasta cerca de los 2150 m de altitud durante el último máximo glacial (Lozano-García et al., 2019). No está documentado el efecto de estos cambios en pisos altitudinales más bajos, fuera de una disminución en el nivel del mar, y la presencia de un mayor número de especies que actualmente habitan en regiones montanas en los bosques tropicales de baja altitud en el Amazonas (Colinvaux et al., 2000). A parte de la migración altitudinal durante los periodos más fríos y secos del Cuaternario, algunas comunidades vegetales como el bosque húmedo de montaña o bosque mesófilo tuvieron un desplazamiento en longitud y altitud, para mantenerse en aquellas laderas de las montañas que mantuvieron unas condiciones mínimas de humedad (Guevara, 2020).

Sin lugar a duda, los eventos antes descritos tuvieron un impacto demográfico y genético en las poblaciones de muchas especies, lo que a largo plazo pudo haber promovido la diversificación de varios linajes. Con esta premisa en mente, proponemos el siguiente escenario evolutivo para las especies del clado *Dalbergia congestiflora*. Postulamos que el centro de origen de este clado puede localizarse en las tierras bajas y estacionales en algún lugar de la costa del Pacífico, en los alrededores de la sierra madre del sur, lo cual es respaldado no sólo por el hecho de que los haplotipos más centrales de este clado encuentran en esta área, pero también por que los haplotipos que se comparten con las especies de América del Sur se localizan en la costa de Jalisco. Los cambios altitudinales de la vegetación como consecuencia de las glaciaciones motivaron que algunas poblaciones ocuparan ambientes menos secos como las selvas medianas, lo cual es congruente con que las especies del subclado *D. agudeloii* que crecen estos ambientes se encuentran filogenéticamente en una posición intermedia. A partir de aquí, esos mismos movimientos altitudinales llevaron a estas poblaciones adaptadas a ambientes húmedos a conquistar los bosques tropicales lluviosos de tierras bajas y a mayor altitud los bosques húmedos de

3 Discusión general

montaña. La mayoría de las especies que ocupan estos ambientes, se encuentran en los tres subclados más derivados: *D. cubilquitzensis*, *D. glomerata* y *D. palo-escrito*.

Este es el escenario general, pero los cambios de bioma probablemente ocurrieron en más de una ocasión. En el subclado *D. agudelo*, la especie candidata *D. agudelo* es la única que se distribuye en el bosque tropical estacionalmente seco, mientras que el resto lo hace preferentemente en selvas medianas en altitudes cercanas a los 100 m, así que probablemente esta especie pudo haber reconquistado su ambiente ancestral. La morfología de sus hojas así lo sugiere, pues presenta un gran número de foliolos, como es característico en especies de ambientes húmedos, no obstante, estos se han reducido considerablemente en tamaño, probablemente como una adaptación a condiciones más estacionales. Otros ejemplos son *D. stevensonii* y *D. tilarana*, del subclado *D. calderonii*, mientras esta última pudo alcanzar los bosques húmedos de montaña siguiendo el patrón anteriormente propuesto. El escenario más probable para *D. stevensonii* es haber migrado directamente de los ambientes estacionales secos de las selvas bajas del Pacífico, a las selvas húmedas en el Atlántico, esto se apoya en el hecho de que sus especies hermanas son los dos linajes de *D. calderonii*, que habitan en ambientes secos del Pacífico. Pero además, por que es la única especie de ambientes húmedos que presenta un número reducido foliolos aunque estos son de gran tamaño, en promedio cinco para esta especie mientras que en las especies adaptadas a ambientes húmedos lo común es que presenten más de ocho.

Por otra parte, *Dalbergia glomerata* pudo haber conquistado los ambientes húmedos de tierras bajas, a partir de una migración altitudinal de poblaciones ancestrales en el bosque húmedo de montaña. Esto es respaldado por que todas las especies de bosques de niebla se concentran en los subclados *D. glomerata* y *D. palo-escrito*, que son grupos hermanos, así que una hipótesis parsimoniosa es pensar en un un origen común para todas ellas. Y por el hecho de que *D. glomerata* a pesar de ser simpátrica con *D. cubilquitzensis*, en el Golfo de México, no son especies hermanas.

Bajo este escenario, las tres especies del bosque tropical lluvioso que habitan en las costas del Atlántico, pudieron haber alcanzado ese ambiente por vías distintas. *Dalbergia cubilquitzensis* es probablemente la más antigua por lo cual ha podido alcanzar una amplia distribución, mientras que las migraciones de *D. glomerata* y *D. stevensonii* son más recientes, y no han logrado ocupar toda el área potencial habitable desde centro de Veracruz hasta la zona del Petén en Guatemala y Belice, que algunos autores consideran como un continuo de vegetación (Morrone et al., 2002). Claro que otros factores como requerimientos edafológicos específicos también podrían explicar la limitada distribución de *D.*

3 *Discusión general*

glomerata y *D. stevensonii*, pues se sabe que esta última prefiere suelos poco profundos de origen calcáreo (Ruíz-Mazariegos, 2017).

4 CONCLUSIONES

El empleo de la región nuclear completa del *ITS* es capaz de discriminar entre las especies del clado *D. congestiflora*, lo que muestra la utilidad del uso de marcadores moleculares para la delimitación de especies en grupos taxonómicamente complejos como en el género *Dalbergia*. Señalar esto es importante porque uno de los mayores problemas respecto al manejo y conservación de la biodiversidad es que no hemos logrado documentar la totalidad de especies que existen. Lo cual es aún más relevante en grupos vulnerables y en riesgo de extinción como en el caso de nuestro grupo de estudio. Estos resultados son de gran utilidad para aplicaciones de carácter forense, en los cuales se requieren técnicas de identificación rápidas, efectivas y confiables, por ejemplo cuando se requiera identificar muestras de madera de estas especies en puertos aduaneros o cuando se requiera certificar productos terminados. Todo ello redundará en el fortalecimiento y el efectivo cumplimiento de las leyes y regulaciones tanto locales como internacionales, por lo que contribuirán a la conservación de estas especies.

Nuestros resultados también corroboran que nuestro conocimiento respecto a las especies del género *Dalbergia* en México y América Central es aún muy limitado. Para muchas de las especies no contamos actualmente con colectas suficientes que documenten su gama de variación, y la gran mayoría no se han estudiado a detalle, por ello aún es difícil separar a las especies únicamente con caracteres morfológicos. Por otra parte, hemos encontrado un mayor número de especies candidatas que las que actualmente se reconocen con base en la morfología, lo que da indicios de la existencia de diversidad críptica en este clado, una situación que debe abordarse a detalle en el futuro. Por ello recomendamos una revisión del género en la región con estudios taxonómicos integrales, que exploren distintas líneas de evidencia para delimitar a las especies, lo cual probablemente conducirá a la descripción de nuevas especies y a la correcta circunscripción de otras, pero sobre todo ayudará a la formalización de las especies candidatas que hemos propuesto.

4 Conclusiones

En este trabajo hemos esbozado algunas ideas de cómo este clado pudo haberse diversificado en México y América Central, sin embargo su historia evolutiva es compleja y aún existe mucho por conocer, por lo cual son necesarios estudios con un marcado enfoque evolutivo, como los estudios de carácter filogeográfico, o bien estudios biogeográficos formales como la reconstrucción de áreas o hábitats ancestrales, las cuales son necesarias para corroborar o refutar las hipótesis que hemos planteado al respecto. En este trabajo hemos encontrado que que la mayoría de las especies de este clado es de distribución restringida o micro endémica, y aún cuando indudablemente hace falta un muestreo más exhaustivo para estas especies, consideramos que estos hechos deben ser tomados en cuenta a la hora de evaluar su estado de riesgo y vulnerabilidad, y por lo tanto actualizar la normativa correspondiente para proteger a estas especies.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antonelli, A., & Sanmartín, I. (2011). Why are there so many plant species in the Neotropics? *Taxon*, 60(2), 403-414. <https://doi.org/10.1002/tax.602010>
- Antonelli, A., Zizka, A., Carvalho, F. A., Scharn, R., Bacon, C. D., Silvestro, D., & Condamine, F. L. (2018). Amazonia is the primary source of Neotropical biodiversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(23), 6034-6039. <https://doi.org/10.1073/pnas.1713819115>
- Arroyo, M. (1981). Breeding systems and pollination biology in Leguminosae. En B. Klitgaard & A. Bruneau (Eds.), *Advances in Legume Systematics, Part 2* (pp. 723-770). Royal Botanic Gardens, Kew.
- Barraclough, T. G., & Humphreys, A. M. (2015). The evolutionary reality of species and higher taxa in plants: A survey of post-modern opinion and evidence. *New Phytologist*, 207(2), 291-296. <https://doi.org/10.1111/nph.13232>
- Barrett, M. A., Brown, J. L., Morikawa, M. K., Labat, J.-N., & Yoder, A. D. (2010). CITES designation for endangered rosewood in Madagascar. *Science*, 328(5982), 1109-1110. <https://doi.org/10.1126/science.1187740>
- Bonan, G. B. (2008). Forests and climate change: Forcings, feedbacks, and the climate benefits of forests. *Science*, 320(5882), 1444-1449. <https://doi.org/10.1126/science.1155121>
- Braga de Oliveira, A., Gottlieb, R., Ollis, W. D., & Rizzini, C. T. (1971). A phylogenetic correlation of the genera *Dalbergia* and *Machaerium*. *Phytochemistry*, 10, 1863-1876.
- Brooks, T. M., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., da Fonseca, G. A. B., Rylands, A. B., Konstant, W. R., Flick, P., Pilgrim, J., Oldfield, S., Magin, G., & Hilton-Taylor, C. (2002). Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. *Conservation Biology*, 16(4), 909-923. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2002.00530.x>

- Cardoso, D., de Lima, H. C., Rodrigues, R. S., de Queiroz, L. P., Pennington, R. T., & Lavin, M. (2012). The realignment of *Acosmium* sensu stricto with the Dalbergioid clade (Leguminosae: Papilionoideae) reveals a proneness for independent evolution of radial floral symmetry among early-branching papilionoid legumes. *Taxon*, 61(5), 1057-1073. <https://doi.org/10.1002/tax.615011>
- Cardoso, D., Pennington, R., de Queiroz, L., Boatwright, J., Van Wyk, B.-E., Wojciechowski, M., & Lavin, M. (2013). Reconstructing the deep-branching relationships of the papilionoid legumes. *South African Journal of Botany*, 89, 58-75. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.05.001>
- Cervantes-Maldonado, A. (2006). La conservación del granadillo de México, una carrera contra el tiempo. *Biodiversitas*, 128, 6-11.
- Coates, A. G., & Obando, J. A. (1996). The geologic evolution of the Central America isthmus. En J. B. C. Jackson, A. F. Budd & A. G. Coates (Eds.), *Evolution and Environment in Tropical America* (pp. 21-56). The University of Chicago Press.
- Colinvaux, P., De Oliveira, P., & Bush, M. (2000). Amazonian and neotropical plant communities on glacial time-scales: The failure of the aridity and refuge hypotheses. *Quaternary Science Reviews*, 19(1-5), 141-169. [https://doi.org/10.1016/S0277-3791\(99\)00059-1](https://doi.org/10.1016/S0277-3791(99)00059-1)
- de Lima, H. C. (1989). Tribu Dalbergiae (Leguminosae Papilionoideae) - Morfologia dos frutos, sementes e plântulas e sua aplicação na sistemática. *Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro*, 30, 1-42.
- de Queiroz, K. (2005). A unified concept of species and its consequences for the future of Taxonomy. *Proceedings of the California Academy of Sciences*, 59(18), 196-215.
- de Queiroz, K. (2007). Species Concepts and Species Delimitation. *Systematic Biology*, 56(6), 879-886. <https://doi.org/10.1080/10635150701701083>
- de Camino, R., & Morales, J. P. (Eds.). (2013). *Las plantaciones de teca en América Latina: Mitos y realidades*. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.
- Dobzhansky, T. (1935). A critique of the species concept in biology. *Philosophy of Science*, 2(3), 344-355.
- Doyle, J. J., Doyle, J. L., Ballenger, J. A., Dickson, E. E., Kajita, T., & Ohashi, H. (1997). A Phylogeny of the Chloroplast gene *RBC L* in the Leguminosae: Taxonomic correlations and insights into the evolution of nodulation. *American Journal of Botany*, 84(4), 541-554. <https://doi.org/10.2307/2446030>

- Gholami, A., Malik, S., Dhabe, A. S., Pandey, A. K., & Babbar, S. B. (2020). DNA barcoding of Indian Alysicarpus (Fabaceae): ITS alone distinguishes species. *Vegetos*, 33(3), 592-600. <https://doi.org/10.1007/s42535-020-00144-3>
- Hansen, M. C., Potapov, P. V., Moore, R., Hancher, M., Turubanova, S. A., Tyukavina, A., Thau, D., Stehman, S. V., Goetz, S. J., Loveland, T. R., Kommareddy, A., Egorov, A., Chini, L., Justice, C. O., & Townshend, J. R. G. (2013). High-Resolution global maps of 21st-century forest cover change. *Science*, 342(6160), 850-853. <https://doi.org/10.1126/science.1244693>
- Hartvig, I., Czako, M., Kjær, E. D., Nielsen, L. R., & Theilade, I. (2015). The Use of DNA Barcoding in Identification and Conservation of Rosewood (*Dalbergia* spp.) (H. T. Lumbsch, Ed.). *PLOS ONE*, 10(9), e0138231. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138231>
- Hartvig, I., So, T., Changtragoon, S., Tran, H. T., Bouamanivong, S., Theilade, I., Kjær, E. D., & Nielsen, L. R. (2017). Population genetic structure of the endemic rosewoods *Dalbergia cochinchinensis* and *D. oliveri* at a regional scale reflects the Indochinese landscape and life-history traits. *Ecology and Evolution*, 8(1), 530-545. <https://doi.org/10.1002/ece3.3626>
- Hassold, S. (2015). *Molecular identification of Malagasy Dalbergia species (rosewood) for biodiversity conservation* [Tesis doctoral, Eidgenössische Technische Hochschule Zürich]. Zürich, Suiza.
- Hausdorf, B. (2011). Progress toward a general species concept. *Evolution*, 65(4), 923-931. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2011.01231.x>
- He, T., Jiao, L., Yu, M., Guo, J., Jiang, X., & Yin, Y. (2019). DNA barcoding authentication for the wood of eight endangered *Dalbergia* timber species using machine learning approaches. *Holzforschung*, 73(3), 277-285. <https://doi.org/10.1515/hf-2018-0076>
- Hebert, P. D. N., & Gregory, T. R. (2005). The promise of DNA barcoding for Taxonomy (V. Savolainen, Ed.). *Systematic Biology*, 54(5), 852-859. <https://doi.org/10.1080/10635150500354886>
- Hey, J. (2006). On the failure of modern species concepts. *Trends in Ecology & Evolution*, 21(8), 447-450. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.05.011>
- Hughes, C. E., Lewis, G. P., Yomona, A. D., & work(s): C. R. R. (2004). Marañón. A new Dalbergioid legume genus (Leguminosae, Papilionoideae) from Peru. *Systematic Botany*, 29(2), 366-374.

- Ibarra-Manríquez, G., Matínez-Morales, M., & Corneo-Tenorio, G. (2015). *Frutos y semillas del bosque tropical perennifolio: región del los Truxtlas, Veracruz*. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad.
- Jenkins, A., Hewitt, J., & Malessa, U. (2012). Precious Woods: Exploitation of the Finest Timber. *Chatham House Workshop: Tackling the Trade in Illegal Precious Woods*.
- Kajita, T., Ohashi, H., Tateishi, Y., Bailey, C. D., & Doyle, J. J. (2001). rbcL and Legume phylogeny, with particular reference to Phaseoleae, Millettieae, and allies. *Systematic Botany*, 26, 23.
- Kapli, P., Lutteropp, S., Zhang, J., Kobert, K., Pavlidis, P., Stamatakis, A., & Flouri, T. (2017). Multi-rate Poisson Tree Processes for single-locus species delimitation under Maximum Likelihood and Markov Chain Monte Carlo. *Bioinformatics*, btx025. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx025>
- Knoblauch, B. (2001). *Estudio ecologico, silvicola y de utilizacion del granadillo (Dalbergia tucurensis J.D. Smith) en bosques latifoliados de Honduras* [Tesis doctoral, Zamorano]. Francisco Morazan, Honduras.
- Lavin, M., Herendeen, P. S., & Wojciechowski, M. F. (2005). Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the Tertiary (P. Linder, Ed.). *Systematic Biology*, 54(4), 575-594. <https://doi.org/10.1080/10635150590947131>
- Lavin, M., Pennington, R. T., Klitgaard, B. B., Sprent, J. I., de Lima, H. C., & Gasson, P. E. (2001). The dalbergioid legumes (Fabaceae): Delimitation of a pantropical monophyletic clade. *American Journal of Botany*, 88(3), 503-533. <https://doi.org/10.2307/2657116>
- Lavin, M., Schrire, B. P., Lewis, G. P., Pennington, R. T., Delgado-Salinas, A., Thulin, M., Hughes, C. E., Matos, A. B., & Wojciechowski, M. F. (2004). Metacommunity process rather than continental tectonic history better explains geographically structured phylogenies in legumes (P. T. Pennington, Q. C. B. Cronk & J. A. Richardson, Eds.). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 359(1450), 1509-1522. <https://doi.org/10.1098/rstb.2004.1536>
- Lewis, G. P., Wood, J. R. I., & Lavin, M. (2012). *Steinbachiella* (Leguminosae: Papilionoideae: Dalbergieae), endemic to Bolivia, is reinstated as an accepted genus. *Kew Bulletin*, 67(4), 789-796. <https://doi.org/10.1007/s12225-012-9415-z>
- Lozano-García, S., Caballero, M., Ortega-Guerrero, B., & Sosa-Nájera, S. (2019). Insights into the Holocene environmental history of the highlands of central Mexico. En N. Torrescano- Valle, G. A. Islebe & P. D. Roy (Eds.), *The Holocene and Anth-*

- ropocene Environmental History of Mexico* (pp. 97-114). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-31719-5_6
- LPWG. (2013). Legume phylogeny and classification in the 21st century: Progress, prospects and lessons for other species-rich clades. *Taxon*, 62(2), 217-248. <https://doi.org/10.12705/622.8>
- LWPG. (2017). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon*, 66(1), 44-77. <https://doi.org/10.12705/661.3>
- Martínez-Peralta, C., Gonzaga-Segura, J. A., & Arroyo-Cosultchi, G. (2022). Floral biology of two woody species of *Dalbergia* at high risk of timber extraction. *Brazilian Journal of Botany*, 45(2), 743-753. <https://doi.org/10.1007/s40415-022-00787-3>
- Mayden, R. L. (1997). A hierarchy of species concepts: The denouement in the saga of the species problem. En M. F. Claridge, H. A. Dawah & M. R. Wilson (Eds.), *Species: The units of diversity* (pp. 381-423). Chapman & Hall.
- Mayr, E. (1942). *Systematics and the Origin of de Species*. Columbia University Press.
- Moreira, A. S. F. P., Queiroz, A. C. L., Barros, F. d. V., Goulart, M. F., & Pires de Lemos-Filho, J. (2013). Do leaf traits in two *Dalbergia* species present differential plasticity in relation to light according to their habitat of origin? *Australian Journal of Botany*, 61(8), 592. <https://doi.org/10.1071/BT13248>
- Morrone, J. J., Espinosa, D., & Llorrente, J. (2002). Mexican biogeographic provinces: Preliminary scheme, general characterizations, and synonymies, 26.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., da Fonseca, G. A. B., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853-858. <https://doi.org/10.1038/35002501>
- Naomi, S.-I. (2011). On the integrated frameworks of species concepts: Mayden's hierarchy of species concepts and de Queiroz's unified concept of species: On the integrated frameworks of species concepts. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 49(3), 177-184. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2011.00618.x>
- Nee, S., May, R. M., & Harvey, P. H. (1994). The reconstructed evolutionary process. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 344(1309), 305-311. <https://doi.org/10.1098/rstb.1994.0068>
- Niyomdham, C. (2002). An account of *Dalbergia* (Leguminosae-Papilionoidae) in Thailand. *Thai Forest Bulletin (Botany)*, 30, 124-166.

- O'Dea, A., Lessios, H. A., Coates, A. G., Eytan, R. I., Restrepo-Moreno, S. A., Cione, A. L., Collins, L. S., de Queiroz, A., Farris, D. W., Norris, R. D., Stallard, R. F., Woodburne, M. O., Aguilera, O., Aubry, M.-P., Berggren, W. A., Budd, A. F., Cozzuol, M. A., Coppard, S. E., Duque-Caro, H., ... Jackson, J. B. C. (2016). Formation of the Isthmus of Panama. *Science Advances*, 2(8), e1600883. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600883>
- Pennington, R. T., Lewis, G. P., & Ratter, J. A. (2006). An overview of the plant diversity, biogeography and conservation of Neotropical savannas and seasonally dry forests. *Neotropical Savannas and Seasonally Dry Forests*, 29.
- Peréz Olvera, C. d. I. P. (1993). Anatomía de la madera de ocho especies de importancia en las artesanías del estado de Muchoacán. *Acta Botánica Mexicana*, 23, 103-136.
- Polhill, R. (1981). Dalbergiae. En R. Polhill & P. Raven (Eds.), *Advances in legume systematics, Part I* (pp. 233-242). Royal Botanic Gardens, Kew.
- Pons, J., Barraclough, T. G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D. P., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W. D., & Vogler, A. P. (2006). Sequence-based species delimitation for the DNA Taxonomy of undescribed insects (M. Hedin, Ed.). *Systematic Biology*, 55(4), 595-609. <https://doi.org/10.1080/10635150600852011>
- Randall, R. (2007). *The introduced flora of Australia and its weed status* (inf. téc.). CRC for Australian Weed Management. OCLC: 940622101.
- Regnier, L. (2019). Influence of harvest, processing, and substrate in the germination of *Dalbergia nigra* Seeds. *Journal of Horticulture and Plant Research*, 5, 30-37. <https://doi.org/10.18052/www.scipress.com/JHPR.5.30>
- Rull, V. (2011). Neotropical biodiversity: Timing and potential drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 26(10), 508-513. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.05.011>
- Rull, V. (2015). Pleistocene speciation is not refuge speciation (B. Riddle, Ed.). *Journal of Biogeography*, 42(3), 602-604. <https://doi.org/10.1111/jbi.12440>
- Saslis-Lagoudakis, C., Chase, M. W., Robinson, D. N., Russell, S. J., & Klitgaard, B. B. (2008). Phylogenetics of neotropical *Platymiscium* (Leguminosae: Dalbergieae): Systematics, divergence times, and biogeography inferred from nuclear ribosomal and plastid DNA sequence data. *American Journal of Botany*, 95(10), 1270-1286. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800101>
- Schrire, B., Lewis, G. P., & Lavin, M. (2005). Biogeography of the Leguminosae. En G. P. Lewis, B. MacKinder & M. Lock (Eds.), *Legumes of the world* (pp. 21-54). Royal Botanic Gardens.

- Seng, M., & Cheong, E. J. (2020). Comparative study of various pretreatment on seed germination of *Dalbergia cochinchinensis*. *Forest Science and Technology*, 16(2), 68-74. <https://doi.org/10.1080/21580103.2020.1758801>
- Shanker, K., Vijayakumar, S. P., & Ganeshiah, K. N. (2017). Unpacking the species conundrum: Philosophy, practice and a way forward. *Journal of Genetics*, 96(3), 413-430. <https://doi.org/10.1007/s12041-017-0800-0>
- Sousa, M., & De Sousa, M. P. (1981). New World Lonchocarpaceae. En R. Polhill & P. Raven (Eds.), *Advances in legume systematics, part I* (pp. 261-281). Royal Botanic Gardens, Kew.
- Sprent, J. I., Ardley, J., & James, E. K. (2017). Biogeography of nodulated legumes and their nitrogen-fixing symbionts. *New Phytologist*, 215(1), 40-56. <https://doi.org/10.1111/nph.14474>
- Standley, P. (1946). *Dalbergia* - Flora de Guatemala, part V. *Fieldiana*, 24(5), 201-208.
- Steel, M., & McKenzie, A. (2002). The 'shape' of phylogenies under simple random speciation models. En M. Lässig & A. Valleriani (Eds.), *Biological Evolution and Statistical Physics* (pp. 162-180, Vol. 585). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-45692-9_9
- Steinhorsdottir, M., Coxall, H. K., de Boer, A. M., Huber, M., Barbolini, N., Bradshaw, C. D., Burls, N. J., Feakins, S. J., Gasson, E., Henderiks, J., Holbourn, A. E., Kiel, S., Kohn, M. J., Knorr, G., Kürschner, W. M., Lear, C. H., Liebrand, D., Lunt, D. J., Mörs, T., ... Strömberg, C. A. E. (2021). The Miocene: The future of the past. *Paleoceanography and Paleoclimatology*, 36(4). <https://doi.org/10.1029/2020PA004037>
- Suárez-Islas, A., Capulín-Grande, J., & Mateo-Sánchez, J. J. (2020). Performance of *Dalbergia palo-escrito* Rzed. & Guridi-Gómez, a valuable timber tree, in a coffee plantation in Hidalgo, Mexico. *Bois & Forêts des Tropiques*, 344, 47-57. <https://doi.org/10.19182/bft2020.344.a31899>
- Talavera, G., Dincă, V., & Vila, R. (2013). Factors affecting species delimitations with the GMYC model: Insights from a butterfly survey (E. Paradis, Ed.). *Methods in Ecology and Evolution*, 4(12), 1101-1110. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12107>
- Thiel, M., & Haye, P. A. (2006). The ecology of rafting in the marine environment. III. biogeographical and evolutionary consequences. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 44, 323-429.
- Valencia-Ávalos, S. (1991). El problema de la especie. *Ciencias*, (241), 13-24.

- Vázquez-Selem, L., & Lachniet, M. (2017). The deglaciation of the mountains of Mexico and Central America. *Cuadernos de Investigación Geográfica*, 43(2), 553-570. <https://doi.org/10.18172/cig.3238>
- Villaseñor, J. L., & Ortiz, E. (2014). Biodiversidad de las plantas con flores (División Magnoliophyta) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 134-142. <https://doi.org/10.7550/rmb.31987>
- Wiemann, M. C., & Ruffinatto, F. (2012). *Separation of Dalbergia stevensonii from Dalbergia tucurensis* (inf. téc. N° FPL-RP-665). U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Forest Products Laboratory. Madison, WI. <https://doi.org/10.2737/FPL-RP-665>
- Wiley, E. O. (1978). The Evolutionary Species Concept Reconsidered. *Systematic Zoology*, 27(1), 17. <https://doi.org/10.2307/2412809>
- Wilkins, J. S. (2009). *Species: A history of the idea*. University of California Press.
- Wojciechowski, M. F., Lavin, M., & Sanderson, M. J. (2004). A phylogeny of legumes (Leguminosae) based on analysis of the plastid *matK* gene resolves many well-supported subclades within the family. *American Journal of Botany*, 91(11), 1846-1862. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.11.1846>
- Yassin, A., Markow, T. A., Narechania, A., O'Grady, P. M., & DeSalle, R. (2010). The genus *Drosophila* as a model for testing tree- and character-based methods of species identification using DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57(2), 509-517. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.08.020>
- Yu, M., Jiao, L., Guo, J., Wiedenhoef, A. C., He, T., Jiang, X., & Yin, Y. (2017). DNA barcoding of vouchered xylarium wood specimens of nine endangered *Dalbergia* species. *Planta*, 246(6), 1165-1176. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2758-9>
- Yule, G. (1925). A mathematical theory of evolution based on the conclusions of Dr. J. C. Willis, F.R.S. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 213, 21-87.
- Zhu, A. L. (2020). China's rosewood boom: A cultural fix to capital overaccumulation. *Annals of the American Association of Geographers*, 110(1), 277-296. <https://doi.org/10.1080/24694452.2019.1613955>
- Zou, S., Li, Q., Kong, L., Yu, H., & Zheng, X. (2011). Comparing the usefulness of distance, monophyly and character-based DNA barcoding methods in species identification: A case study of Neogastropoda (R. DeSalle, Ed.). *PLoS ONE*, 6(10), e26619. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026619>