



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ÁREA TEMÁTICA: ECOLOGÍA Y
CONSERVACIÓN**



**Variación genética y de morfología foliar de poblaciones
de *Balmea stormiae* Martínez (Rubiaceae) en la Faja Volcánica Transmexicana**

TESIS

Que presenta

BIOL. DULCE KARINA MEJÍA JIMÉNEZ

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Asesores:

DR. JUAN CARLOS MONTERO CASTRO

DR. ANTONIO GONZÁLEZ RODRÍGUEZ



Morelia, Michoacán, agosto de 2019

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta tesis fue posible gracias al apoyo de instituciones como el CONACYT y la Facultad de Biología, UMSNH y de participantes y amigos a los que a continuación agradezco sinceramente:

Al Dr. Juan Carlos Montero Castro por su excelente comprensión, apoyo, paciencia y facilidades que me brindó al dirigir mis tesis de Licenciatura y Maestría.

Al Dr. Antonio González Rodríguez por su valiosa participación, codirección y consejos para mejorar la tesis, así como su apoyo en el laboratorio de Genética de la Conservación del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad

A los integrantes del comité tutorial, la Dra. Sabina I. Lara Cabrera y los Dres. Eduardo Ruíz Sánchez y Luis Felipe Mendoza Cuenca por sus revisiones, sus valiosos comentarios y consejos para la realización de la tesis.

A todas las personas que me acompañaron y ayudaron de alguna manera en las colectas. Al Dr. Ramón Cuevas Guzmán, al Maestro Valente Sánchez y a José del Centro Universitario de la Costa sur, por su valioso apoyo, amabilidad y ayuda para la colecta en Jalisco. Al pasante de Biol. Alberto Rivera Ortiz, Al Biol. Daniel G. por su ayuda por sus contactos para las colectas de Zacapu.

A mi compañera del laboratorio de Sistemática Molecular de Plantas, la M.C. Ma. de la Luz Pérez García por su ayuda para la amplificación de los ISSR. También mis demás compañeros de laboratorio.

A la M.C. Goretty Mendoza por su asesoría para las pruebas con microsatélites en el IIES.

A mis profesores durante la maestría, por compartir su conocimiento y motivación. Así como al personal administrativo por su orientación y amabilidad.

A todos mis amigos por su amistad sincera, compañía, apoyo y los momentos de des estrés.

Al final y no por eso menos importante, al Biol. Ulises de la Paz Ruiz por su excelente apoyo en todas las colectas de campo, por su amor y siempre ser mi acompañante de aventuras y de vida. Al apoyo y amor incondicional, a mi familia, mis padres Antonio Mejía y Guadalupe Jiménez y mis hermanitas Sandra y Gabriela que estarán siempre en las buenas, en las malas y en las peores. También al señor Ramiro de la Paz y a la señora Elizabeth Ruiz, por todo su apoyo y por ser mi segunda familia. GRACIAS.

DEDICATORIA

A mi familia
Con gran amor, respeto y admiración

A Ulises
Con todo mi amor

A los buenos amigos
Con cariño

ÍNDICE

RESUMEN / ABSTRACT	I
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Clasificación taxonómica de <i>Balmea stormiae</i>	3
Descripción de la especie	4
Mecanismos de dispersión y reproducción	7
Distribución, hábitat y forma de crecimiento	7
Usos y amenazas para la especie	11
Variación genética y las fuerzas de la evolución	11
Técnicas para el estudio de la diversidad genética	12
Estudios de diversidad genética y filogeografía en Rubiáceas	13
Morfometría geométrica	15
HIPÓTESIS	17
OBJETIVOS	17
Objetivo general	17
Objetivos específicos	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Áreas de estudio y colecta	18
Extracción de ADN	22
Amplificación, visualización y secuenciación de los marcadores nucleares y de cloroplasto	22
Análisis de los datos de ADN nuclear y cloroplasto	23
Amplificación de ISSR	25
Análisis genéticos con ISSR	26
Análisis de la variación morfológica foliar	28
RESULTADOS	30
Diversidad y diferenciación genética con <i>rps16</i> y ETS	30
Redes de haplotipos y barreras genéticas con <i>rps16</i> y ETS	33
Prueba de Mantel con ETS y <i>rps16</i>	36
Diversidad genética con ISSR	37
Diferenciación y estructura genética con ISSR	39
Prueba de Mantel con los datos de ISSR	44
Análisis de morfometría geométrica foliar	45
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	53
Diversidad y diferenciación genética	53
Flujo genético y estructura genética	55
Expansión demográfica	56
Diferenciación morfológica	57
LITERATURA CITADA	59

RESUMEN / ABSTRACT

Balmea stormiae es una planta de familia Rubiaceae que se distribuye en pequeñas áreas aisladas en Centroamérica y México. Esta especie se encuentra en peligro de extinción de acuerdo con la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN). En este trabajo se estudiaron a las poblaciones de la Faja Volcánica Transmexicana en su porción occidente. Se utilizó el intrón *rps16* de cloroplasto, el espaciador transcrito externo de ADN ribosomal nuclear (ETS) y siete Inter Secuencias Simples Repetidas de ADN nuclear (ISSR) para evaluar la diversidad genética. Adicionalmente, se analizó la variación en la morfología y su relación con las condiciones climáticas de los sitios, y la variación en el área foliar. Los tres tipos de marcadores revelan diferenciación genética entre Jalisco y Michoacán atribuida a la baja conectividad entre estas y a la baja capacidad de dispersión de semillas y polen a larga distancia. El ETS y las ISSR indican que Michoacán presenta variación entre y dentro de sus poblaciones con información genética compartida y también exclusiva, además de flujo genético moderado. Las pruebas de neutralidad y la red de haplotipos con ETS revelan que la especie se encuentra bajo expansión demográfica, especialmente la población de Zacapu presenta los valores más altos negativos y significativos con D de Tajima y F_s de Fu. Lo anterior coincide con la actividad volcánica del Holoceno que indica que *B. stormiae* colonizó recientemente ese pedregal. Además, podría estar relacionado con la ocupación del pedregal por grandes asentamientos prehispánicos desde hace 569-769 años hasta la época de la conquista, lo cual pudo tener un impacto en la reducción poblacional de la especie con una posterior expansión. Por otro lado, el análisis morfométrico revela que existe diferenciación en la forma de las hojas que es congruente con la distancia geográfica entre regiones y con la diferenciación genética encontrada. Sin embargo, la prueba de Mantel indica que estas relaciones no son significativas, por lo que la diferenciación morfológica es atribuida a las condiciones climáticas de los sitios. Se encontró que la variación mensual en la evapotranspiración y la precipitación anual influyen en la forma de las hojas. Las poblaciones de Zacapu y Arocútlán tienen la mayor variación mensual en evapotranspiración y son redondeadas en la base y agudas en la punta. En cambio, las hojas de la Sierra de Manantlán y Nuevo San Juan Parangaricutiro son cordadas en la base con puntas menos agudas, además de que estas poblaciones presentan la mayor precipitación. Finalmente se encontró que existen diferencias significativas en el área foliar entre Michoacán y Jalisco, además las poblaciones que presentan mayor diferenciación son la Sierra de Manantlán y Zacapu.

Palabras clave: Malpaís, Jalisco, Michoacán, rupícola, hemiepífita.

Balmea stormiae is a plant of Rubiaceae family distributed in small isolated areas in Central America and Mexico and is an endangered species according to the International Union for Conservation of Nature (IUCN). The populations of the Trans-Mexican Volcanic Belt in its western portion were studied. The chloroplast rps16 intron, the external transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA (ETS) and seven Inter-Simple Sequences Repeats of nuclear DNA (ISSR) were used to assess genetic diversity. Additionally, the variation in morphology and its relationship with the climatic conditions of the sites and leaf area differences were analyzed. The three types of markers reveal genetic differentiation between Jalisco and Michoacán attributed to the low connectivity between them and the low dispersal capacity of seeds and pollen over a long distance. The ETS and the ISSR markers indicate that Michoacán presents variation between and within its populations with shared and also exclusive genetic information, in addition to moderate genetic flow. Neutrality tests and the haplotype network of ETS reveal that the species is under demographic expansion, especially the population of Zacapu has the highest negative and significant Tajima's D and Fu's F_s values. This is consistent with the volcanic activity of the Holocene that indicates that *B. stormiae* recently colonized that rocky outcrop. In addition, it could be related to the occupation of that area by large pre-Hispanic settlements from 569-769 years until the conquest, which had an impact on the population reduction of the species with a subsequent expansión. On the other hand, there is differentiation in the shape of the leaves that is congruent with the geographical distance between regions and with the genetic differentiation found, however, the Mantel test indicates that these relationships are not significant. On the other hand, morphometric analysis reveals differentiation in the shape of the leaves that is congruent with the geographical distance between regions and with the genetic differentiation found here, however, the Mantel test indicates that these relationships are not significant. On the other hand, morphometric analysis reveals differentiation in the shape of the leaves that is congruent with the geographical distance between regions and the genetic differentiation found here. However, the Mantel test indicates that these relationships are not significant, so the morphological differentiation is attributed to the climatic conditions of the sites. It was found that the monthly variability in potential evapotranspiration and annual precipitation influence the shape of the leaves. The populations of Zacapu and Arocutin have the greatest monthly variability in potential evapotranspiration and their leaves are rounded at the base and acute at the tip. In contrast, the leaves of the Sierra de Manantlán and Nuevo San Juan Parangaricutiro are cordate at the base with less sharp points, in addition these populations have the highest annual precipitation. Finally, it was found that there are significant differences in the leaf area between Michoacan and Jalisco, in addition the populations that show the greatest differentiation are Sierra de Manantlan and Zacapu.

INTRODUCCIÓN

La diversidad genética es la variación en el material genético (nucleótidos, genes y cromosomas) de una población, de una especie o entre especies (Frankham et al., 2002). Es el nivel fundamental de la biodiversidad, debido a que constituye la materia prima sobre la que actúan los procesos evolutivos; además, provee a las poblaciones la potencialidad de sobrevivir y adaptarse a largo plazo a las presiones de selección causadas por los cambios en el ambiente (Barrett y Kohn, 1991; Hunter y Gibbs, 2007). Dichos cambios ambientales pueden estar dados por diversos factores como oscilaciones climáticas históricas, desastres naturales pasados o actuales, o por la perturbación causada por el humano.

El aumento demográfico del humano durante los últimos años ha influido negativamente sobre los ecosistemas debido al cambio de uso de suelo y a la explotación desmedida de los recursos naturales. Esto ha causado la disminución en el tamaño de las poblaciones y una acelerada pérdida de especies. El tamaño poblacional es un aspecto muy importante para la diversidad genética, ya que las poblaciones grandes tienden a ser más variables genéticamente (Gaston, 2010). Sin embargo, cuando estas poblaciones grandes se ven afectadas por la fragmentación del hábitat o por eventos estocásticos como las catástrofes naturales, pueden llegar a experimentar una fuerte reducción en su tamaño (proceso mejor conocido como cuello de botella). Como resultado, se obtendrán poblaciones muy pequeñas sobre las que la deriva genética actuará con mayor fuerza, de tal manera que, con los cambios en las frecuencias alélicas se puede disminuir la heterocigosidad y aumentar la homocigosidad (Eguiarte, 1986). Esta disminución en la heterocigosidad y aumento en la homocigosidad de alelos deletéreos, son causadas por la endogamia, una situación en la que se presenta el apareamiento entre individuos con alto nivel de parentesco. La endogamia, puede tener como consecuencia directa una reducción en la reproducción y sobrevivencia debida a la acción de la selección natural sobre los alelos perjudiciales; a esta condición se le conoce como depresión por endogamia, fenómeno que podría causar la extinción de una población (Frankham et al., 2002).

Ante esta problemática han surgido disciplinas como la genética de la conservación, que se encarga de evaluar la variación genética, en particular de las especies que se encuentran en alguna categoría de riesgo. Por otro lado, el estudio de la morfología resulta complementario a los análisis de la diversidad genética. La variabilidad morfológica es la primera propiedad que históricamente hemos notado en los organismos; el estudio cuantitativo de esta y de su covariación con otros componentes (de origen genético, geográfico o climático) es el objetivo de la morfometría geométrica (Bookstein, 1997; Jaramillo, 2011). Este tipo de estudios son primordiales no solo para comprender la dinámica, la historia evolutiva o la adaptación de las poblaciones, sino que también nos permiten obtener información que puede ser útil para desarrollar estrategias futuras para el manejo de la biodiversidad (Schaal et al., 1991).

El objeto de estudio de este trabajo es *Balmea stormiae*, una especie de planta poco estudiada; la única en su género dentro de la familia Rubiaceae. Esta especie fue incluida en la categoría de protección especial en la NOM-059-SEMARNAT-2010, clasificada en la IUCN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza) como en peligro (Martínez Salas et al., 2017) y en el Apéndice I de CITES (the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) debido a que presenta una disminución gradual en sus poblaciones, a causa del uso clandestino de la madera o la perturbación de su hábitat. Por otro lado, esta planta tiene una gran especificidad de ambiente, lo cual podría estar induciendo un aislamiento adicional comparado con otras especies distribuidas en ambientes más continuos. No obstante, no existen estudios concretos sobre el estado de conservación en el que se encuentra *B. stormiae* a lo largo de su rango de distribución. Uno de los aspectos que no han sido evaluados y que podría constituir un paso inicial, es conocer la variación genética y morfológica foliar de sus poblaciones. Por lo que el propósito de este trabajo es estimar la diversidad genética dentro y entre las poblaciones de *B. stormiae* de Michoacán y Jalisco mediante marcadores ISSR, regiones de cloroplasto y de núcleo, así como analizar la morfología foliar y su relación con la variación genética.

ANTECEDENTES

Clasificación taxonómica de *Balmea stormiae*

La familia Rubiaceae es una de las más numerosas dentro de las angiospermas (Bremer y Eriksson, 2009). La podemos encontrar en las regiones subtropicales y tropicales de todos los continentes con mayor número de representantes en el Paleotrópico, sin embargo, también es considerablemente diversa en la región Neotropical (Manns et al., 2012). Se ha propuesto que la presencia de la familia Rubiaceae en Asia y Sudamérica puede ser explicada debido a que los primeros ancestros se encontraban en los bosques boreotropicales de Eurasia durante el Cenomaniano-Turoniano (Cretácico tardío) y probablemente se hayan dispersado a larga distancia hacia América a través de un océano Atlántico más estrecho, provocado por la cercanía de los antiguos continentes (Manns et al., 2012; Wikström et al., 2015). Se ha dividido a la familia Rubiaceae en tres subfamilias bien soportadas: Cinchonoideae, Ixoroideae y Rubioideae (Bremer y Eriksson, 2009). Cinchonoideae es la más pequeña de las tres subfamilias, sus ancestros se encontraban en Sudamérica y se dispersaron a larga distancia durante el Cretácico tardío a Paleoceno hasta llegar a Centroamérica y el sur de Norteamérica (Manns et al., 2012; Wikström et al., 2015). Esta subfamilia incluye aproximadamente 1500 especies dentro de 120 géneros y nueve tribus, de las cuales solo dos se encuentran en el Viejo Mundo, mientras que las siete restantes se distribuyen en el Neotrópico (Bremer y Eriksson, 2009; Manns y Bremer, 2010). De las tribus exclusivas del Neotrópico, Hillieae se distribuye actualmente en Centro y Sudamérica y se ha inferido que se originó en Centroamérica y se dispersó hacia Sudamérica durante el Mioceno (Manns et al., 2012; Wikström et al., 2015). Dentro de la tribu Hillieae se encuentra *Balmea stormiae*, esta es una especie poco estudiada y en los trabajos que se han realizado solamente la incluyen en revisiones taxonómicas y filogenéticas a nivel de familia y subfamilia. La posición taxonómica de *B. stormiae* en un principio era incierta, se ubicaba dentro de la tribu Cinchonaeeae, subfamilia Cinchonoideae (Fosberg, 1974; Martínez, 1942). Posteriormente se situó a *Balmea* como parte de la tribu Hillieae en un estudio que utilizó datos morfológicos de polen (D'Hondt, et al., 2004). Recientemente, mediante la utilización de marcadores de ADN en el trabajo de

Manns y Bremer (2010), se confirmó la posición taxonómica de *Balmea* en la tribu Hillieae, así como la de varios géneros que no habían sido incluidos en estudios moleculares.

Descripción de la especie

De acuerdo con la descripción original (Martínez, 1942) y con observaciones personales recientes, *Balmea stormiae* es un árbol de 4 a 7 metros de altura, pero puede llegar a medir más de 10 metros. La base de los tallos individuales es de 15 a 20 cm de diámetro y la corteza es lisa. Tiene ramificaciones regulares cuando es joven, lo que le da una forma general cónica, pero son más ramificados cuando adultos (figuras 1a y 1b). Las hojas son lustrosas, deciduas, pecioladas, opuestas, ampliamente ovadas con la base cordada, el margen es entero y están agrupadas al final de las ramas (figuras 2a y 2b). Cuando caen, los peciolo y las estípulas interpeciolo dejan una marca muy notoria en la rama.

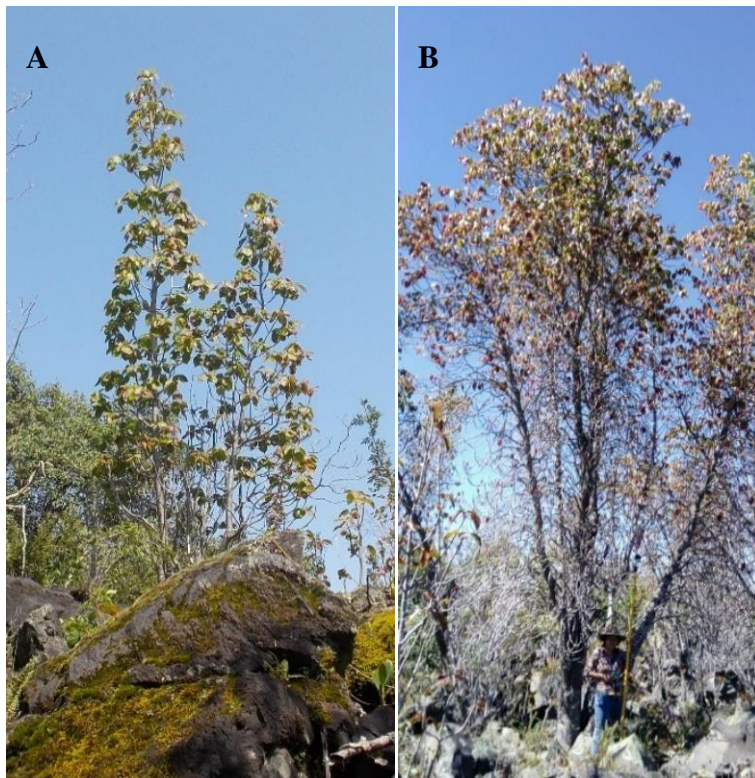


Figura 1. A) Árbol joven de *Balmea stormiae*. B) Árbol adulto

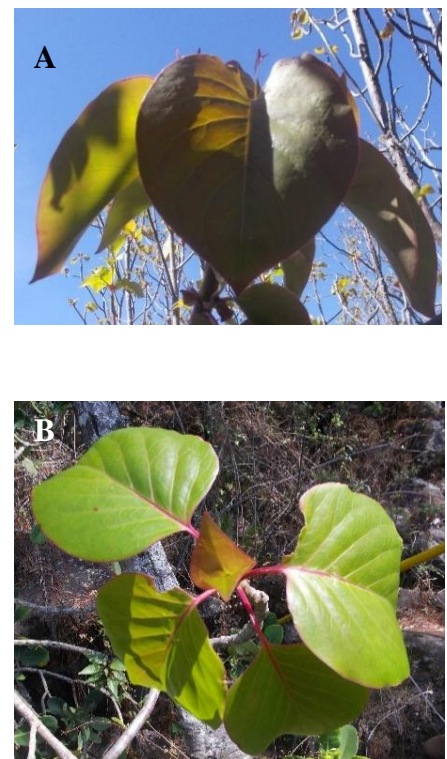


Figura 2. A) Forma de la hoja. B) Disposición alterna de las hojas

Su inflorescencia es terminal en cimas corimbosas péndulas, con un promedio de 9 a 13 flores (figura 3). Las flores son hermafroditas; de color rojo escarlata que se tornan púrpuras cuando maduran; son gamopétalas, rígidas y despiden un aroma dulce durante la noche. Poseen cáliz dividido en la base, con cinco sépalos lineares de color verdoso, que persisten algún tiempo después de que las flores caen. La corola es decidua y subcilíndrica, de hasta 28 mm de longitud, con cinco lóbulos enteros imbricados. Las flores tienen cinco estambres que se insertan cerca de la boca del tubo y a diferencia de otras especies de rubiáceas, estos son del mismo tamaño entre los individuos (homostilia) (figura 4). Las anteras no sobrepasan la corola, son fusiformes y biloculares de 9-10 mm de longitud, con filamentos cortos y planos de 4 mm de longitud. El pistilo es del mismo color que la corola, de 20-23 mm de longitud, con dos surcos opuestos; es ligeramente más largo que los estambres, a lo cual se le denomina hercogamia por aproximación (figura 4). El ovario es ínfero bilocular con numerosos óvulos.



Figura 3. Inflorescencia con flores en pre antesis

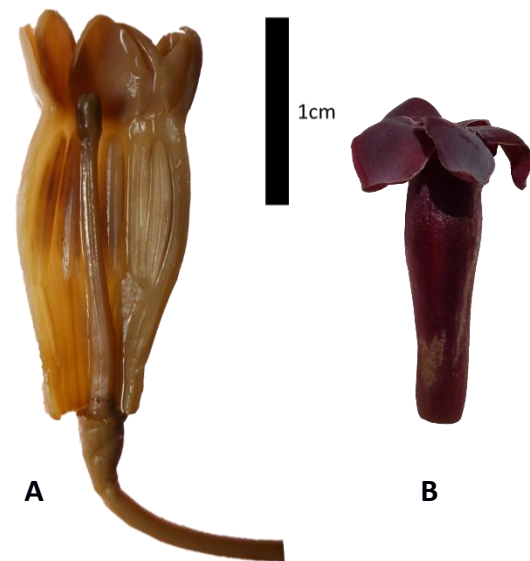


Figura 4. A) Disección de la flor mostrando los estambres y el pistilo. B) Limbo y tubo de la corola

El fruto es una cápsula leñosa, oblongo-ovada de hasta 28 mm de longitud, dehiscente desde la punta en dos partes foliculares (figura 5). Cuando las flores caen los pedicelos giran hacia arriba quedando las cápsulas erectas (figura 6), probablemente como estrategia para evitar que las semillas caigan cerca de la planta madre. Las semillas son numerosas, de hasta 6 mm de longitud, con alas reticuladas que son más pequeñas que el cuerpo de las semillas (figura 7).



Figura 5. A) Fruto dehiscente desde el ápice. B) Infrutescencia con cápsulas totalmente abiertas



Figura 6. Infrutescencia inmadura con pedicelos girados



Figura 7. Semillas aladas, la escala mide 1mm

Mecanismos de dispersión y reproducción

La floración de este árbol se produce en época de lluvias, entre los meses de mayo a septiembre y las hojas caen en los meses de noviembre a enero al mismo tiempo que se lleva a cabo la maduración del fruto. Se desconoce cuáles son los polinizadores de *Balmea stormiae*, sin embargo, las características que presentan sus flores (péndulas con forma subcilíndrica estrecha, con tamaño pequeño y con fragancia dulce durante la noche) sugieren una probable polinización por esfíngidos. Los esfíngidos son lepidópteros nocturnos que son atraídos por fragancias dulces (Balkenius et al., 2002) y presentan una probóscide denominada espiritrompa, la cual les permite obtener néctar de flores estrechas y tubulares. Se ha determinado que, en el momento de su alimentación, estos organismos quedan cubiertos de polen en la superficie pilosa de su cara y en su espiritrompa, lo que los convierte en polinizadores potenciales (Willmer, 2011). Se ha encontrado también, que algunos esfíngidos son capaces de volar muy rápido, suspenderse para polinizar en vuelo o de desplazarse considerables distancias, lo que posiciona a estos insectos como los polinizadores más eficientes dentro de los lepidópteros (Willmer, 2011). Por lo que se puede inferir que para *Balmea stormiae*, los esfíngidos podrían transportar el polen a pedregales cercanos. Por otro lado, las ligeras semillas aladas son transportadas por el viento, el cual es un sistema de dispersión; sin embargo, las pequeñas dimensiones del ala respecto al cuerpo de la semilla sugieren que es una dispersión de menor alcance, que le permite alejarse poco de la planta madre hacía pedregales contiguos.

Distribución, hábitat y forma de crecimiento

Balmea stormiae se distribuye en áreas pequeñas en Guatemala, El Salvador y México (Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Estado de México, Guerrero, Oaxaca, Chiapas) (figura 8), a una altitud entre los 1100 hasta los 2100 metros sobre el nivel del mar (Fosberg, 1974; Martínez, 1942; Martínez Salas et al., 2017). Es conocida como “ayuque” (y sus variantes “ayukua”, “ayuke”), “palo blanco”, “huele de noche” o “arbolito de navidad”. Esta especie habita principalmente en o cerca de zonas con bosque de pino-encino o encino, sobre rocas o sobre árboles como epífita (o hemiepífita), este último es un hábito inusual que se presenta en pocos

géneros dentro de las Rubiáceas (Taylor, 1994). En Guatemala *B. stormiae* está presente en las inmediaciones del volcán Pacaya, en forma de epífita sobre laderas con bosque. En Chiapas, una de las zonas más lluviosas de México, se ha reportado en forma de árbol epífita, en bosque mesófilo de montaña, en áreas de bosque de pino-encino. Hacia la parte norte del Istmo de Tehuantepec *B. stormiae* se encuentra en la Sierra Madre del Sur en los Estados de Oaxaca, Guerrero, Jalisco y Nayarit. En Oaxaca está presente como epífita leñosa o sobre roca caliza y sedimentaria en sitios húmedos de bosques de encino o pino-encino. También sobre las rocas calizas de Guerrero se ha reportado a *B. stormiae* en ambientes de selva baja caducifolia y en ecotono con bosque. En la Sierra de Manantlán en Jalisco se puede encontrar a esta especie con hábitos de hemiepífita (o trepadora) sobre encinos o *Ficus* y con poca frecuencia sobre rocas (figura 9), en bosques de encino, pino-encino o de galería y en selva media subcaducifolia. En el cerro de San Juan, Nayarit, que forma parte la porción norte de la Sierra Madre del Sur, esta especie se ha reportado en bosque mesófilo, sin más detalles sobre su forma de crecimiento. Por otro lado, *B. stormiae* se distribuye también en Colima y Michoacán, en la parte occidente de la Faja Volcánica Transmexicana, la zona de mayor actividad volcánica en México. En las faldas del volcán de Fuego y del Nevado de Colima esta especie se reporta en zonas de bosque de pino-encino y selva media subcaducifolia como epífita o trepadora sobre árboles como *Ficus* (en áreas abiertas) y *Heliocarpus*. En el caso de Michoacán, *Balmea* se encuentra en ambientes volcánicos denominados “malpaís”, cerca de bosques de pino-encino en áreas abiertas con vegetación escasa y con suelo poco desarrollado (figura 10 a). Crece principalmente como árbol anclado sobre rocas volcánicas y con muy poca frecuencia sobre los árboles, presentándose de esta manera únicamente en su etapa de plántula con tallas muy pequeñas sin llegar a desarrollarse como epífita o trepadora (figura 10 b).



Figura 8. Mapa de distribución de *Balmea stormiae* (Martínez Salas et al., 2017)

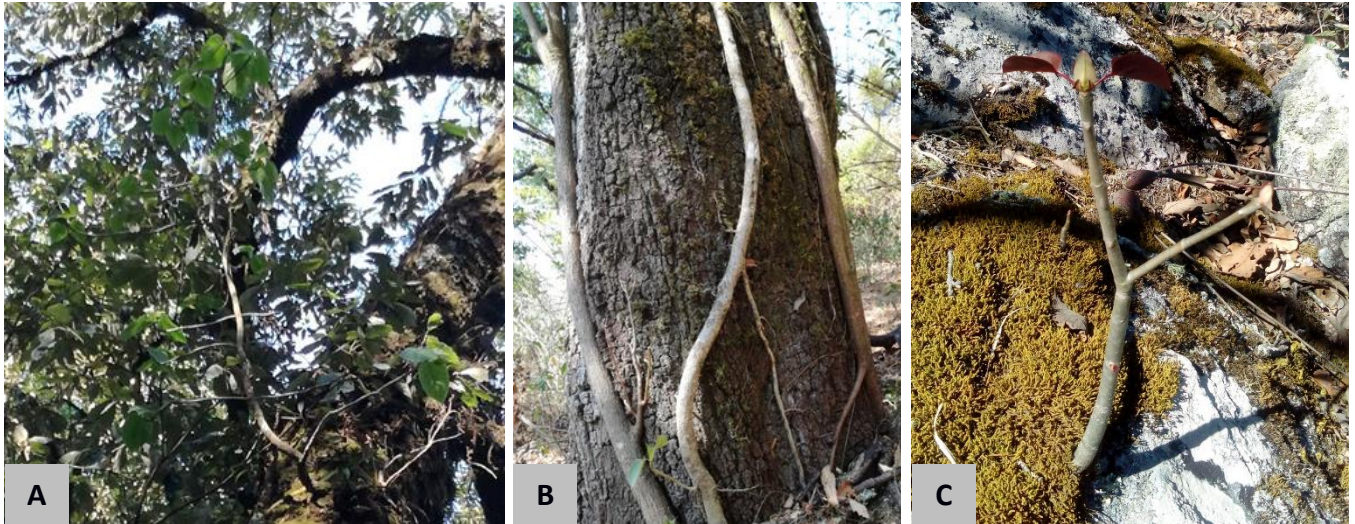


Figura 9. *B. stormiae* en Jalisco. A) Individuo creciendo sobre un árbol, B) Modo de anclaje en el árbol, C) Plántula sobre una roca



Figura 10. *B. stormiae* en Michoacán. A) Malpaís con zonas abiertas, B) Plántula sobre un árbol

Usos y amenazas para la especie

A pesar de que *B. stormiae* se distribuye en varias localidades del territorio mexicano, los ambientes en los que habita son muy específicos y se encuentran aislados debido a la distancia entre ellos. Se ha estimado que el área de ocupación de las poblaciones de esta especie (AOO, como utilizado en la Lista Roja de la IUCN) es únicamente de 188 km² y está disminuyendo debido a la destrucción e invasión del hábitat (Martínez Salas et al., 2017). Los primeros indicios sobre el declive y las amenazas hacia las poblaciones de *Balmea stormiae* provienen desde 1940 en Uruapan, Michoacán, en donde se ha reportado su valor ornamental como árbol navideño (Fosberg, 1974), práctica que continúa hasta nuestros días. Por otro lado, en los alrededores del lago de Pátzcuaro y en Zacapu se utiliza la madera para la construcción de techos, para la elaboración de artesanías (máscaras), y como leña. Además, el aumento en la frecuencia de incendios, la explotación de los bosques cercanos, la implementación de nuevas zonas de cultivo en las faldas de los pedregales, la remoción de rocas para la apertura de caminos o para su uso en la construcción, y el pastoreo a pequeña escala, constituyen una amenaza aún mayor para la disminución del tamaño de las poblaciones y la erosión en la diversidad genética de *B. stormiae* (Martínez Salas et al., 2017; comunicaciones personales).

Variación genética y las fuerzas de la evolución

Las principales fuerzas que moldean a la variación genética son la mutación (cambios en las bases nucleotídicas y en los alelos) y la recombinación durante la reproducción sexual. Sin embargo, existen otras fuerzas que actúan sobre la variación genética: la selección natural, el flujo genético y la deriva genética. La selección natural consiste en la sobrevivencia y reproducción diferencial de los organismos, de tal manera que hay una eliminación de los individuos menos aptos y por consiguiente un incremento de alelos que pueden ser ventajosos para la población confiriéndole habilidades de adaptación (Eguiarte, 1986). El flujo genético se refiere al movimiento o migración de genes de una población a otra y dependerá de la tasa de migración y de la frecuencia génica que presenten los individuos migrantes (Eguiarte, 1986; Piñero et al., 2008). Este puede tener dos efectos, uno de ellos es que puede haber un aumento en la variabilidad que incremente las probabilidades de adaptación; sin embargo, el otro efecto

es la migración de individuos con carga genética muy diferente adaptados a otras condiciones, provocando disminución en la adaptación promedio de la población (Eguiarte, 1986). Finalmente, la deriva genética se define como los cambios al azar en las frecuencias alélicas de una población que ocurren de una generación a otra. Esta fuerza actúa sobre los alelos neutros, los deletéreos (perjudiciales) o los alelos que dan ventajas adaptativas (Eguiarte, 1986).

Técnicas para el estudio de la diversidad genética

Un factor que limita los estudios de genética y filogeografía con plantas más que con animales, es la disponibilidad de marcadores moleculares adecuados (Schaal et al., 1998). Los marcadores de ADN de cloroplasto se usan para llevar a cabo una primera caracterización de la estructura genética (Hare, 2001), nos proporcionan información sobre la historia antigua o eventos históricos que ocurrieron en las poblaciones, ya que se trata de ADN de herencia uniparental (materna) que se transmite a través de las semillas (Ennos et al., 1999; McCauley, 1995). Las regiones de ADN nuclear son las de más rápida evolución de los tres genomas en plantas (Wolfe et al., 1987); son de herencia biparental y pueden ser dispersadas por semillas o polen (McCauley, 1995). La distinta historia evolutiva que reflejan el ADN nuclear y de cloroplasto se debe también a las diferencias en el tamaño efectivo poblacional (N_e) (Cavender-Bares et al., 2011). En este sentido, los loci nucleares generalmente tiene un N_e cuatro veces mayor que el que presentan los loci de cloroplasto de herencia uniparental, por lo que la estructura filogeográfica sería menos pronunciada en los primeros comparado con los segundos (Hare, 2001).

Por otra parte, la PCR con ISSR involucra la reproducción de segmentos de ADN de distintos tamaños presentes en una distancia amplificable entre microsatélites repetidos a lo largo del genoma, los cuales están situados en direcciones opuestas generalmente en el genoma nuclear (Reddy et al., 2002). Esta técnica da como resultado un patrón de fragmentos para cada individuo, en donde la ausencia de banda indica que hay un homocigoto recesivo. Por otro lado, las bandas visibles son consideradas como fenotipos dominantes y no podemos diferenciar si se trata de un heterocigoto o un homocigoto dominante (González y Aguirre,

2007), lo cual estaría representando una desventaja para estos marcadores. Otra desventaja es que las bandas del mismo tamaño podrían no ser homólogas (Harris, 1999). No obstante, se ha considerado que este no representa un problema cuando se trata de niveles infraespecíficos ya que se ha estimado que alrededor del 91% de las bandas con peso molecular semejante son homólogas (Wolff y Morgan-Richards, 1999; Rieseberg, 1996). Sin embargo, las ventajas que los hacen útiles en análisis de diversidad genética son su alto polimorfismo, alta reproducibilidad y no es necesario conocer la secuencia flanqueante por lo que existen primers universales (Dogan et al., 2007; Hakki et al., 2010).

Estudios de diversidad genética y filogeografía en Rubiáceas

No se han realizado estudios genéticos o filogeográficos que nos den cuenta de la historia evolutiva y contemporánea de *B. stormiae*. Sin embargo, para otras especies de rubiáceas si se han llevado a cabo estudios de este tipo. Entre las especies más cercanas en las que se ha examinado la variación genética, se encuentra *Antirhea aromatica* (subfamilia Cinchonoideae, tribu Guettardeae), una planta con distribución restringida y endémica del centro de Veracruz (González-Astorga y Castillo-Campos, 2004). Esta especie presenta flores blancas que son polinizadas por polillas, abejorros y murciélagos, mientras que sus semillas son dispersadas por estos últimos. En este trabajo utilizaron aloenzimas como marcadores, encontrando alta diversidad genética dentro de las poblaciones en comparación con otros árboles tropicales y endémicos. Esta alta diversidad a pesar del pequeño tamaño poblacional de la especie, la atribuyeron a su sistema reproductivo auto-incompatible debido a la heterostilia y a la eficiencia de la polinización dentro de cada población. Otros resultados que encontraron fueron la alta diferenciación genética debida a la reducida eficiencia de polinización por la asincronía en la floración y al aislamiento entre poblaciones causado por fragmentación que a su vez reduce el flujo genético. Además, este reducido flujo de genes estimado mediante cálculos indirectos (Nm), lo adjudican a la baja dispersión de semillas puesto que los murciélagos frugívoros las depositan bajo la planta madre.

En un estudio posterior (Gaafar et al., 2014), se analizó la diversidad genética de la planta del suroeste de Arabia Saudita, *Breonadia salicina* (subfamilia Cinchonoideae, tribu Guettardeae), mediante intersecuencias simples repetidas (ISSR). Esta especie, al igual que

Balmea stormiae, es la única en su género, sus flores despiden aroma dulce y se encuentra en peligro crítico. En este estudio encontraron que la diversidad genética es muy baja dentro de las poblaciones, mientras que la diferenciación genética entre las poblaciones es relativamente alta. Debido a lo anterior, los autores concluyen que esta especie se encuentra en el borde de la extinción por lo que sugieren que se implementen programas para su conservación.

Dentro de Ixoroideae (la subfamilia hermana de Cinchonoideae) se han realizado estudios genéticos o filogeográficos de tres géneros (*Trilliaedoxa*, *Emmenopterys* y *Coffea*). Al igual que *Balmea*, el primero de estos géneros ha sido relativamente poco estudiado a pesar de estar clasificada como planta protegida debido a que su única especie (*Trilliaedoxa gracilis*) presenta poblaciones pequeñas y habita lugares específicos aislados. En la investigación realizada por Jia et al. (2016) de este género monotípico chino, encontraron con datos de ADN de cloroplasto (*petA-psbJ* y *trnD-trnT*), alta estructura genética entre poblaciones y baja variación dentro de las poblaciones, mientras que los datos de ADN nuclear (CAMX1F-CAMX2R) mostraron alta variación dentro de poblaciones y estructura filogeográfica. Estas incongruencias en sus resultados las atribuyen a las diferencias en el tamaño efectivo poblacional entre los tipos de marcadores genéticos. En cuanto a la historia demográfica, los autores obtuvieron patrones similares en la distribución de haplotipos con los dos tipos de marcadores, los cuales indican un cuello de botella relativamente reciente que ocurrió durante los ciclos glacial-interglaciares del Pleistoceno en el que las poblaciones se restringieron a pequeñas áreas aisladas produciéndose flujo genético limitado.

En el segundo de los géneros dentro de la subfamilia Ixoroideae, se ha estudiado al árbol relictivo *Emmenopterys henryi* del Terciario en China. En un primer trabajo, evaluaron la estructura genética con base en polimorfismos de ISSR (inter secuencias simples repetidas) y detectaron baja diversidad genética dentro de las poblaciones y mayor diferenciación genética entre las poblaciones (68.03%) sugiriendo que la deriva genética es el proceso predominante en esta especie, ya que para especies endogámicas las estimaciones de variación entre poblaciones son de 70% o más (Li y Jin, 2008). Otros resultados de ese trabajo indican poco flujo genético que podría estar determinando la diferenciación entre las poblaciones de *E.*

henryi, además, observaron la formación de grupos que coinciden con la distribución geográfica. En un estudio más reciente (Zhang et al., 2016), implementaron el uso de otros marcadores tales como regiones intergénicas de cloroplasto (*psbA - trnH*, *trnL - trnF*, *trnT - trnL*), la región ITS y AFLPs (polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados) para investigar cómo es que el ambiente y factores geográficos en diferentes épocas han conducido la diferenciación genética a nivel filogeográfico y de genética del paisaje de *E. henryi*. En este trabajo infirieron que la variación genética de esta especie se estructura geográficamente en el Norte y Sur de China, además de estar asociada con eventos climáticos del Cuaternario, mientras que la estructura genética parece estar determinada principalmente por el aislamiento por distancia.

Con base en los resultados antes expuestos que se han obtenido en los estudios de otros géneros de rubiáceas (*Breonadia salicina*, *Trilliaedoxa gracilis* y *Emmenopterys henryi*) se puede predecir que *B. stormiae* presentará baja diversidad genética dentro de sus poblaciones y alta diferenciación entre las poblaciones debido a sus características de vida y de aislamiento poblacional. Aunque, no existen barreras geográficas infranqueables que pudieran estar provocando aislamiento genético entre las poblaciones de *Balmea stormiae*, otras características que en conjunto incrementan la deriva genética (el tamaño poblacional pequeño, el aislamiento por distancia y la especificidad de ambiente) podrían explicar la diferenciación entre las poblaciones.

Morfometría geométrica

La morfometría tradicional se basa en descripciones cualitativas de la forma; sus datos primarios son las distancias (Tornese y Nabar, 2013; Cantin et al., 2013), mismas que dificultan la observación de los cambios morfológicos debido a que no se conservan las relaciones geométricas de la estructura en estudio (Benítez y Püschel, 2014). Los métodos para analizar las distancias son los índices, los cuales tienen la desventaja de carecer de una estadística desarrollada y de presentar disminución en la varianza (Atchley et al., 1976). Además, el resultado de los índices es plasmado en tablas poco intuitivas (Benítez y Püschel, 2014). Sin embargo, a principios del siglo XX con la revolución en los análisis de la forma se construyeron

los cimientos metodológicos de la morfometría geométrica, permitiendo un mejor uso de la información geométrica de un objeto (Rohlf y Marcus, 1993). Con el uso de coordenadas cartesianas de marcas anatómicas (landmarks) se pudo tener una mejor visualización e interpretación de los resultados (Zelditch et al., 2012).

Dentro del campo de estudio de la morfología en las rubiáceas, se han llevado a cabo estudios principalmente en estructuras florales, frutos y con menor medida en hojas y en asociación con análisis de variación genética. En cuanto a estructuras florales existen estudios en especies con distilia (polimorfismo floral con estilos cortos y largos) como *Palicourea padifolia*, *Psychotria carthagenensis* y *Oldenlandia salzmannii*. En la primera de estas especies encontraron que la forma de la flor es diferente entre los dos tipos de flores (con estilo corto y largo) y que el tamaño de la flor influye en la posición de la antera, por lo que existe una covariación de características florales entre los dos tipos de flores (Hernández-Ramírez y Aké-Castillo, 2014). En el caso de *P. carthagenensis* las flores de estilo corto generalmente son más grandes que las de estilo largo (Faria et al., 2012). En un intento por comprender la biología reproductiva de *Oldenlandia salzmannii* se analizó la anatomía y morfología floral de los dos tipos de flores encontrando que las flores con estilo corto tienen anteras y granos de polen más grandes (Florentin et al., 2016). Por otro lado, el relacionar la variación morfométrica y los datos genéticos, representa una herramienta muy útil para conocer si la variación morfológica tiene bases genéticas. En Rubiáceas esto ha sido poco explorado, por ejemplo, en cuatro variedades de tres especies comerciales de café se realizaron estudios sobre diferenciación genética (*matK* y *rbcL*) y morfometría tradicional de hojas (Cao et al., 2014), encontraron que con datos morfológicos dos variedades de *C. liberica* presentaron diferenciación, no siendo así con los datos moleculares. Estos autores argumentan que los análisis morfométricos dieron resultados confiables, ya que la diferenciación entre las dos variedades es soportada por estudios con otros tipos de marcadores moleculares (ADN mitocondrial, marcadores AFLP, RAPD e ISSR).

En este estudio, para *Balmea stormiae* se espera encontrar congruencia entre los patrones de diferenciación genética y morfológica, al menos entre las poblaciones más distantes. Al mismo tiempo que las condiciones del hábitat y la forma de vida diferenciada entre Michoacán y Jalisco tendrían un efecto en la morfología de las hojas.

HIPÓTESIS

- Debido al pequeño tamaño poblacional, a la baja eficiencia en la dispersión de semillas a larga distancia y al aislamiento producido por la especificidad de ambiente de *Balmea stormiae*, los individuos presentan baja variación genética dentro de las poblaciones, mientras que entre ellas existe diferenciación genética y morfológica foliar

OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar la variación genética y morfológica foliar de las poblaciones de *Balmea stormiae* en Michoacán y Jalisco, México.

Objetivos específicos

- Describir la variación y estructura genética dentro y entre las poblaciones de *B. stormiae*.
- Analizar la relación entre la distancia genética y la distancia geográfica de las poblaciones.
- Analizar la variación en la forma de las hojas entre las poblaciones de la especie.
- Determinar la influencia de las variables climáticas sobre la forma y el área de las hojas.
- Conocer si existe una relación entre la variación genética y la morfológica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Áreas de estudio y colecta

Se estudiaron cinco poblaciones de *B. stormiae* de México, cuatro de ellas distribuidas en Michoacán en los pedregales de Arocutín, San Andrés Coru, Nuevo San Juan Parangaricutiro y Zacapu, y la quinta población perteneciente a la Sierra de Manantlán en Jalisco (figura 11). Adicionalmente, se exploraron los sitios de Nayarit y Colima, sin embargo, no hubo éxito en la colecta en esos dos estados debido a la dificultad para encontrar a la especie.

De entre los sitios de colecta, las formaciones volcánicas de Michoacán pertenecen al campo volcánico Michoacán-Guanajuato de la Faja Volcánica Transmexicana. En esta región, el malpaís de Zacapu inició su formación durante el periodo Terciario al surgir la Faja Volcánica Transmexicana, sin embargo, la actividad volcánica continuó hasta el periodo Cuaternario (Pleistoceno-Holoceno) modificando el terreno (Reyes García, 1998). Al flujo de lava y rocas donde se colectaron los individuos de este estudio (El Capaxtiro) se le ha asignado una edad de entre 1500 a 2500 años de antigüedad, mientras que los volcanes aledaños tienen aproximadamente 5 Ma de edad y la mayoría de las rocas volcánicas de la zona de Zacapu son más jóvenes que 2.1 Ma (Reyes-Guzmán, 2018).

Por otra parte, el Lago de Pátzcuaro está rodeado por diferentes tipos de volcanes y de flujos de lava que tienen una edad del Plioceno al Holoceno. Uno de estos volcanes en el que podemos localizar a *B. stormiae* es el Cerro La Taza, que se encuentra al SW del Lago, cerca de la Ex Hacienda Charahuén y de San Miguel Nocupetepo y se le ha asignado una edad aproximada de 8400 años (Holoceno) (García-Quintana et al., 2016; Osorio-Ocampo, 2014).

El territorio de Nuevo San Juan Parangaricutiro fue consecuencia de la actividad volcánica del Plioceno, Pleistoceno y Holoceno (Bocco, 1998); además, se considera que el 50% del terreno de la localidad se encuentra cubierto por cenizas o malpaís provenientes del volcán Parícutín durante su erupción de 1943 a 1952 (Medina et al., 2000).

En la localidad de San Andrés Coru, se presenta un volcán de talla mediana en escudo nombrado El Metate, es considerado el más joven del campo volcánico Michoacán-Guanajuato. Este volcán produjo la erupción de mayor volumen en México en el Holoceno e inició su actividad en el año 1250 d. C. (hace aproximadamente 769 años) con una duración aproximada de 30 años. Entre los doce diferentes flujos de lava que este volcán produjo, los individuos de *B. stormiae* que se colectaron en este estudio se encontraron en el de mayores dimensiones (flujo 6) con 15 km, 2 km de ancho y 70 m de espesor promedio (Chevrel et al., 2016).

En el estado de Jalisco, la formación de la Sierra de Manantlán (SM) pertenece a la Sierra Madre del Sur cerca de su confluencia con la Faja Volcánica Transmexicana (Carabias, 2000). La zona de colecta de *Balmea stormiae* es el Occidente de la SM en la Unidad Fisiográfica Las Joyas, esta es la parte más alta y conservada de la SM; está formada por roca volcánica intrusiva y extrusiva que es producto del vulcanismo del Mioceno y Pleistoceno (Martínez y Ramírez, 1998).

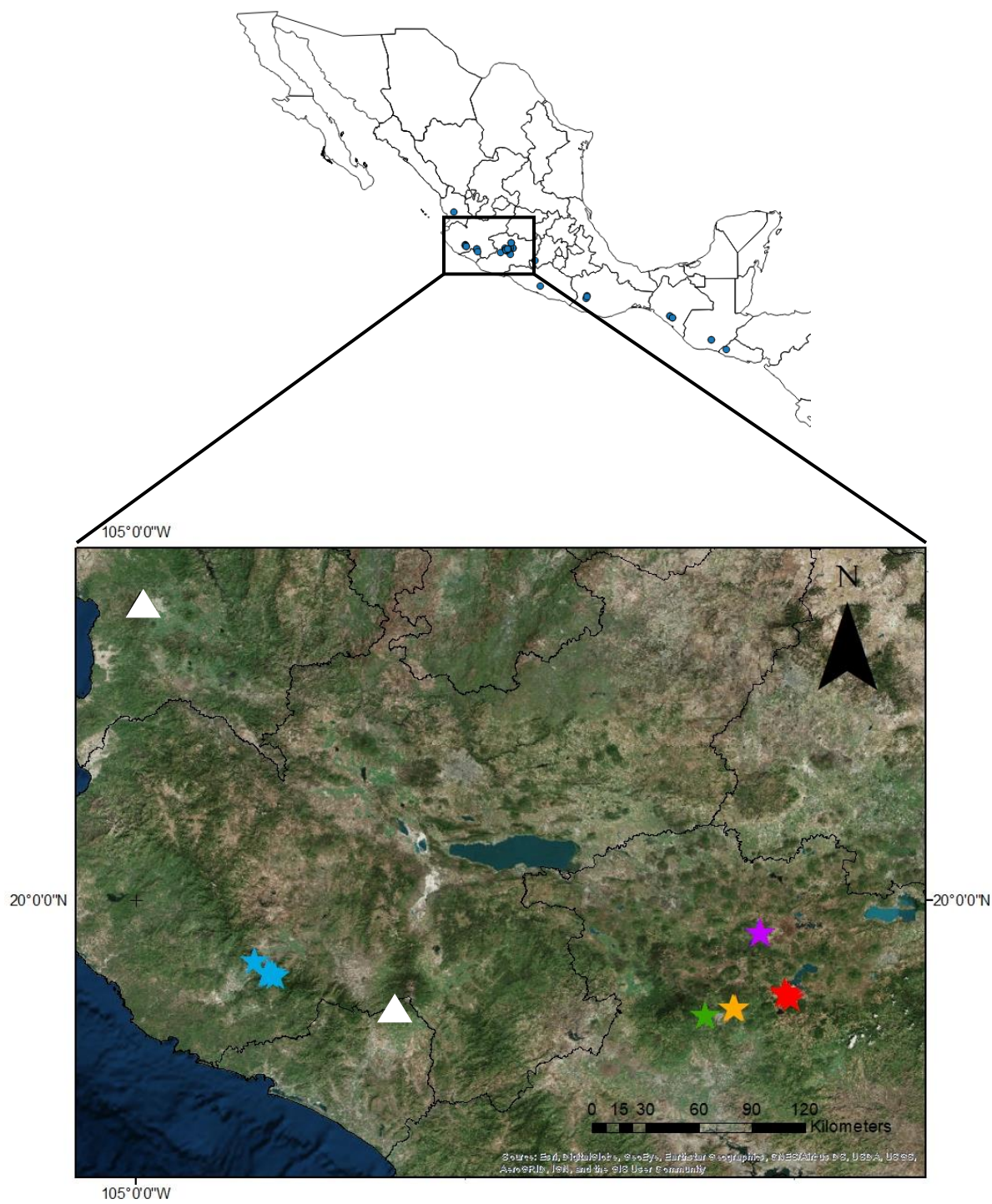


Figura 11. Puntos de colecta de los individuos de *Balmea stormiae*: Sierra de Manantlán (azul), Nuevo San Juan Parangaricutiro (verde), San Andrés Coru (amarillo), Arcutín (rojo) y Zacapu (fucsia). Los triángulos blancos son los sitios explorados sin éxito de colecta

Las coordenadas geográficas de los sitios donde se ha registrado *Balmea stormiae* se obtuvieron de la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO) y de Global Biodiversity Information Facility (GBIF). Para corroborar el contenido de dichas bases de datos y para planear las colectas, se revisaron las colecciones del Herbario Nacional (MEXU), de los Herbarios IBUG-CUCBA y ZEA CUCSur de la Universidad de Guadalajara y del Herbario IEB del Centro Regional del Bajío de Michoacán. Las colectas de campo se realizaron de 2016 a 2018, en dos de los ocho estados de México donde se ha registrado la presencia de *B. stormiae*. Se trató de obtener material vegetal de los individuos que tuvieran una distancia de 5 a 10 m entre ellos para evitar muestrear individuos clonales.

El número total de individuos para los análisis genéticos fue de 81 y osciló entre 14 y 19 por población, en las cinco poblaciones (tabla 1). Para la obtención de ADN se colectaron dos hojas sanas y jóvenes por cada individuo, mismas que fueron tratadas de inmediato con gel de sílice para preservar de manera adecuada los tejidos. Para llevar a cabo el análisis de morfometría geométrica se colectaron un total de 44 individuos y 237 hojas en solo cuatro de las cinco poblaciones, ya que al realizar la colecta en la primera población (San Andrés Coru) aún no se tenía contemplado el análisis morfométrico (tabla 1). Se cortaron ramas tratando de abarcar el estrato medio e inferior, evitando las hojas más jóvenes del estrato superior. Se obtuvieron alrededor de diez hojas para cada individuo tomando en cuenta la ausencia de daño, su estado maduro y su completitud. Las hojas fueron prensadas cuidadosamente, se descartaron aquellas que estaban dobladas o con deformación por el prensado y fueron escaneadas con un multifuncional HP Photosmart C4680 para proseguir con los análisis.

Tabla 1. Individuos colectados					
Población	Estado	Altitud (msnm)	Genética	Morfometría	
			# individuos	# individuos	# hojas
Sierra de Manantlán	Jalisco	1502-1888	16	8	53
Nuevo San Juan	Michoacán	1876-1938	16	12	53
San Andrés Coru	Michoacán	1761-1854	16	Sin colecta	Sin colecta
Arocutín	Michoacán	2129-2151	19	12	88
Zacapu	Michoacán	2223-2244	14	12	43

Extracción de ADN

Se extrajo ADN de 60 mg de tejido foliar de cada individuo mediante el Invisorb Spin Plant Mini Kit de STRATEC. Se verificó la extracción y calidad del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, con Buffer TBE 0.5% y se realizaron diluciones de las muestras de ADN que así lo requerían. Se utilizaron tres tipos de marcadores moleculares: ADN de cloroplasto (*rps16*), el espaciador transcrito externo (ETS) y las inter-secuencias simples repetidas (ISSR).

Amplificación, visualización y secuenciación de los marcadores nucleares y de cloroplasto

Con el propósito de seleccionar regiones variables y sin mayores problemas para su amplificación, se realizaron pruebas exploratorias de amplificación con diferentes primers de cloroplasto y de núcleo, de los cuales se secuenciaron 19 y 7 respectivamente en cinco individuos de cada población. La región de cloroplasto que resultó variable fue el intrón *rps16* con los primers *rpsF* y *rpsr2* publicados por Oxelman et al. (1997). El marcador nuclear seleccionado fue el espaciador transcrito externo (ETS) que forma parte del espaciador intergénico entre los genes 26S y 18S en la región de repetición de ADN nuclear ribosomal. Los primers utilizados para ETS fueron el BUR1 (Becerra, 2003) y ETS-iR1 (GGCAGGATCAACCAGGTAGC).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un termociclador Technne TC-412 con un volumen final de 25 µl. Cada reacción se preparó con una mezcla de

11.625 µl de agua estéril, 11.625 µl de Taq 2x Master Mix (New England BioLabs), 0.5 µl de los primers forward y reverse y cantidad variable de ADN. Las condiciones de PCR para el intrón *rps16* consistieron en una desnaturalización inicial de 95° por 2 min; 33 ciclos (95° por 30s, 57° por 1 min, 72° por 1 min 20s); y una extensión final de 72° por 7 min. Por otro lado, para el ETS se usó una desnaturalización inicial de 95° por 1min; 40 ciclos (95° por 10s, 55° por 30s, 72° por 20s); y una extensión final de 72° por 7 min.

La electroforesis horizontal se hizo en geles de agarosa al 1%, con Buffer TBE 0.5X aplicando una corriente de 70 voltios durante una hora. Se cargaron los productos de la PCR mezclándolos con buffer de azul de bromofenol (Blue Loading Dye 6X, New England Biolabs) y con GelRed 100X (Nucleic Acid Gel Stain 10000X BIOTUM). Además, se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (DNA Ladder, New England Biolabs) para verificar que las secuencias correspondieran con el tamaño esperado. La visualización y fotografiado de los fragmentos se realizó por medio de un transiluminador de luz ultravioleta. Los fragmentos resultantes de la PCR fueron enviados al servicio de secuenciación de Macrogen Inc. Las secuencias forward y reverse obtenidas, se ensamblaron automáticamente con Sequencher v4.8 (Gene Codes Corporation, 2007) y se revisaron manualmente los electroferogramas para corregir los errores en las bases nitrogenadas que no fueron detectados por el programa.

Análisis de los datos de ADN nuclear y cloroplasto

Las secuencias obtenidas de los datos nucleares y de cloroplasto se editaron y se alinearon manualmente en el programa BioEdit v7.1.9 (Hall, 1999). Las ambigüedades en las secuencias de cloroplasto fueron tratadas como datos faltantes codificadas con signo de interrogación y los haplotipos fueron determinados en DNAsp (Librado y Rozas, 2009). En el caso de los datos nucleares en organismos diploides es frecuente encontrar individuos con dos alelos o haplotipos (Zhang et al., 2003). Debido a lo anterior, primero se detectó de manera visual en el electroferograma de las secuencias los dobles picos correspondientes a los individuos heterocigotos. Estas ambigüedades se resolvieron con el método de phase (Stephens et al., 2001), un procedimiento Bayesiano basado en la teoría coalescente que permite la reconstrucción de los haplotipos de cada individuo; dicho análisis se llevó a cabo mediante el

directorio DNASphase dentro del programa DNAsp (Librado y Rozas, 2009). Posteriormente, se hizo una búsqueda y eliminación de los bloques con recombinación dentro de las secuencias de núcleo con IMgc (Woerner et al., 2007).

Se calcularon los índices de diversidad nucleotídica de Nei (π), de diversidad haplotípica (Hd) en DNAsp. Para conocer las relaciones genealógicas entre los haplotipos tanto de núcleo como de cloroplasto, se construyó una red de haplotipos con Median Joining con el programa PopART (Bandelt et al., 1999). Para la red de haplotipos del *rps16* se agregó la secuencia obtenida de GenBank (Benson et al., 2012) de un individuo de Colima reportado en el estudio de Manns y Bremer (2010), el cual no fue considerado para el resto de los análisis. El programa Arlequín (Excoffier y Lischer, 2010) se utilizó para evaluar la diferenciación genética dentro y entre las poblaciones con un análisis molecular de varianza (AMOVA) y para conocer la demografía (pairwise mismatch distribution). Además, se hicieron pruebas de neutralidad con F_s de Fu (Fu, 1997) y D de Tajima (Tajima, 1989b) para detectar desviaciones al equilibrio demográfico de las poblaciones en DNAsp (Librado y Rozas, 2009) en donde valores negativos significativos de F_s indican expansión de la población o selección.

Se calculó también la diversidad genética dentro de las poblaciones (hS); la diversidad genética total (hT); y la diferenciación genética con G_{st} y N_{st} en el programa PERMUT (Pons y Petit, 1996). El G_{st} se basa en frecuencias de haplotipos mientras que el N_{st} en frecuencias y distancias; un valor de N_{st} significativamente mayor que G_{st} es indicio de estructura filogeográfica. Por otro lado, se detectaron las posibles barreras en el flujo genético de *B. stormiae*, mediante el algoritmo de Monmonier en el programa Barrier v.2.2 (Manni et al., 2004) utilizando las diferencias pareadas de F_{ST} entre las poblaciones. Además, se realizó una prueba de MANTEL en GenAIEx v6.5 (Peakall y Smouse, 2006) (Excoffier y Lischer, 2010) usando los valores de F_{st} pareadas y las distancias geográficas lineales para conocer si existe una relación entre la distancia genética y la distancia geográfica de las poblaciones y evaluar el aislamiento por distancia.

Amplificación de ISSR

Se hicieron experimentos iniciales con 28 primers del Set de primers UBC #9 diseñados por la Unidad de Servicios de Proteínas y Ácidos Nucleicos de la Universidad de Columbia Británica en un termociclador de gradientes “MasterCycler Gradient” (Eppendorf) para determinar la temperatura de alineamiento óptima para cada ISSR. Se eligieron un total de siete primers que resultaron con mayor reproducibilidad y claridad en los patrones de bandas. Las condiciones de amplificación por PCR para cada uno de ellos se muestran en la tabla 2. Cada reacción de amplificación consistió en lo siguiente: 2.5 µl de GoTaq PCR Buffer, 0.5 µl de dNTPs Mix, 1.5 µl de MgCl₂, 0.5 µl del primer UBC, cantidad variable de ADN, 0.125 µl de GoTaq polimerasa y la cantidad de agua suficiente para obtener 25 µl de contenido final. Las reacciones que arrojaron resultados con poca visibilidad y con bandas dudosas fueron amplificadas nuevamente.

La observación del patrón de bandas se realizó mediante electroforesis a cinco voltios por centímetro (5V/cm) en geles de agarosa al 1.5%, con TBE 0.5X. Los productos de la PCR se cargaron con buffer de azul de bromofenol (Blue Loading Dye 6X, New England Biolabs) y se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb (New England Biolabs, UK) para observar el tamaño de los fragmentos. Los geles fueron posteriormente teñidos en una dilución al 3X del colorante GelRed (Nucleic Acid Gel Stain 10,000X, BIOTUM) durante 30 minutos y los fragmentos se observaron y fotografiaron en un transiluminador de luz ultravioleta (UVP). La electroforesis se repitió para los geles que resultaron con bandas confusas, para corroborar la presencia de las mismas.

Tabla 2. ISSR usados en este estudio

Nombre de iniciador	Secuencia de iniciador	Condiciones de PCR
UBC807	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGT-3'	94°C - 5 min, 38 ciclos (94°C - 1min, 50°C - 45s, 72°C - 2min), 72°C - 5min
UBC811	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAC-3'	94°C - 5 min, 38 ciclos (94°C - 1min, 47°C - 45s, 72°C - 2min), 72°C - 5min
UBC814	5'-CTCTCTCTCTCTCTA-3'	94°C - 3 min, 38 ciclos (94°C - 1min, 48.5°C - 45s, 72°C - 2min), 72°C - 5min
UBC841	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAYC-3'	94°C - 5 min, 38 ciclos (94°C - 1min, 50°C - 45s, 72°C - 2min), 72°C - 5min
UBC842	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAYT-3'	94°C - 5 min, 38 ciclos (94°C - 1min, 52°C - 45s, 72°C - 2min), 72°C - 5min
UBC844	5'-CTCTCTCTCTCTCTRC-3'	94°C - 3 min, 38 ciclos (94°C - 1min, 50°C - 45s, 72°C - 2min), 72°C - 10min
UBC825	5'-ACACACACACACACT-3'	94°C - 5 min, 38 ciclos (94°C - 1min, 52°C - 45s, 72°C - 2min), 72°C - 5min

Análisis genéticos con ISSR

Se revisaron las fotografías de los geles obtenidos con los ISSR, se registraron y codificaron las bandas de forma binaria con presencia “1” o ausencia “0” (Wolfe, 2005) en una matriz de datos. Con el programa Adobe Photoshop CS6 Portable se editó el color en las fotografías que así lo necesitaran, para tener una mejor visualización de las bandas (figura 12). Las bandas con poca definición (“fantasmas”) o que resultaron de difícil interpretación no fueron registradas.

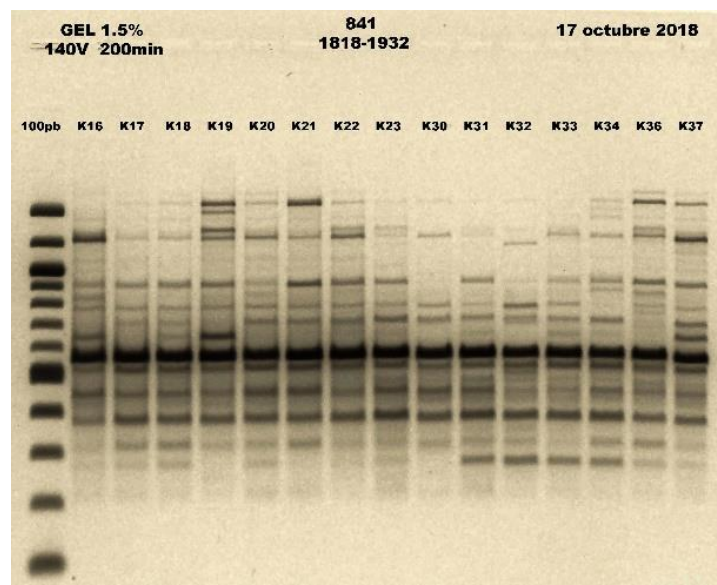


Figura 12. Inversión del color en las fotografías para mejorar visualización de las bandas

Para realizar los análisis estadísticos se asumió equilibrio de Hardy-Weinberg en las poblaciones debido a que se trata de marcadores dominantes y no es posible hacer una distinción entre individuos heterocigotos y homocigotos dominantes (González y Aguirre, 2007). Se realizó una curva de acumulación de genotipos en el paquete Poppr en el programa Rstudio para conocer si los loci muestreados fueron suficientes.

Los estimadores utilizados para calcular la diversidad genética fueron el número de alelos observados (N_a), el número de alelos efectivos (N_e) (Kimura y Crow, 1964), la diversidad genética de Nei (h) (Nei, 1973), el porcentaje de loci polimórficos ($\%P$) y el índice de Shannon (I) el cual no asume equilibrio de Hardy-Weinberg (Lewontin, 1972). También se calculó la diferenciación genética (G_{st}) y el flujo genético (N_m) de manera indirecta como $N_m = 0.5 (1 - G_{st}) / G_{st}$. Todos estos análisis se llevaron a cabo en el programa Popgene v1.31 (Yeh et al., 1999). En GenAlEx v6.5 (Peakall y Smouse, 2006) se llevaron a cabo los siguientes análisis: un análisis de varianza molecular (AMOVA); las distancias genéticas entre las poblaciones con el método de Nei (1972) y el estimador no sesgado de Nei (1978); un análisis de coordenadas principales (PCoA) para conocer el agrupamiento de los individuos; y una prueba de Mantel (1967) para conocer la relación entre la distancia genética de Nei y la distancia geográfica lineal de las poblaciones.

La estructura genética se determinó con un análisis bayesiano en el programa STRUCTURE v2.3 (Pritchard et al., 2000) donde los datos se tomaron en cuenta como marcadores dominantes (Falush et al., 2007) usando el modelo de ancestría mezclada y frecuencias alélicas correlacionadas. El análisis se hizo con un periodo burn-in de 100,000, una longitud de corrida de 1,000,000 repeticiones de MCMC (cadena Markov Monte Carlo) y 10 réplicas independientes para cada valor de K (1 a 6). Con los resultados arrojados por STRUCTURE se determinó el número adecuado de grupos con el valor de delta K de acuerdo con Evanno et al. (2005) en el programa en línea Structure Harvester v0.6.94 (Earl y VonHoldt, 2012) y se generaron las gráficas de ancestría del valor óptimo de K usando STRUCTURE. Por otro lado, se usó el programa Barrier v.2.2 (Manni et al., 2004) para detectar las posibles barreras en el flujo genético de *B. stormiae* con el algoritmo de Monmonier, usando las diferencias genéticas de Nei que se obtuvieron en GenAlEx v6.5 (Peakall y Smouse, 2006).

Análisis de la variación morfológica foliar

Se definieron los landmarks (puntos homólogos entre estructuras u organismos) en los extremos de las hojas (ápice y base) y los semilandmarks en las zonas de mínima o máxima cobertura (López Galán, 2015) con ayuda del programa MakeFan (Rohlf, 2005). El registro de las coordenadas de 2 landmarks y 42 semilandmarks en cada una de las 237 hojas se realizó en tpsDig2 (Rohlf, 2005). Se realizó un proceso de relajación de semilandmarks en el programa CoordGen6 en el paquete IMP (Sheets, 2004). Posteriormente se llevó a cabo una superposición de Procrustes en el programa MorphoJ (Klingenberg, 2011) con la finalidad de eliminar el efecto de la localización, escala, rotación y tamaño. En el mismo programa realizó un análisis de componentes principales (PCA) y uno de variables canónicas (CVA) de los puntos Procrustes para observar la variación morfológica foliar entre las poblaciones estudiadas.

Se analizó la influencia de 19 variables climáticas del Atlas Climático Digital de México (UNAM) y 15 de Environmental Rasters for Ecological Modeling (ENVIREM), sobre la morfología de las hojas. Adicionalmente se usaron la radiación media anual, la Latitud y Longitud fueron incluidas en la matriz de datos. Para llevar a cabo el análisis, primero se eliminaron las variables que representaran la misma medición en ambos conjuntos de datos y posteriormente se realizó un análisis de correlación entre las variables en Rstudio para descartar aquellas que estuvieran muy relacionadas. Finalmente, se llevó a cabo un análisis de mínimos cuadrados (PLS) en MorphoJ para conocer la relación entre la morfología y las variables climáticas.

Para evaluar la relación de la diferenciación morfométrica con la distancia geográfica y la diferenciación genética se llevó a cabo una prueba de Mantel en GenAlex. Se utilizaron las distancias de Mahalanobis entre grupos que resultaron al realizar el análisis de variables canónicas en MorphoJ. Las distancias genéticas utilizadas fueron las *fst* pareadas de *rps16* y ETS.

Por otro lado, se analizó la relación entre el área foliar contra el diámetro a la altura del pecho (DAP) y la altura de los individuos, esto con el fin de descartar que la variación en el área de las hojas se deba al tamaño de los individuos. Se obtuvo el área para cada una de las hojas mediante Adobe Photoshop CS6 Portable y se realizó un análisis de ANOVA para conocer si existen diferencias en el área foliar entre poblaciones y regiones.

RESULTADOS

Diversidad y diferenciación genética con *rps16* y ETS

El alineamiento de las bases del *rps16* excluyendo los datos faltantes o con gaps, constó de 72 individuos y 716 pb. Se obtuvieron 13 secuencias para San Andrés Coru, 19 para Arocutín, 12 para Nuevo San Juan, 13 de Zacapu y 15 de Manantlán. Por otra parte, el ADN nuclear presentó cuatro eventos de recombinación que fueron removidos con el programa IMgc (Woerner et al., 2007), resultando una base de datos sin recombinación con un total de 60 individuos, 109 secuencias y 560 pb.

Con el intrón *rps16* se encontraron tres sitios polimórficos y dos haplotipos. La diversidad haplotípica ($Hd=0.335 \pm 0.056$) y nucleotídica ($\pi = 0.0014 \pm 0.00024$) fueron bajas. Los valores de Nst y Gst son iguales, indicando que no hay estructura filogeográfica con este marcador. Por otro lado, de acuerdo con la medida indirecta de Nm (0), no hay flujo genético entre las poblaciones. Además, tanto con D de Tajima como con Fs de Fu , se obtuvieron valores positivos no significativos, por lo que no hay desviaciones a la neutralidad (tabla 3).

En contraste, con los datos nucleares se obtuvieron 16 ribotipos, 17 sitios polimórficos y diversidad nucleotídica baja ($\pi=0.00187$), con poco flujo genético (0.56). Por otra parte, el promedio de diversidad dentro de poblaciones y la diversidad haplotípica total fueron mayores ($hS=0.484$, $Hd=0.705 \pm 0.041$). Además, el análisis de permutaciones indica que el valor de Nst fue mayor al de Gst ($Nst=0.377$, $Gst=0.362$), sin embargo, estas diferencias no fueron significativas por lo que no existe estructura filogeográfica. Finalmente, las pruebas de neutralidad para el total de las poblaciones fueron negativas y significativas. Con estos resultados, la prueba de D de Tajima (-1.8861, $P < 0.05$) indica que hay exceso de polimorfismos poco frecuentes que representan nuevas mutaciones. En tanto que, la prueba de Fs de Fu (-11.45) y la distribución unimodal de Mismatch indican que hay expansión demográfica (tabla 3 y figura 13).

Tabla 3. Estimadores genéticos para el ADN nuclear y de cloroplasto		
	<i>rps16</i>	ETS
N	72	60
Número de secuencias	72	109
Longitud de secuencias (pb)	716	560
S	3	17
H	2	16
Hd	0.335 ± 0.056	0.705 ± 0.041
π	0.0014 ± 0.00024	0.00187
Gst	1	0.362
Nst	1	0.377
Nm	0	0.56
D de Tajima	1.18701	-1.8861* (P < 0.05)
Fs de Fu	4.276	-11.45

N=# de individuos, S=# de sitios polimórficos, H=# de haplotipos, Hd=diversidad haplotípica, π=diversidad nucleotídica, Nm=flujo genético (Nei 1973).

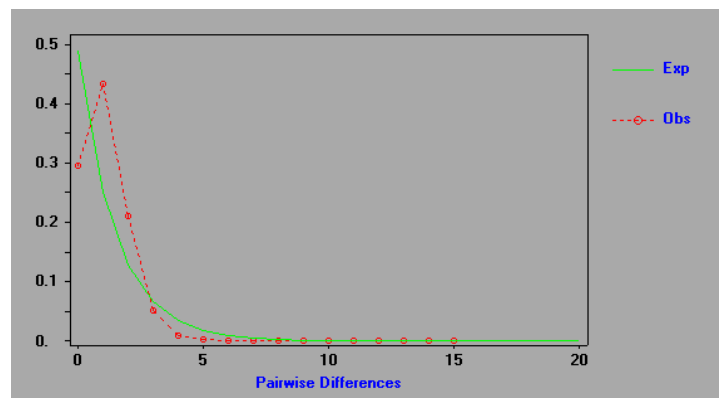


Figura 13. Distribución de Mismatch de las diferencias pareadas de ETS

De acuerdo al análisis de diversidad por población con el ETS (tabla 4), las poblaciones con mayor diversidad haplotípica y nucleotídica son Arocutín y Zacapu, en cambio la que tiene menor diversidad es Manantlán. En cuanto a la estimación de la neutralidad con la D de Tajima y F_s de Fu, Zacapu presenta valores negativos significativos, lo que significa que hay desviaciones de la neutralidad esperada y está bajo una expansión poblacional.

Tabla 4. Medidas de diversidad para el ETS por población

	Arocutín	Zacapu	San Andrés Coru	Nuevo San Juan	Manantlán
# secuencias	30	14	21	23	21
# haplotipos	6	6	5	5	2
S	8	5	4	4	1
<i>Hd</i>	0.65287 ± 0.0716	0.68132 ± 0.1316	0.5381 ± 0.1145	0.45455 ± 0.1234	0.09524 ± 0.0843
π	0.00237 ± 0.001689	0.00149 ± 0.001266	0.00119 ± 0.001062	0.0009 ± 0.000886	0.00017 ± 0.000344
D de Tajima	-1.03894	-1.62314	-1.14096	-1.47698	-1.16356
P-valor, D de Tajima	0.165	0.038	0.192	0.066	0.146
F_s de Fu	-0.80868	-3.54967	-2.11904	-2.77552	-0.9189
p-valor, F_s de Fu	0.333	0.001	0.032	0.013	0.081

S= número de sitios polimórficos, *Hd* = diversidad haplotípica, π = diversidad nucleotídica

El análisis molecular de varianza con el intrón *rps16* cuando no es considerada la diferenciación regional, muestra que la totalidad de la variación está localizada entre poblaciones. De igual manera cuando se toma en cuenta la regionalización (Michoacán y Jalisco) la totalidad de la variación se explica por las diferencias entre regiones (tabla 5).

Por otra parte, en el análisis con el espaciador transcrito externo, el AMOVA a nivel poblacional no regionalizado sugiere que la mayoría de la variación se encuentra dentro de las poblaciones con un 64.34%. No obstante, al realizar el análisis con diferenciación regional, la variación es explicada por las regiones con un 47.93%, seguido por la variación dentro de las poblaciones con 45.66% (tabla 6).

Tabla 5. Análisis de varianza molecular para <i>rps16</i>					
	Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	% de variación	Índice de fijación
AMOVA por poblaciones	Entre poblaciones	4	35.625	100	FST=1**
	Dentro de poblaciones	67	0	0	
	Total	71	35.625		
AMOVA por regiones	Entre grupos	1	35.625	100	FCT=1
	Entre poblaciones	3	0	0	FSC=0
	Dentro de poblaciones	67	0	0	FST=1**
	Total	71	35.625		

* $P < 0.001$, ** $P < 0.0001$

Tabla 6. Análisis de varianza molecular para ETS					
	Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	% de variación	Índice de fijación
AMOVA por poblaciones	Entre poblaciones	4	18.818	35.66	FST= 0.35660**
	Dentro de poblaciones	104	37.88	64.34	
	Total	108	56.697		
AMOVA por regiones	Entre grupos	1	14.427	47.93	FCT=0.47931
	Entre poblaciones	3	4.391	6.41	FSC=0.12308*
	Dentro de poblaciones	104	37.88	45.66	FST= 0.54340**
	Total	108	56.697		

* $P < 0.001$, ** $P < 0.0001$

Redes de haplotipos y barreras genéticas con *rps16* y ETS

Los datos del intrón *rps16* presentan una escasa variación con solo dos haplotipos. Sin embargo, esta fue la región de cloroplasto, de las 19 probadas preliminarmente, en la que se encontró la mayor variación. En este análisis el haplotipo con mayor frecuencia y distribución fue el H1 en 57 muestras y 4 poblaciones, en tanto que el H2 se encontró en 16 muestras y una población. Estos dos haplotipos se encuentran separados por tres mutaciones; el H1 se presentó solo en las poblaciones de Michoacán y el H2 en Manantlán y en el único individuo de Colima (figura 14).

La variación que presenta el espaciador transcrito externo es mayor a la presente en el *rps16* ya que se encontraron 16 ribotipos (figura 15). El ribotipo con mayor distribución y abundancia fue el H2 en 55 muestras de Michoacán, seguido por el ribotipo H15 en 20 muestras de Jalisco. Se encontraron 9 ribotipos únicos, uno en San Andrés Coru, tres en Arocútin, dos en Nuevo San Juan, dos en Zacapu y uno en Manantlán. Por otro lado, no hay haplotipos compartidos entre Michoacán y Jalisco, por lo que hay dos grupos genéticos separados. La separación de haplotipos con los dos tipos de marcadores es congruente con la barrera en el flujo genético detectada por el algoritmo de Monmonier (figuras 14 y 15).

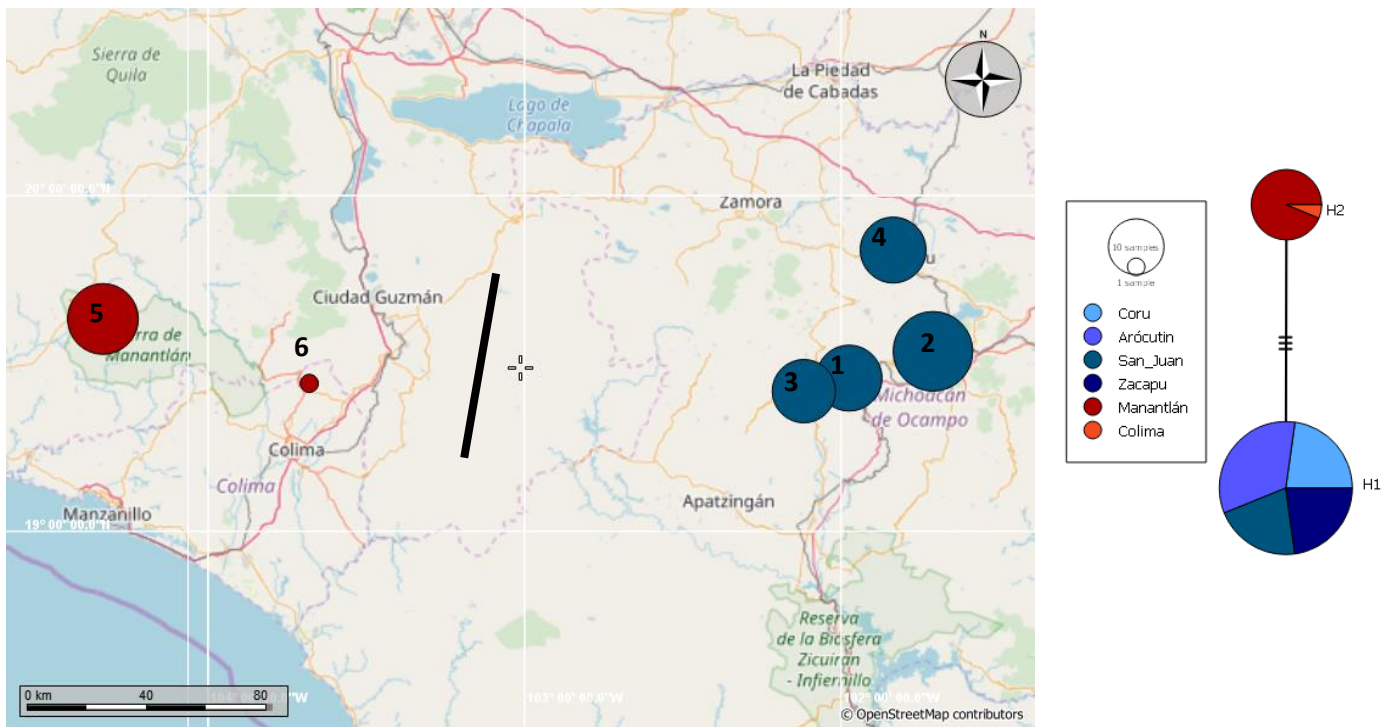


Figura 14. Relaciones y distribución geográfica de los haplotipos de *rps16*. La línea negra representa la barrera genética detectada. .
 1=Coru, 2=Arocútin, 3=San Juan, 4=Zacapu, 5=Manantlán

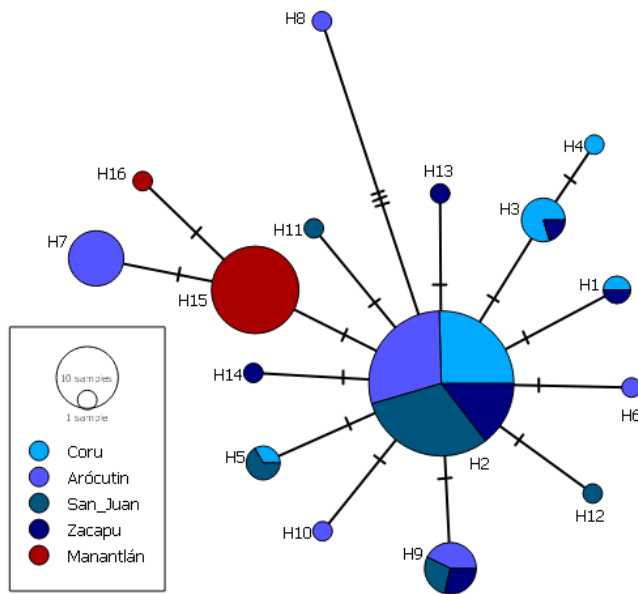
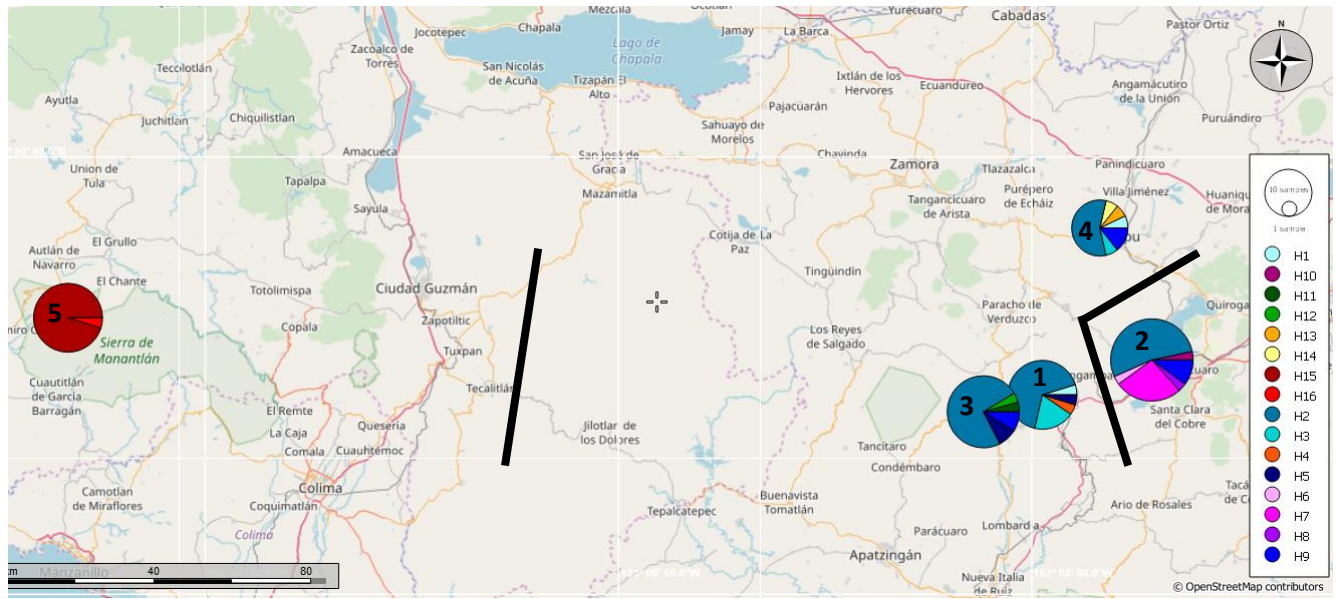


Figura 15. Distribución geográfica y red de los ribotipos del espaciador transcrito externo (ETS). El color de las poblaciones en el mapa no coincide totalmente con los de la red. 1=Coru, 2=Arocutín, 3=San Juan, 4=Zacapu, 5=Manantlán

Prueba de Mantel con ETS y *rps16*

Los resultados de la prueba de Mantel (figuras 16 y 17), indican que existe una alta relación positiva de la distancia geográfica con las distancias genéticas calculadas mediante los datos de *rps16* y ETS, sin embargo, esta no es significativa ($R^2=0.983$ y $R^2=0.831$ $p>0.05$, respectivamente).

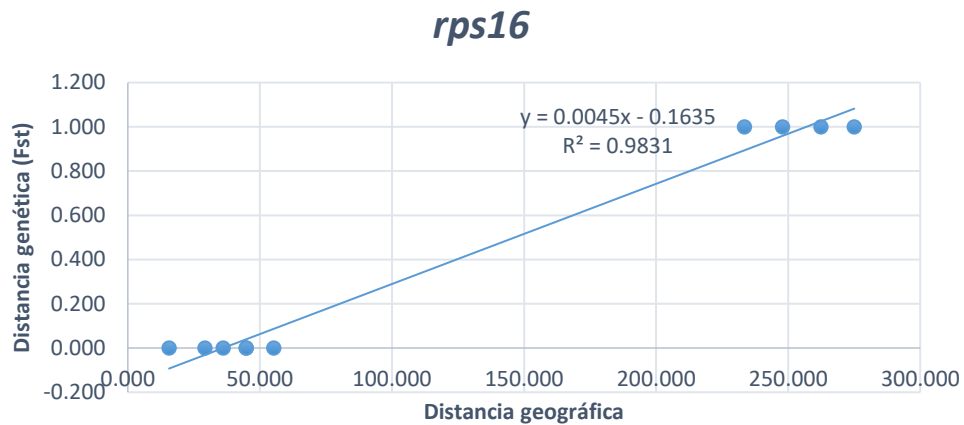


Figura 16. Prueba de Mantel entre distancia geográfica y genética con la región *rps16*

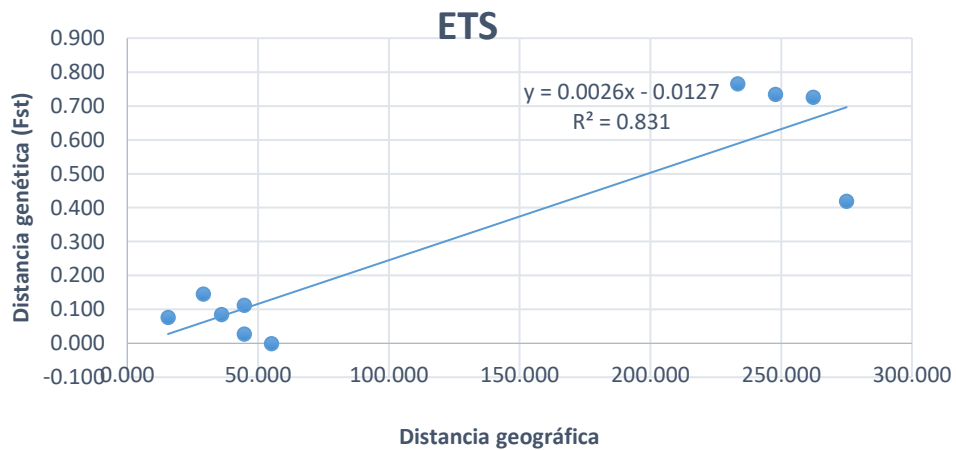


Figura 17. Prueba de Mantel con la distancia geográfica y genética con ETS

Diversidad genética con ISSR

Se obtuvo una matriz de datos para siete ISSR con 81 individuos de cinco poblaciones, la cual tuvo un número variable de individuos por marcador y población (tabla 7). Se obtuvieron 97 loci (bandas) oscilando entre 11 y 22 por marcador y se generaron 81 genotipos diferentes. La curva de acumulación de genotipos de 63 individuos (excluyendo a los individuos con datos faltantes) llega a la asíntota, lo que indica que tenemos un buen número de loci muestreados (figura 18).

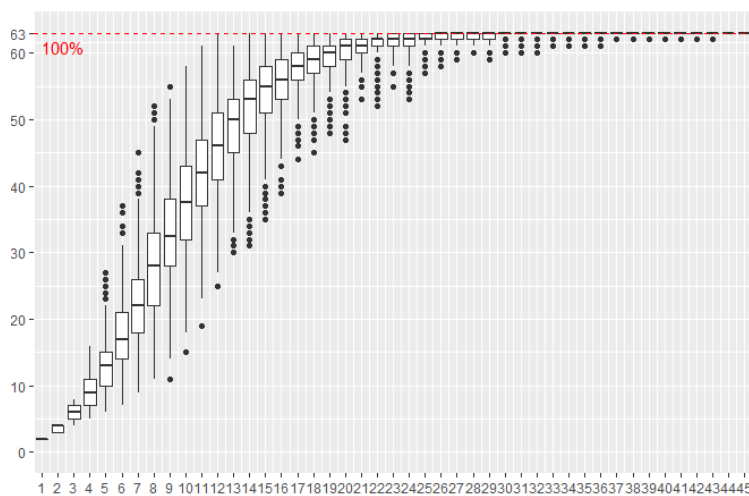


Figura 18. Curva de acumulación de genotipos, el eje X representa el número de loci muestreados, el eje Y el número de genotipos observados y la línea roja es la asíntota.

Tabla 7. Número de individuos por población para cada marcador ISSR							
Marcador	Número de loci	San Andrés	Arocutín	Nuevo San	Zacapu	Manantlán	TOTAL
		Coru		Juan			
UBC807	11	15	13	16	13	14	71
UBC811	12	16	19	16	14	16	81
UBC841	22	16	13	16	14	12	71
UBC842	12	15	19	13	14	14	75
UBC844	12	16	10	14	14	9	63
UBC825	13	13	11	14	11	14	63
UBC814	15	16	17	16	14	14	77

Con las Intersecuencias simples repetidas se encontró un alto número alelos (78) y porcentaje de loci polimórficos totales (80.41%). La población de Arocutín fue la más diversa ya que presenta el mayor porcentaje de loci polimórficos (60.82%), el mayor número de alelos observados (N_a) y alelos efectivos (N_e), así como los valores más altos de diversidad genética de Nei (h) y de Shannon (I). Estos valores son similares entre las poblaciones, por el contrario, la población de Manantlán es la que presenta menores niveles de diversidad (tabla 8). Por otro lado, el G_{st} es moderado (0.177), indicando moderada diferenciación con flujo genético mayor a 1 ($N_m=2.33$) (Tabla 9).

Tabla 8. Medidas de diversidad genética con ISSR						
Población	N_a^*	N_e^*	h^*	I^*	# loci polimórficos	% loci polimórficos
Arocutín	1.6082	1.3953	0.2271	0.3359	59	60.82
SD	0.4907	0.3884	0.2064	0.2933		
Zacapu	1.5876	1.3733	0.2149	0.3179	57	58.76
SD	0.4948	0.3843	0.2076	0.2953		
Nuevo San Juan	1.567	1.3744	0.2115	0.3103	55	56.70
SD	0.4981	0.3995	0.2135	0.3027		
San Andrés Coru	1.5464	1.3661	0.2084	0.3068	53	54.64
SD	0.5004	0.3948	0.2104	0.2997		
Manantlán	1.5361	1.3019	0.1778	0.2682	52	53.61
SD	0.5013	0.3656	0.197	0.2821		
TOTAL	1.8041	1.4249	0.2518	0.3832	78	80.41
SD	0.3989	0.3644	0.1858	0.2546		

* N_a =# de alelos observados; N_e =# de alelos efectivos [Kimura and Crow (1964)]; h =diversidad genética de Nei (1973); I =índice de Shannon [Lewontin (1972)]

Tabla 9. Análisis de diversidad genética de Nei en Poblaciones Subdivididas				
	h_T	h_S	G_{st}	N_m^*
Media	0.2527	0.2079	0.177	2.3248
SD	0.0346	0.0263		

* N_m = estimación del flujo genético mediante G_{st} o G_{cs} . P. ej. $N_m = 0.5(1 - G_{st})/G_{st}$

Diferenciación y estructura genética con ISSR

Se llevaron a cabo dos pruebas de AMOVA partiendo a la variación genética en poblaciones y en regiones (Michoacán y Jalisco). En ambos casos la mayor variación se encuentra dentro de las poblaciones (85% y 79% respectivamente) y la menor entre poblaciones con (15% y 7% respectivamente). Por otro lado, al dividir regionalmente, la diferenciación genética es mayor entre regiones que entre poblaciones (figuras 19 y 20; tablas 10 y 11).

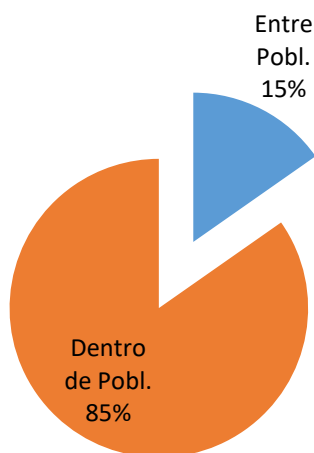


Figura 19. AMOVA entre poblaciones

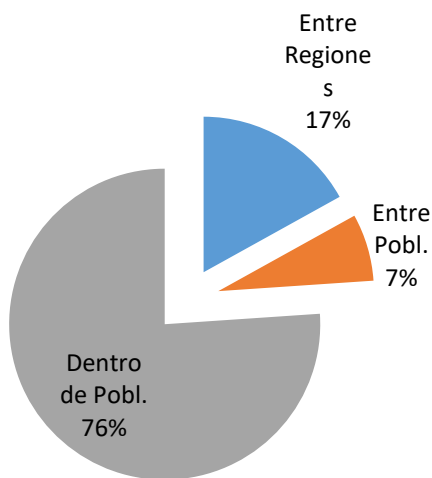


Figura 20. AMOVA entre regiones

Tabla 10. AMOVA entre poblaciones

Fuente	gl	SC	CM	Var. Est.	%
Entre Poblaciones	4	154.959	38.740	1.785	15
Dentro de Poblaciones	76	752.376	9.900	9.900	85
Total	80	907.335		11.684	100
Estadístico	Valor	P (rand >= data)			
PhiPT	0.153	0.001			

gl=grados de libertad, SC=suma de cuadrados, CM=cuadrados medios, Var. Est.=varianza estimada, %=porcentaje de variación

Tabla 11. AMOVA entre regiones

Fuente	gl	SC	CM	Var. Est.	%
Entre Regiones	1	81.141	81.141	2.205	17
Entre Poblaciones	3	73.818	24.606	0.909	7
Dentro de Poblaciones	76	752.376	9.900	9.900	76
Total	80	907.335		13.013	100
Estadístico	Valor	P (rand >= data)			
PhiRT	0.169	0.001			
PhiPR	0.084	0.001			
PhiPT	0.239	0.001			

gl=grados de libertad, SC=suma de cuadrados, CM=cuadrados medios, Var. Est.=varianza estimada, %=porcentaje de variación

En el Análisis de Coordenadas Principales encontramos la formación de dos grupos principales con una separación evidente (figura 21). El primero de ellos está conformado por los individuos de Manantlán y el segundo por los individuos de las poblaciones de Michoacán. Sin embargo, la variación explicada por los tres primeros componentes es relativamente baja (23.71%), donde el primer eje explica solo el 11.14% de la variación.

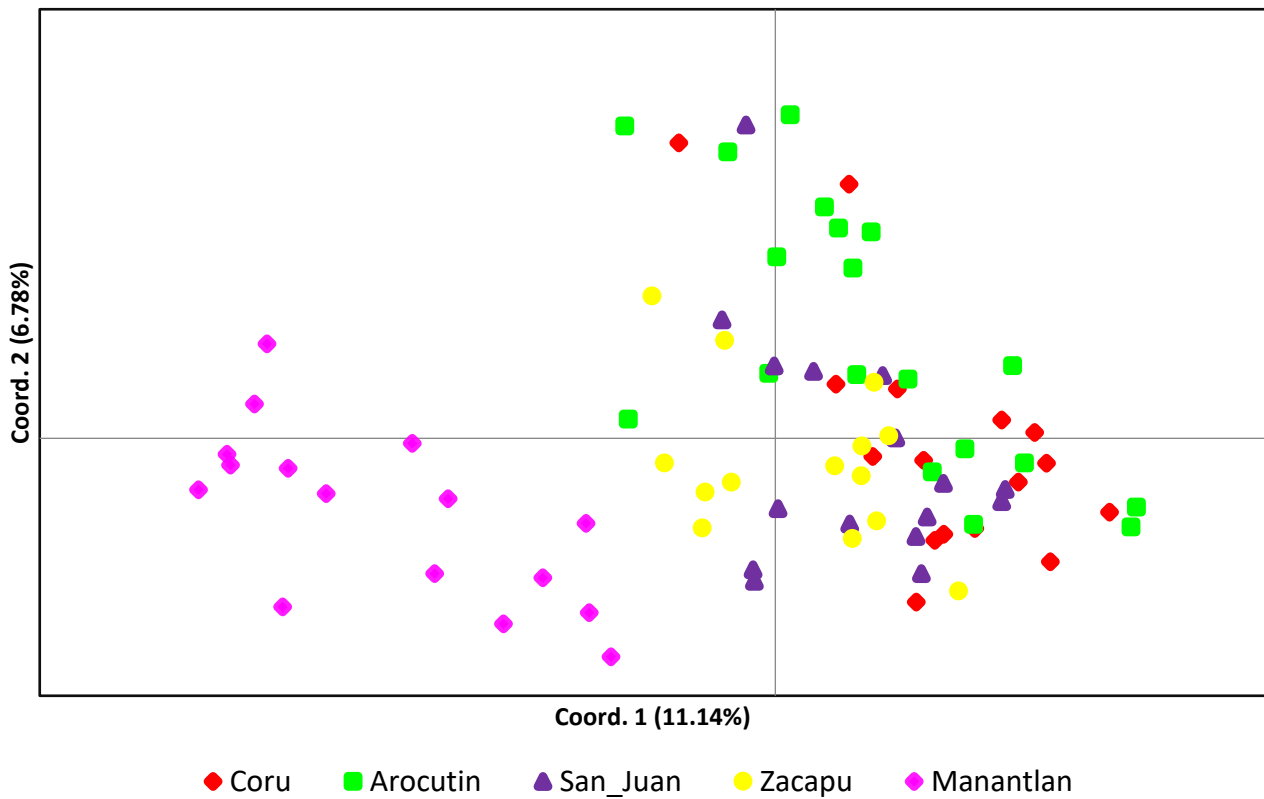


Figura 21. Análisis de Coordenadas Principales (PCoA)

En el análisis con STRUCTURE, el delta K de Evanno indica que el número de grupos genéticos es de cuatro, sin embargo, aquí reportamos también el de dos ya que presenta otro delta K alto (figura 22). Estos dos tipos de estructura coinciden con la distribución geográfica de *B. stormiae* en donde los dos grupos genéticos se separan de acuerdo con la distancia entre las poblaciones de Jalisco y Michoacán, pero con ancestría mezclada en algunos individuos (figura 23). Por otro lado, con un delta K de 4 también existe ancestría mezclada, sin embargo, también existe separación entre los grupos genéticos de Jalisco y Michoacán (figura 24). En el caso de Michoacán las poblaciones se encuentran menos estructuradas con mayor ancestría mezclada.

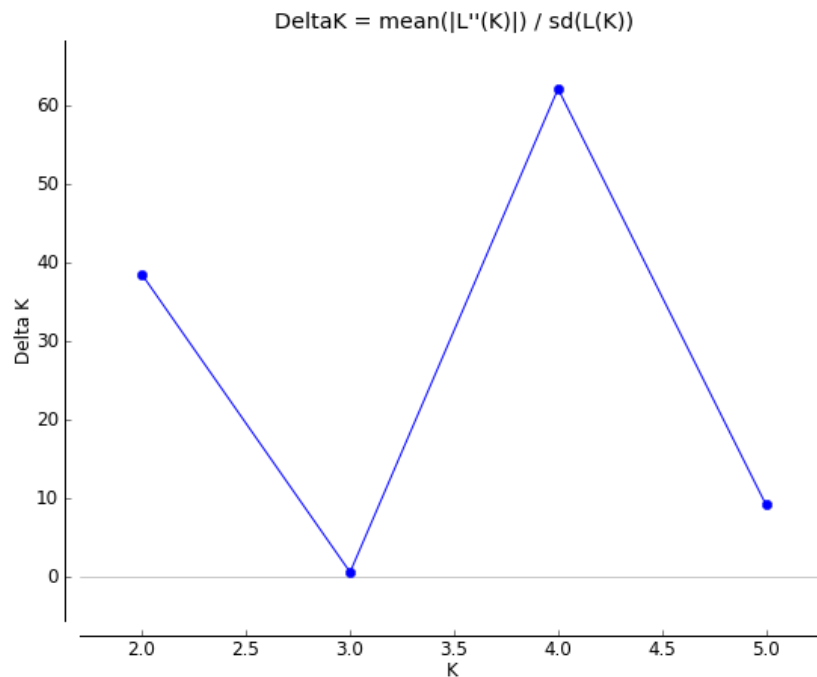


Figura 22. Gráfica de los valores de delta K para los grupos probados

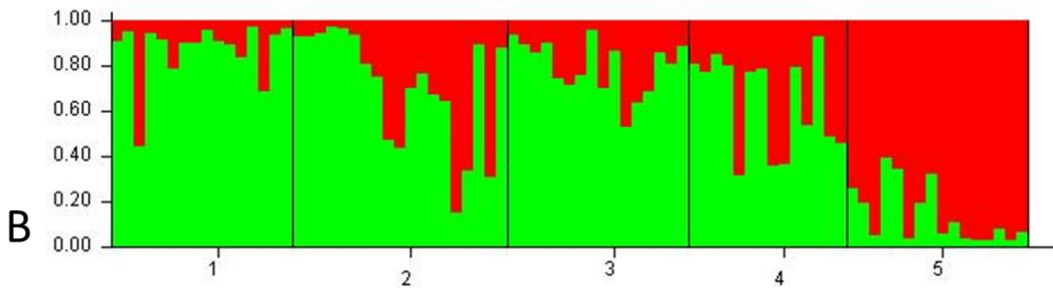
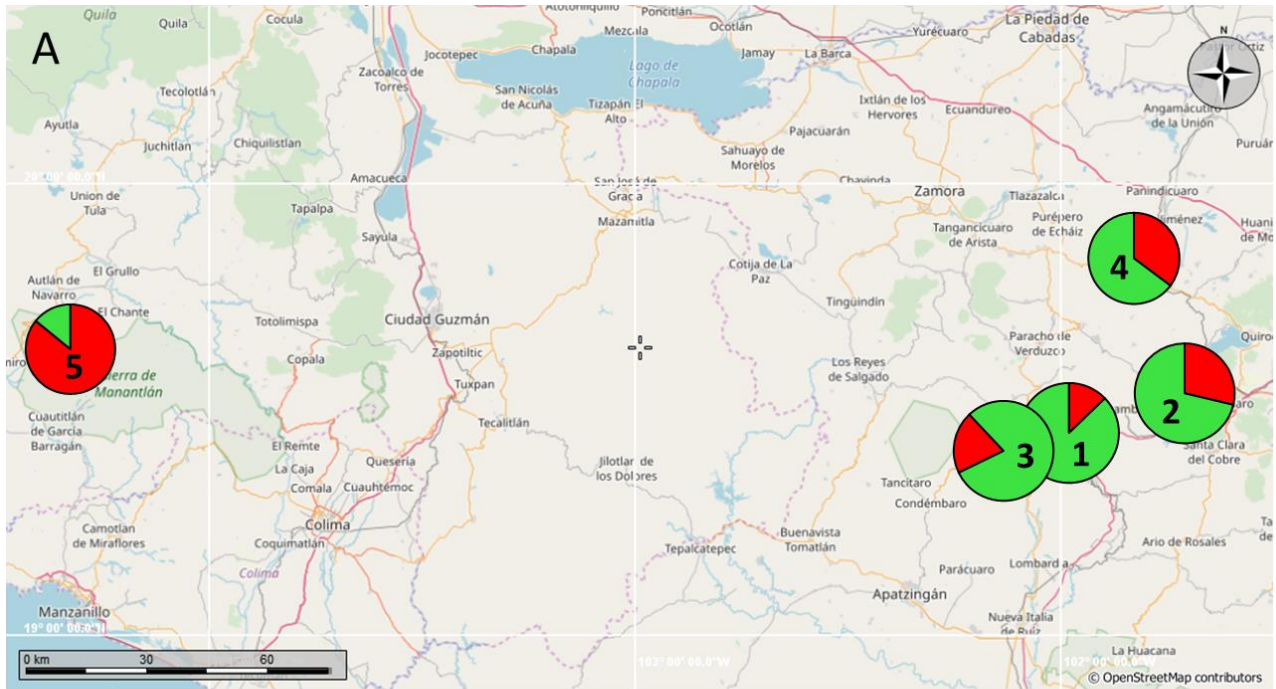


Figura 23. A) Distribución y B) asignación de los grupos genéticos encontrados para el delta K=2. Los números corresponden a: 1= San Andrés Coru, 2= Arocutín, 3= Nuevo San Juan, 4= Zacapu y 5= Manantlán

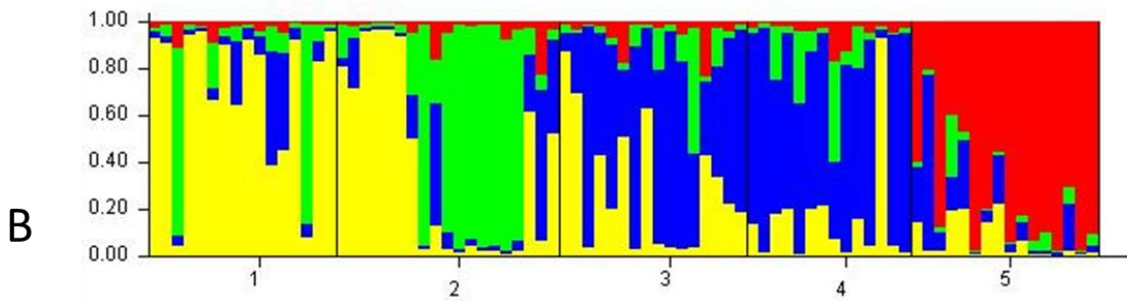
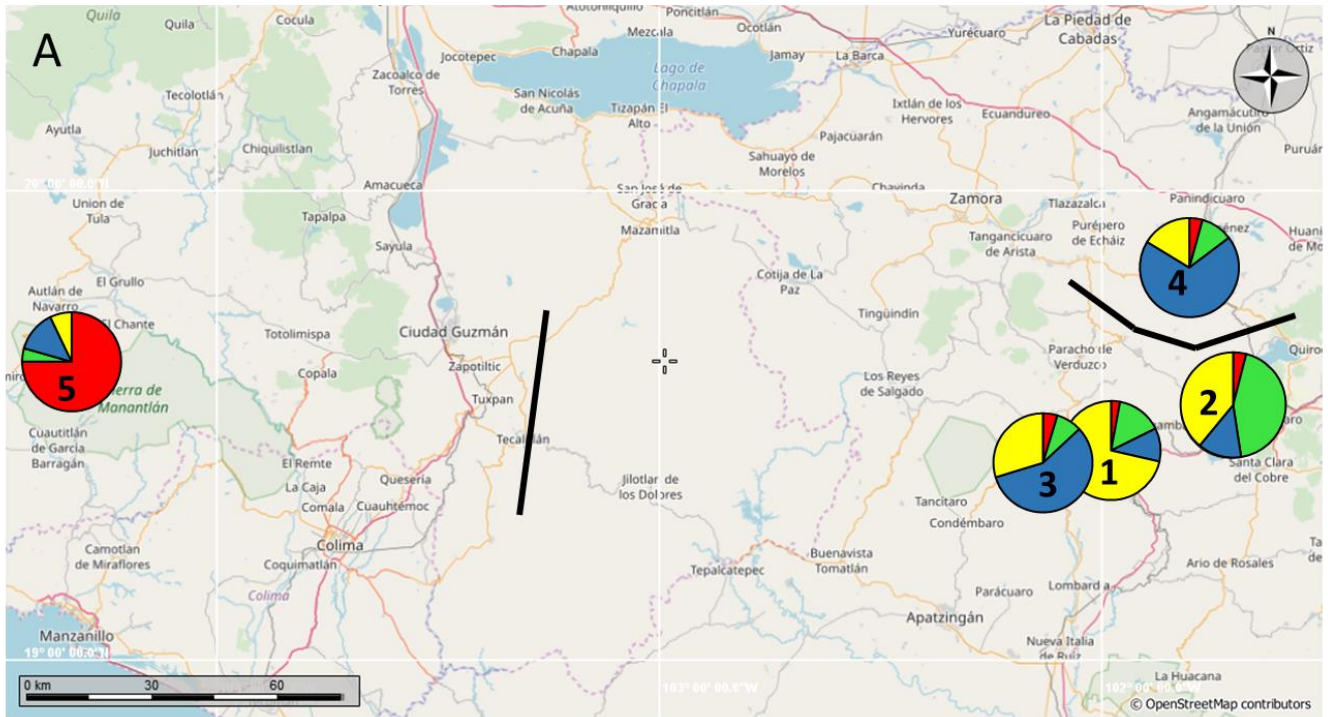


Figura 24. A) Distribución y B) asignación de los grupos genéticos encontrados para el delta K=4. Los números corresponden a: 1= San Andrés Coru, 2= Arocutín, 3= Nuevo San Juan, 4= Zacapu y 5= Manantlán. Las líneas negras corresponden a las barreras en el flujo genético encontradas.

Prueba de Mantel con los datos de ISSR

La prueba de Mantel indica que, a diferencia con los datos de ETS y *rps16* existe una correlación positiva significativa ($R^2=0.921$, $P<0.05$) entre las distancias genéticas y las geográficas de las poblaciones (figura 25).

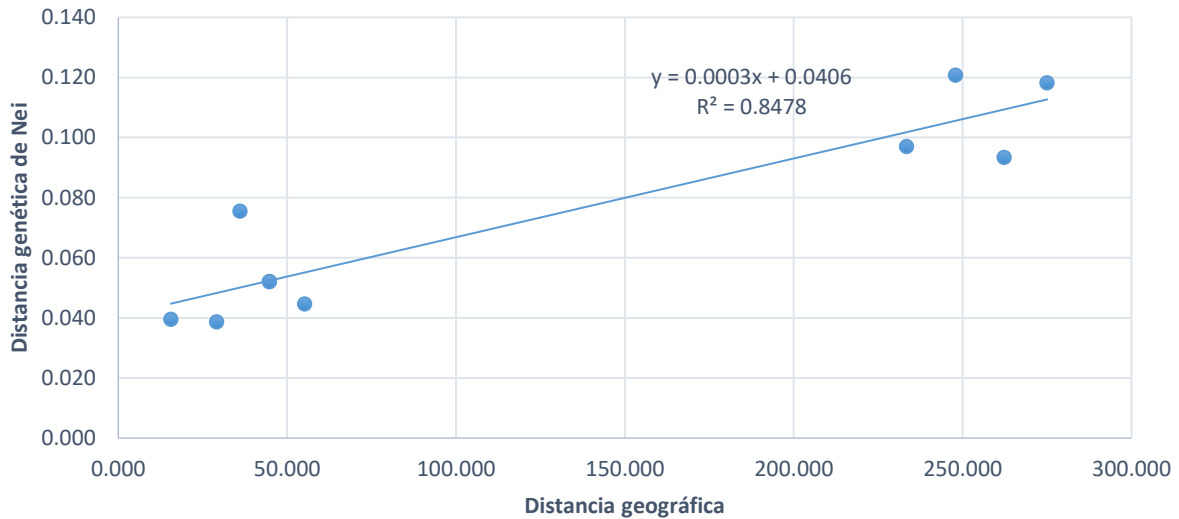


Figura 25. Prueba de Mantel con distancia geográfica y genética de Nei con datos de ISSR

Análisis de morfometría geométrica foliar

Para el análisis morfométrico se obtuvieron un total de 293 hojas de 47 individuos, solo de 4 poblaciones (Arocutín, Nuevo San Juan, Zacapu y la Sierra de Manantlán) con un promedio de 7 hojas por individuo. Sin embargo, se descartaron las hojas dobladas durante el proceso de prensado, quedando un total de 237 hojas de 44 individuos. Finalmente se digitalizaron 2 landmarks, uno en la punta y otro en la base de las hojas, y 42 semilandmarks en el margen de las hojas (figura 26).

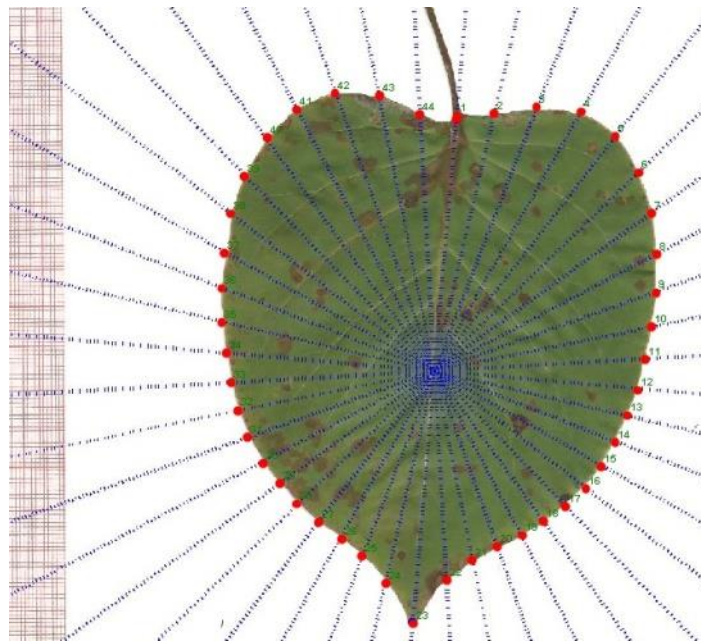


Figura 26. Digitalización de las marcas en tpsDig2 sobre la plantilla diseñada en MakeFan

El análisis de componentes principales (PCA) no muestra la diferenciación en la forma de las hojas entre las poblaciones (resultados no mostrados, los dos primeros componentes explicaron el 66.74% de la variación) por lo que se realizó un análisis de variables canónicas (CVA) para maximizar la variación. En el CVA se observó que las dos primeras variables canónicas explican el 74.93% de la variación (CV1=44.25 y CV2=30.67%), apreciándose la diferenciación morfológica significativa entre las poblaciones (λ de Wilks = 0.05017, $p < 0.001$, $df = 252$, $F = 3.063$).

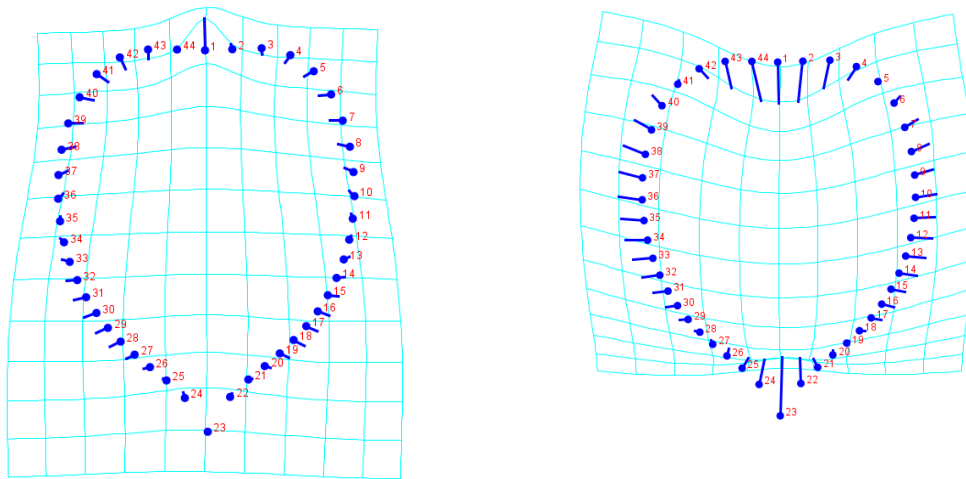
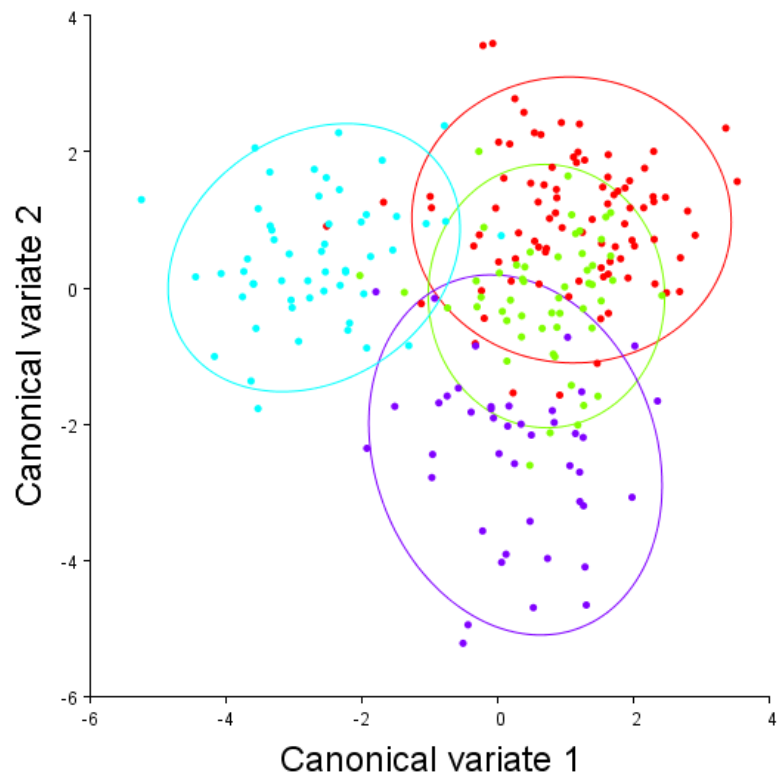


Figura 27. Resultados del CVA y gradillas de deformación, la izquierda del CV1 y la derecha del CV2. Los colores y elipses indican la población. Rojo=Arocután, verde=Nuevo San Juan, morado=Zacapu y azul=Sierra de Manantlán, Jalisco.

Con el CV1 los individuos de la Sierra de Manantlán se separan de las poblaciones de Michoacán (Zacapu, Erongarícuaro, San Juan Nuevo y San Andrés Coru). Mientras que el CV2 muestra que los individuos de Zacapu se separan del resto de las poblaciones (figura 27). En ambos casos se observa un traslape entre las agrupaciones. Los mayores cambios morfométricos se presentan son en la punta y en la base de las hojas. En las gradillas de deformación con el CV1 (izquierda) se presentan hojas más puntiagudas y bases menos acorazonadas. Mientras que con el CV2 (derecha) hay cambios con puntas menos pronunciadas y bases acorazonadas.

Para llevar a cabo el análisis de PLS primero se descartaron las variables más relacionadas, por lo que de las 19 variables climáticas del Atlas Climático Digital de México (UNAM) se utilizaron 10 y de las 15 de Environmental Rasters for Ecological Modeling (ENVIREM) se utilizaron 7. Adicionalmente se utilizó una variable de radiación media anual y la latitud y longitud en la base de datos, quedando un total de 20 variables (tabla 12).

Tabla 12. Variables climáticas utilizadas en este estudio

Bio1	Temperatura media anual (°C)
Bio3	Rango de temperatura media diurna (media mensual de (temp. máxima – temp. mínima))
Bio4	Estacionalidad de la temperatura (desviación estándar * 100)
Bio8	Temperatura promedio del trimestre más lluvioso (°C)
Bio10	Temperatura promedio del trimestre más cálido (°C)
Bio12	Precipitación anual (mm)
Bio14	Precipitación del mes más seco (mm)
Bio15	Estacionalidad de la precipitación (coeficiente de variación)
Bio16	Precipitación del trimestre más lluvioso (mm)
Bio18	Precipitación del trimestre más cálido (mm)
PETWarmes	Evapotranspiración potencial media mensual del trimestre más cálido
PETWettest	Evapotranspiración potencial media mensual del trimestre más húmedo
PETDriest	Evapotranspiración potencial media mensual del trimestre más seco
continenta	Temperatura media del mes más cálido - Temperatura media del mes más frío
annualPET	Evapotranspiración potencial anual
PETseasona	Variación mensual en evapotranspiración potencial
aridityInd	Grado de déficit hídrico por debajo de la necesidad de agua
Rad med	Radiación media anual
anual	
Latitud	
Longitud	

El análisis de mínimos cuadrados o PLS indica que hay una correlación baja pero significativa entre las variables climáticas y la forma de las hojas ($RV= 0.0881$, $P < 0.0001$). El eje del PLS1 explica el 98.02% de la variación en la forma y el PLS2 solo el 1.88% ($P < 0.0001$) (tabla 13).

Tabla 13. Valores singulares y correlaciones por pares de puntajes PLS entre bloques					
	Valores singulares	Valor de P	% total covarianza	Correlación	Valor de P
PLS1	2.47609231	<.0001	98.02	0.3902	<.0001
PLS2	0.34373211	0.0003	1.889	0.41761	<.0001
PLS3	0.07553303	<.0001	0.091	0.27927	0.0001

Los resultados arrojan que la variación mensual en la evapotranspiración potencial (PET seasona) y la estacionalidad de la temperatura (Bio4) están negativamente correlacionados en el PLS1 (-0.39686943, -0.10407405). Por otra parte, la precipitación anual (Bio 12) y la precipitación del trimestre más lluvioso (Bio 16) están positivamente correlacionadas (0.75681868 y 0.50259059) (tabla 14). En la figura de las coordenadas de Procrustes contra las variables climáticas (figura 28 a) se observa que Arocutín y Zacapu presentan valores negativos en donde las bases de las hojas son más redondeadas y las puntas agudas, mientras que Nuevo San Juan y Manantlán presentan valores positivos con la base cordada y punta menos aguda. De esta manera tenemos que, de acuerdo con los puntajes en los dos primeros ejes (tabla 14) la precipitación anual (bio12) con mayores valores en Nuevo San Juan y Manantlán y la variación mensual en la evapotranspiración (PETseasona) con valores altos en Zacapu y Arocutín, son los factores ambientales que tienen mayor influencia en la forma de la hoja (figura 28 b).

Por otro lado, el análisis de ANOVA revela que existen diferencias significativas en el área foliar entre regiones Michoacán y Jalisco ($F=19.9$, $P<0.001$) y entre poblaciones ($F=19.05$, $P<0.001$). Las poblaciones más distintas entre sí de acuerdo con la prueba de Tukey, son Manantlán y Zacapu ($Q=10.7$, $P<0.001$), Zacapu y Arocutín ($Q=7.86$, $P<0.001$), Manantlán y Nuevo San Juan ($Q=5.7$, $P<0.001$), y Zacapu contra Nuevo San Juan ($Q=4.95$, $P<0.001$).

Tabla 14. Puntajes en los tres primeros PLS de las variables climáticas

	PLS1	PLS2	PLS3
Bio1	0.00435269	-0.01264496	0.00532876
Bio3	0.0014721	0.01778087	-0.01509214
Bio4	-0.10407405	-0.06843258	0.55003751
Bio8	0.00519924	-0.01510059	0.00695008
Bio10	0.00189916	-0.0117012	0.00840419
Bio12	0.75681868	0.45286897	-0.01935381
Bio14	-0.00351033	-0.00701892	-0.00026358
Bio15	0.00138131	-0.012031	-0.01023478
Bio16	0.50259059	-0.13388922	0.03233913
Bio18	0.06618141	0.40520684	0.34787197
PETWarmes	-0.02314147	0.08511222	0.03136839
PETWettest	-0.00859901	-0.00357577	0.08925955
PETDriest	-0.00093444	0.01924328	0.04348684
continenta	-0.0039937	0.00612039	0.01366572
annualPET	-0.03471917	0.03431386	0.73423121
PETseasona	-0.39686943	0.77101397	-0.15011788
aridityInd	0.00072195	-0.05893904	0.03740942
Rad med anual	0.00004437	0.00026185	-0.00115796
Latitud	-0.00053958	-0.00326021	0.01423811
Longitud	-0.00359675	0.01684129	-0.01673487

La prueba de Mantel (figura 29) indica que hay una relación negativa no significativa entre la distancia genética de *rps16* y la diferenciación morfológica ($R^2=0.97$, $P=0.190$). Sin embargo, la prueba de Mantel con ETS (figura 30) muestra que hay una relación negativa entre la distancia genética y la variación morfológica ($R^2=0.907$, $P=0.01$). Por otro lado, no existe asociación entre la diferenciación morfológica y la distancia geográfica de las poblaciones ($R^2=0.65$, $P=0.08$).

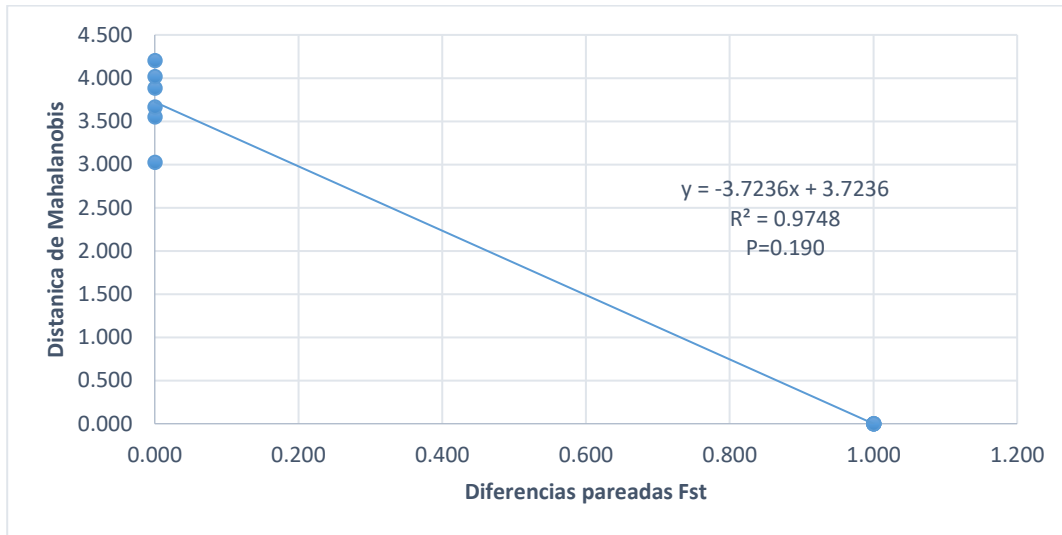


Figura 29. Relación entre diversidad genética de *rps16* y la distancia morfológica.

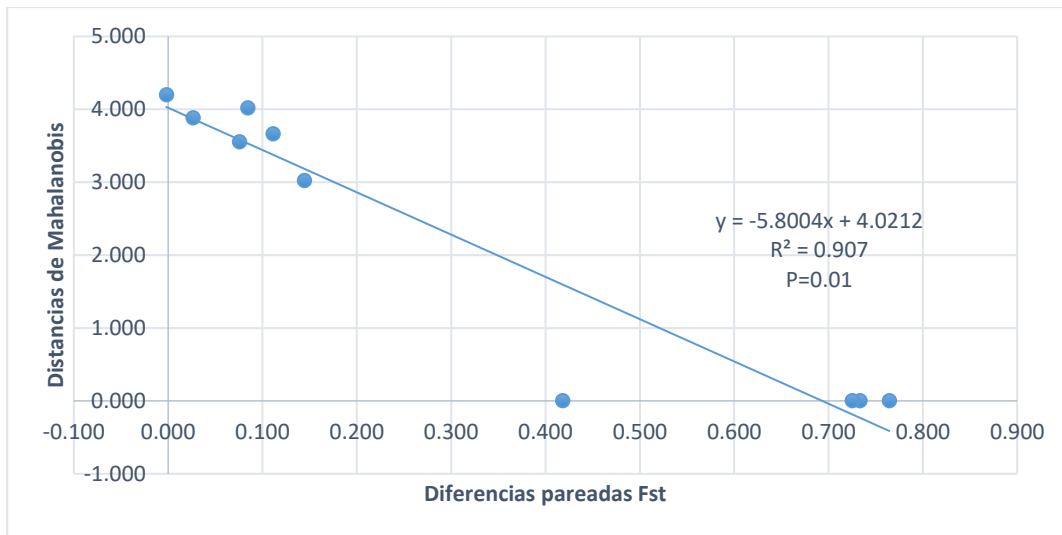


Figura 30. Relación entre diversidad genética de ETS y la distancia morfológica.

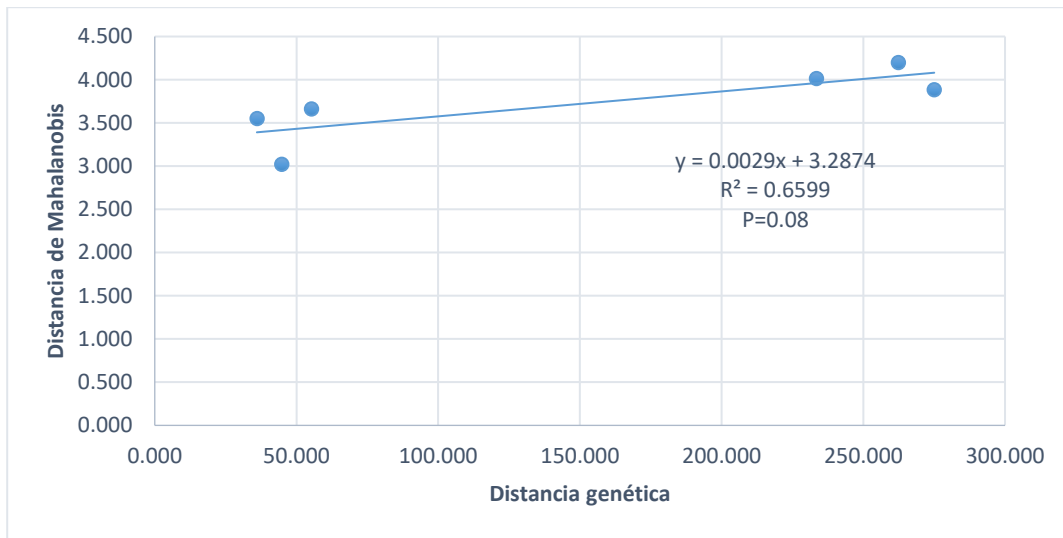


Figura 31. Prueba de Mantel entre a distancia geográfica y morfológica de las poblaciones

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Diversidad y diferenciación genética

Se encontraron bajos niveles de diversidad haplotípica ($Hd=0.335 \pm 0.056$) y nucleotídica ($\pi=0.0014 \pm 0.00024$) con el intrón *rps16* y más altos con el espaciador transcrito externo ($Hd=0.705 \pm 0.041$, $\pi= 0.00187$). Por otro lado, la diferenciación genética es muy alta ($Gst=1$) con *rps16*, alta con ETS ($Gst=0.362$) y moderada con ISSR ($Gst=0.177$). Estos resultados pueden ser explicados por la capacidad de dispersión del polen, el cual está generalmente relacionado con un mayor flujo de genes en comparación con las semillas (Petit et al., 2005). Las diferencias en el tamaño efectivo poblacional entre las regiones de cloroplasto y las nucleares también explican los resultados encontrados; el N_e pequeño asociado con una mayor deriva genética en las regiones de cloroplasto resulta en una alta y rápida divergencia genética entre las poblaciones en contraste con las regiones nucleares (Moree, 1995; McCauley, 1995; Hare, 2001).

Con los datos de ISSR se encontró un alto porcentaje de loci polimórficos (80.41%), una diversidad genética de Nei (h) de 0.251 y una diversidad de Shannon (I) de 0.383. Estos resultados son similares a los que se han encontrado en otras especies de rubiáceas como, *Psychotria hastisepala*, *Emmenopterys henryi* y *Morinda tomentosa* (Li y Jin, 2008; Silva et al., 2014; Arya et al., 2014). En cuanto a *Psychotria hastisepala*, la forma florar y el aislamiento en fragmentos de bosque son similares con *B. stormiae*. La forma de crecimiento epífita y sobre las rocas, la forma tubular de las flores, así como los patrones de aislamiento de *Morinda tomentosa* coinciden con los *B. stormiae*. Por otra parte, el análisis de diversidad genética para cada población con estos marcadores indica que Arocutín presenta los mayores niveles de variación, seguida por Zacapu, Nuevo San Juan y San Andrés Coru. Este patrón es similar si tomamos en cuenta la diversidad nucleotídica observada con el espaciador transcrito externo de cada población. Es de resaltar que estos resultados coinciden con el orden de aparición de los volcanes y la edad de los flujos de lava donde se encuentran los individuos colectados (Reyes-Guzmán, 2018; García-Quintana et al., 2016; Osorio-Ocampo, 2014; Bocco, 1998; Chevrel et al., 2016; Martínez y Ramírez, 1998). De esta manera, la población de Arocutín es

la más diversa y se encuentra en el flujo de lava más antiguo (8000 años), mientras que las poblaciones menos diversas se encuentran sobre los pedregales más recientes. Lo anterior es congruente con el argumento de que la variación genética ancestral es mayor que la que se encuentra en las poblaciones más recientes ya que estas últimas han tenido menos tiempo para acumular diferencias (Mastretta et al., 2015). Sin embargo, esto no aplica en la población de Manantlán, que presenta la menor variación genética y no se trata de la erupción más reciente (Mioceno-Pleistoceno), en cambio es una población muy aislada como consecuencia de la topografía del lugar y la distancia de las demás poblaciones, lo que puede estar limitando el flujo genético.

Los resultados del AMOVA con *rps16*, indican que se encuentra mayor diferenciación genética entre regiones que dentro de las poblaciones, con F_{st} alto y significativo. De manera similar con el ETS nuclear se presenta la mayor variación explicada entre las regiones ($F_{CT} = 0.48$), aunque sin ser significativa y con un porcentaje de variación explicada (47.93%) a penas ligeramente superior a la variación presente dentro de las poblaciones (45.66%). Estos patrones de mayor diferenciación dentro de las poblaciones observados con ETS coinciden con los resultados del AMOVA con los marcadores ISSR con valores significativos, seguidos de la variación entre regiones (17%).

Por otro lado, el G_{st} y N_{st} no son diferentes, por lo que no se presenta estructura filogeográfica con ETS ni con *rps16*. Estos resultados también son congruentes con las redes de haplotipos y con las barreras genéticas detectadas, que muestran una estructura filogeográfica muy simple sólo reflejando la separación entre las poblaciones de Michoacán y de Jalisco.

Flujo genético y estructura genética

Es conocido que el tipo de dispersión de las plantas determina los patrones en el flujo y la diferenciación genética. Los niveles históricos en el flujo de polen normalmente son mayores a los niveles de flujo de semillas y estos varían entre especies (Petit et al., 2005). En este estudio se encontraron resultados congruentes con ese modelo, ya que el flujo que presenta el ADN nuclear con los marcadores de ETS e ISSR ($N_m=0.56$ y $N_m=2.33$, respectivamente) es mayor al del ADN de cloroplasto. De los tres tipos de marcadores los ISSR presentan el mayor flujo, esto lo observamos en la distribución geográfica y la asignación de los genotipos a los grupos genéticos, ya que comparten más información genética las regiones de Michoacán y Jalisco.

Se ha propuesto que la distancia efectiva (no la distancia lineal) dada por la conectividad entre las montañas, así como la actividad volcánica, son los factores que han dado forma a los patrones genéticos de las poblaciones en la Faja Volcánica Transmexicana (Mastretta et al., 2015). Tomando en cuenta esto y los resultados de este estudio, se puede afirmar que la región de Manantlán-Colima presenta conectividad limitada con las poblaciones de *B. stormiae* de Michoacán como consecuencia de la separación por tierras más bajas que funcionan como barreras para la dispersión de esta especie. Lo anterior es consistente con la ausencia de haplotipos compartidos y con la alta diferenciación genética con *rps16* y ETS entre estas dos regiones. Por lo tanto, el transporte de semillas y polen de una región a otra parece ser deficiente.

Por otro lado, la menor distancia geográfica entre las poblaciones de *B. stormiae* en la Faja Volcánica Transmexicana en Michoacán favoreció la conectividad entre éstas, lo cual pudo haber permitido la colonización por semillas de manera escalonada (“stepping stone”) entre los diferentes volcanes de la región, así como una dispersión del polen más efectiva. Esto se puede apoyar por la ausencia de diferenciación de las 18 regiones de cloroplasto probadas inicialmente en este estudio y por la mínima diferenciación que presentó la red de haplotipos del intrón *rps16*, que indican escasa dispersión de semillas; mientras que el flujo genético mayor encontrado con ETS y los marcadores ISSR es consecuencia de la dispersión por polen.

El modelo de “Stepping Stone” también podría dar explicación a la poca relación entre la distancia genética y geográfica encontrada en la prueba de Mantel con ETS y *rps16* ya que hay conectividad entre las montañas de Michoacán.

En los estudios de filogeografía es más común por su facilidad utilizar regiones de cloroplasto ya que no presenta las dificultades que se tienen al usar del ADN nuclear, como la recombinación, la heterocigosidad y discriminación de los alelos (Hare, 2001; Zhang et al., 2003). La mejor manera de enfrentar estos problemas es usar varios tipos marcadores, un patrón coherente entre estos nos arroja resultados más confiables sobre la historia de las poblaciones (Zhang et al., 2003). En este estudio pudimos obtener patrones congruentes con los tres tipos de marcadores.

Expansión demográfica

La combinación de una diversidad haplotípica alta con una diversidad nucleotídica baja, en conjunto con la red de haplotipos con forma de estrella en la que hay un haplotipo notoriamente predominante, sugieren un crecimiento poblacional reciente de *Balmea stormiae* (Avice, 2000). Los valores globales negativos significativos de los estimadores D de Tajima y de Fs de Fu, además de la distribución unimodal con datos nucleares soportan esta deducción. Esto a su vez podría ser explicado por la actividad volcánica del Holoceno en la Faja Volcánica Transmexicana en Michoacán, indicando que las poblaciones son recientes y se encuentran en la etapa de expansión.

Por otra parte, en el análisis por poblaciones, el patrón encontrado en Zacapu indica una expansión poblacional, con valores grandes, negativos y significativos obtenidos con los estimadores de neutralidad. Se ha documentado que en este lugar ocurrió una de las erupciones más recientes, hace 1500 a 2500 años (Reyes-Guzmán, 2018). Por otro lado, las investigaciones arqueológicas revelan que cuatro grandes asentamientos humanos modificaron el pedregal hace aproximadamente 569 a 769 años atrás (Reyes-Guzmán, 2018). Zacapu era una de las ciudades prehispánicas más grandes con aproximadamente 20,000

habitantes, quienes vivían en miles de unidades domésticas y utilizaban 50 centros ceremoniales en un total de 1100 hectáreas sobre el pedregal (Michelet 1998; Migeon 1998; Forest 2014; Pereira et al. 2017; Smith, 2005). La construcción de las edificaciones seguramente originó la fragmentación de hábitat de la especie aquí estudiada, esto aunado al probable uso de su madera durante la existencia de este asentamiento humano pudo haber disminuido la variación genética de *Balmea*. Sin embargo, el abandono posterior del pedregal durante la conquista, pudo propiciar el crecimiento poblacional de *B. stormiae*; esto antes de ser habitadas nuevamente las zonas circundantes en tiempos actuales. Estas conclusiones concuerdan con las que se han obtenido en estudios sobre la dinámica de la vegetación durante el Cuaternario Tardío, las cuales indican que los cambios en la estructura de la vegetación en el Holoceno fueron provocados por factores locales, como los patrones de las actividades humanas durante los últimos 4000 años (Caballero-Rodríguez, 2018). No obstante, es necesario llevar a cabo futuros análisis para fechar estos eventos de expansión demográfica y corroborar estas hipótesis.

Diferenciación morfológica

Los resultados encontrados con el análisis de morfometría geométrica muestran que Jalisco está separada del resto de las poblaciones en la CV1, mientras que Zacapu en el CV2. La separación morfológica entre Jalisco y Michoacán estaría dada por la larga distancia y menor conectividad de las dos regiones, ya que se encontró que existe una relación moderada entre distancias geográficas y la diferenciación morfológica, a pesar de no ser significativa. Esta diferenciación morfológica coincide con la diferenciación genética entre regiones encontrada en el AMOVA, sin embargo, no se encontró una relación positiva entre la diferenciación genética y morfológica. Lo anterior podría deberse a la presencia de estructura genética y diferenciación solo entre Jalisco y Michoacán, pero no entre las poblaciones de Michoacán lo que se ve reflejado en la falta de estructura filogeográfica. Además de lo anteriormente mencionado, el tipo de hábitat (pedregales recientes en Michoacán y bosque de pino-encino con más suelo en Jalisco) y la forma de crecimiento de *Balmea stormiae* en ambas regiones (Hemiepífita en Jalisco vs rupícola en Michoacán) podría estar provocando una diferenciación adaptiva con una variación morfológica. Adicionalmente, la forma de crecimiento sobre los

árboles en Jalisco y la presencia de mayor vegetación le impide a la especie tener una mayor disponibilidad de luz a diferencia de las poblaciones de Michoacán, lo que es congruente con las diferencias significativas en el área foliar siendo Manantlán la población con hojas más grandes y Zacapu con las hojas más pequeñas. Esto se relaciona con los valores de la variación mensual en la evapotranspiración, que es menor en Jalisco y mayor en Michoacán. Además, Jalisco es la región con mayor precipitación en el trimestre más lluvioso en comparación con el resto de las poblaciones estudiadas.

En comparación con la diferenciación en la forma de las hojas de Jalisco, la diferenciación morfológica de los individuos de Zacapu está más relacionada con las características climáticas del pedregal como la menor precipitación anual, el trimestre más lluvioso, la mayor estacionalidad de la temperatura y la variación mensual en la evapotranspiración. En Zacapu pueden ser factores importantes la exposición a la luz debida al tipo de hábitat, el crecimiento de los individuos sobre las rocas en zonas abiertas con poca vegetación y la mayor incidencia de lumínica..

LITERATURA CITADA

- Arya, L., Narayanan, R. K., Verma, M., Singh, A. K., y Gupta, V. (2014). Genetic diversity and population structure analyses of *Morinda tomentosa* Heyne, with neutral and gene based markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 61(8), 1469-1479. doi: 0.1007/s10722-014-0168-4
- Atchley, W. R., Gaskins, C. T., y Anderson, D. (1976). Statistical properties of ratios. I. Empirical results. *Systematic Zoology*, 25(2), 137-148. doi: 10.2307/2412740
- Avise, J.C. (2000). *Phylogeography: the History and Formation of Species*, Harvard University Press
- Balkenius, A., Kelber, A., y Balkenius, C. (2002). Simulations of learning and behaviour in the hawkmoth *Deilephila elpenor*. En H. Bridget, D. Floreano, J. Hallam, G. M. Hayes, J.-A. Meyer. (Eds.), *From Animals to Animats 7: Proceedings of the Seventh International Conference on Simulation of Adaptive Behavior* (pp. 85-92). Massachusetts: Mit Press.
- Bandelt, H., Forster, P., y Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16(1):37-48. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036
- Barrett, S. C. H., y Kohn, J. R. (1991). Genetic and Evolutionary Consequences of Small Population Size in Plants: Implications for Conservation. En D. A. Falk y K. E. Holsinger. (Eds.). *Genetics and Conservation of Rare Plants* (pp. 3-30). doi: 10.2307/1940865
- Becerra, J. X. (2003). Evolution of Mexican *Bursera* (Burseraceae) inferred from ITS, ETS, and 5S nuclear ribosomal DNA sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, 26(2), 300-309. doi: 10.1016/S1055-7903(02)00256-7
- Benítez, H. A., y Püschel, T. A. (2014). Modelando la varianza de la forma: morfometría geométrica aplicaciones en biología evolutiva. *International Journal of Morphology*, 32(3), 998-1008. doi: 10.4067/S0717-95022014000300041
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., y Sayers, E. W. (2012) GenBank, *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D36-D42. doi: org/10.1093/nar/gks1195
- Bremer, B., y Eriksson, T. (2009). Time tree of Rubiaceae: phylogeny and dating the family, subfamilies, and tribes. *International Journal of Plant Sciences*, 170(6), 766-793. doi:10.1086/599077
- Bocco, V., Torres, A., Velázquez, A., y Siebe, C. (1998). Geomorfología y recursos naturales en comunidades rurales. *El caso de Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán. Geografía y Desarrollo*, 16, 71-84.

- Bookstein, F. L. (1997). *Morphometric tools for landmark data: geometry and biology*. Cambridge University Press.
- Burton, R.S. (1998). Intraspecific phylogeography across the Point Conception biogeographic boundary. *Evolution* 52, 734-745
- Caballero-Rodríguez, D., Correa-Metrio, A., Lozano-García, S., Sosa-Nájera, S., Ortega, B., Sanchez-Dzib, Y., Aguirre-Navarro, K., y Sandoval-Montaño, A. (2018). Late-Quaternary spatiotemporal dynamics of vegetation in Central Mexico. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 250, 44-52. doi: 10.1016/j.revpalbo.2017.12.004
- Cantín, M., Salgado, G., Inzunza, O., Inostroza, V., Errázuriz, M. J., Pavez, C., y Fuentes, R. (2013). Evaluación morfométrica directa de la asimetría condilar sobre mandíbulas humanas. *International journal of Morphology*, 31(4), 1401-1406. doi: 10.4067/S0717-95022013000400041
- Cao, E. P., Constantino-Santos, D. M., Ramos, L. A. P., Santos, B. S., Quilang, J. P., y Mojica, R. M. (2014). Molecular and morphological differentiation among *Coffea* (Rubiaceae) varieties grown in the farms of Cavite Province, Philippines. *Philippine Science Letters*, 7(2), 387-397.
- Carabias L. J., Provencio, E., de la Maza Elvira, J., y Graf, S. (2000). *Programa de manejo de la Reserva de la Biosfera Sierra de Manantlán*. Ciudad de México: Instituto Nacional de Ecología.
- Cavender-Bares, J., Gonzalez-Rodriguez, A., Pahlich, A., Koehler, K., y Deacon, N. (2011). Phylogeography and climatic niche evolution in live oaks (*Quercus* series *Virentes*) from the tropics to the temperate zone. *Journal of Biogeography*, 38(5), 962-981. doi: 10.1111/j.1365-2699.2010.02451.x
- Chevrel, M. O., Guilbaud, M. N., y Siebe, C. (2016). The ~ AD 1250 effusive eruption of El Metate shield volcano (Michoacán, Mexico): magma source, crustal storage, eruptive dynamics, and lava rheology. *Bulletin of Volcanology*, 78(4), 32. doi: 10.1007/s00445-016-1020-9
- Congdon, B. C., Piatt, J. F., Martin, K., y Friesen, V. L. (2000). Mechanisms of population differentiation in marbled murrelets: historical versus contemporary processes. *Evolution*, 54(3), 974-986.
- D'Hondt, C., Schols, P., Huysmans, S., y Smets, E. (2004). Systematic relevance of pollen and orbicule characters in the tribe Hillieae (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 146(3), 303-321. doi: 10.1111/j.1095-8339.2004.00336.x
- Dogan, B., Duran, A., y Hakki, E. E. (2007). Phylogenetic analysis of *Jurinea* (Asteraceae) species from Turkey based on ISSR amplification. *Annales Botanici Fennici* 44(5): 353-358.
- Duda, T. F., y Palumbi, S. R. (1999). Population structure of the black tiger prawn, *Penaeus monodon*, among western Indian Ocean and western Pacific populations. *Mar. Biol.* 134,705-710

- Earl, D. A., y vonHoldt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359-361. doi: 10.1007/s12686-011-9548-7
- Eguiarte, F. L. E. (1986). Una guía para principiantes a la Genética de Poblaciones. *Ciencias 001* 30-38.
- Ennos, R. A., Sinclair, W. T., Hu, X-S., y Langdon, A. (1999). Using organelle markers to elucidate the history, ecology and evolution of plant populations. En P. M. Hollingsworth, R. M. Bateman, y R. J. Gornall (Eds.), *Molecular Systematics and Plant Evolution* (pp. 1-19). London: Taylor & Francis.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14(8): 2611-2620. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x
- Excoffier, L., y Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564-567. doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x
- Falush, D., Stephens, M. y Pritchard, J. K. (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Mol. Ecol. Notes* 7(4): 574-578. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x
- Faria, R. R., Ferrero, V., Navarro, L., y Araujo, A. C. (2012). Flexible mating system in distylous populations of *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae) in Brazilian Cerrado. *Plant Systematics and Evolution*, 298(3), 619-627. doi: 10.1007/s00606-011-0571-7
- Florentin, M. N., Cabaña Fader, A., y Gonzalez, A. M. (2016). Morpho-anatomical and morphometric studies of the floral structures of the distylous *Oldenlandia salzmannii* (Rubiaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 30(4), 585-601. doi: 10.1590/0102-33062016abb0247
- Forest, M. (2014). Approches spatio-archéologiques de la structure sociale des sites urbains du Malpaís de Zacapu. PhD dissertation, Université de Paris, Panthéon/Sorbonne, Paris
- Fosberg, F. R. (1974). Studies in american Rubiaceae 2. Ayuque, *Balmea stormae*, an endangered mexican species. *SIDA, Contributions to Botany*, 5(4), 268-270. doi: 10.2307/1223953
- Frankham, R., Ballou, J. D., y Briscoe, D. A. (2002). *Introduction to Conservation genetics*. New York, USA: Cambridge University Press.
- Fu, Y. X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2):915-925.
- Gaafar, A. R. Z., Al-Qurainy, F., y Khan, S. (2014). Assessment of genetic diversity in the endangered populations of *Breonadia salicina* (Rubiaceae) growing in The Kingdom of Saudi

- Arabia using inter-simple sequence repeat markers. *BMC genetics*, 15(1), 109. doi: 10.1186/s12863-014-0109-4
- García-Quintana, A., Goguitchaichvili, A., Morales, J., Cervantes Solano, M., Osorio-Ocampo, S., y Luis Macías Jaime Urrutia-Fucugauchi, J. (2016). Datación magnética de rocas volcánicas formadas durante el Holoceno: caso de flujos de lava alrededor del Lago de Pátzcuaro (campo volcánico Michoacán-Guanajuato). *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas*, 33(2), 209-220. Retrieved from [http://satori.geociencias.unam.mx/33-2/\(06\)GarciaQuintana.pdf](http://satori.geociencias.unam.mx/33-2/(06)GarciaQuintana.pdf)
- Gaston, K. J. (2010). Biodiversity. En N. S. Sodhi y P. R. Ehrlich (Eds.). *Conservation Biology for all*. doi :10.1093/acprof:oso/9780199554232.001.0001
- González-Astorga, J., y Castillo-Campos, G. (2004). Genetic variability of the narrow endemic tree *Antirhea aromatica* Castillo-Campos y Lorence, (Rubiaceae, Guettardeae) in a tropical forest of Mexico. *Annals of Botany*, 93(5), 521-528. doi: 10.1093/aob/mch070
- González, A. y Aguirre, X. (2007). Inter simple sequence repeats (ISSRs). En L. E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre (Comp.), *Ecología Molecular* (pp. 567-571). México: Instituto Nacional de Ecología.
- Hakki, E. E., Dogan, B., Duran, A., Martin, E., y Dinc, M. (2010). Phylogenetic relationship analysis of *Genista* L. (Fabaceae) species from Turkey as revealed by intersimple sequence repeat amplification. *African Journal of Biotechnology*, 9(18), 2627-2632. doi: 10.5897/AJB10.031
- Hall TA. (1999). BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acids Symp Ser* 41:95-8
- Hare, M. P. (2001). Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends in Ecology & Evolution*, 16(12), 700-706. doi: 10.1016/S0169-5347(01)02326-6
- Harris, S.A. (1999). RAPDs in systematics: A useful methodology? En: P.M. Hollingsworth, R.M. Bateman, y R.J. Gornall. (eds.). *Molecular systematics and plant evolution*: (p. 211-228). London, United Kingdom: Taylor and Francis.
- Hernández-Ramírez, A. M., y Aké-Castillo, J. A. (2014). A Geometric morphometrics study of stigma-anther polymorphism in the tropical Distylous *Palicourea padifolia* (Rubiaceae). *American Journal of Plant Sciences*, 5(10), 1449-1458. doi: 10.4236/ajps.2014.510160
- Horne, J. B., van Herwerden, L., Choat, J. H., y Robertson, D. R. (2008). High population connectivity across the Indo-Pacific: congruent lack of phylogeographic structure in three reef fish congeners. *Molecular phylogenetics and evolution*, 49(2), 629-638. doi: 10.1016/j.ympev.2008.08.023
- Hunter Jr., M. J., y Gibs, J. P. (2007). *Fundamentals of conservation biology*. Blackwell Publishing.
- Jaramillo, N., (2011). Morfometría geométrica: principios teóricos y métodos de empleo. En: O. Triana, A.M. Mejía y A.M. Gómez (ed.), *Fronteras de investigación en enfermedades*

- infecciosas. Modelo enfermedad de Chagas* (pp. 69-87). Medellín, Colombia: Universidad de Antioquia.
- Jia, J., Zeng, L., y Gong, X. (2016). High Genetic Diversity and Population Differentiation in the Critically Endangered Plant Species *Trilliaedoxa gracilis* (Rubiaceae). *Plant Molecular Biology Reporter*, 34(1), 327-338. doi: 10.1007/s11105-015-0924-4
- Kaessmann, H., Wiebe, V., y Pääbo, S. (1999). Extensive nuclear DNA sequence diversity among chimpanzees. *Science*, 286(5442), 1159-1162.
- Kimura, M., y Crow, J. F. (1964) The Number of Alleles That Can Be Maintained in a Finite Population. *Genetics*, 49, 725-738.
- Klingenberg., C. P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources* 11: 353-357
- Koufopanou, V., Burt, A., y Taylor, J. W. (1997). Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(10), 5478-5482.
- Lewontin R.C. (1972). Testing the theory of natural selection. *Nature* 236: 181-182. doi: 10.1038/236181a0
- Librado, P., y Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452. doi:10.1093/bioinformatics/btp187
- Li, J. M., y Jin, Z. X. (2008). Genetic structure of endangered *Emmenopterys henryi* Oliv. based on ISSR polymorphism and implications for its conservation. *Genetica*, 133(3), 227-234. doi: 10.1007/s10709-007-9204-z
- López-Galán, A., y Alejo-Plata, M. C. (2015). Sexual Differentiation of *Octopus hubbsorum* (Mollusca: Cephalopoda) Using Body Dimensions and the Shape and Size of the Stylets: A Traditional and Geometric Morphometric Analysis. *American Malacological Bulletin*, 33(2), 177-184. doi: 10.4003/006.033.0213
- Manns, U., y Bremer, B. (2010). Towards a better understanding of intertribal relationships and stable tribal delimitations within Cinchonoideae s.s. (Rubiaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56(1), 21-39. doi: 10.1016/j.ympev.2010.04.002
- Manns, U., Wikström, N., Taylor, C. M., y Bremer, B. (2012). Historical Biogeography of the Predominantly Neotropical Subfamily Cinchonoideae (Rubiaceae): Into or Out of America? *International Journal of Plant Sciences*, 173(3), 261-286. doi: 10.1086/663971
- Manni, F., Guérard, E., y Heyer, E. (2004). Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by “Monmonier’s algorithm”. *Human Biology*, 76(2): 173-190.

- Mantel, M. (1967). The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach. *Cancer research*, 27(2), 209-220.
- Martínez, M. (1942). A New Genus of Rubiaceae from Mexico. *Bulletin Torrey Botanical Society*, 69(6), 438-441. doi: 10.2307/2481425
- Martínez R. L. M., y Ramírez R. J. M. (1998). Unidades fisiográficas de la Reserva de la Biósfera Sierra de Manantlán bajo un sistema de información geográfica. *Tierra Latinoamericana*, 16(3), 195-203.
- Martínez Salas, E., Oldfield, S. y Samain, M.-S. (2017). *Balmea stormiae*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2017*: e.T61532862A61532866. doi: 10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T61532862A61532866.en
- Mastretta-Yanes, A., Moreno-Letelier, A., Piñero, D., Jorgensen, T. H., y 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), 1586-160 doi: 10.1111/jbi.12546
- McCauley, D. E. (1995). The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. *Trends in Ecology and Evolution*, 10(5), 198-202. doi: 10.1016/S0169-5347(00)89052-7
- Medina, G. C., Guevara-Féfer, F., Martínez, R. M. A., Silva-Sáenz, P., Chávez-Carbajal, M. A., y García, R. I. (2000). Estudio florístico en el área de la comunidad indígena de Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México. *Acta Botánica Mexicana*, 52, 5-41. doi: 10.21829/abm52.2000.853
- Michelet, D. (1998). Topografía y prospección sistemática de los grandes asentamientos del Malpaís de Zacapu: claves para un acercamiento a las realidades sociopolíticas. En: V. Darras. (ed.). *Génesis, culturas y espacios en Michoacán* (pp. 47-59). México: CEMCA. doi: 10.4000/books.cemca.3396
- Migeon, G. (1998). El poblamiento del Malpaís de Zacapu y de sus alrededores del Clásico al Posclásico. En: V. Darras. (ed) *Génesis, culturas y espacios en Michoacán* (pp 36-45). México: CEMCA. doi: 10.4000/books.cemca.3395
- Moore, W.S. (1995). Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution* 49, 718-726
- Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106(949), 283-292.
- Nei, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70(12), 3321-3323. doi: 10.1073/pnas.70.12.3321

- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583-590.
- Osorio-Ocampo, S. (2014). Evolución espacio-temporal del vulcanismo alrededor del lago de Pátzcuaro, Michoacán. (Tesis de maestría) Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, México.
- Oxelman, B., Lidén, M., y Berglund, D. (1997). Chloroplast *rps16* intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). *Plant systematics and Evolution*, 206(1-4), 393-410.
- Peakall, R., and Smouse, P.E. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6(1), 288-295. doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x
- Pereira, G., Forest, M., Jadot, E., et al (2017) Ephemeral cities? The longevity of the Postclassic Tarascan urban sites of Zacapu Malpaís and its consequences on the migration process. En: M-C. Arnaud, C. Beekman, y G. Pereira. (eds.) *Ancient Mesoamerican Cities: Populations on the Move*. University Press of Colorado, Boulder
- Piñero, D., Barahona, A., Eguiarte, L., Rocha, A., y Salas, R. (2008). La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. En: *Capital natural de México*, vol.I: *Conocimiento actual de la biodiversidad*. (pp. 415-435). México: CONABIO.
- Pons, O., y Petit, R. J. (1996). Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics*, 144(3), 1237-1245.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Y Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- Reddy, M. P., Sarla, N., y Siddiq, E. A. (2002). Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica*, 128(1), 9-17. doi: 10.1023/A:1020691618797
- Reyes García, C. (1998). Tzacapu las piedras universales. Los procesos de dominación y desertización, Zamora, Mich., México: Colegio de Michoacán. Recuperado de https://books.google.com.mx/books?id=Fvzo1PwAYZgC&dq=reyes+garcia+1998+zacapu&source=gbs_navlinks_s
- Reyes-Guzmán, N., Siebe, C., Chevrel, M. O., Guilbaud, M. N., Salinas, S., y Layer, P. (2018). Geology and radiometric dating of Quaternary monogenetic volcanism in the western Zacapu lacustrine basin (Michoacán, México): implications for archeology and future hazard evaluations. *Bulletin of Volcanology*, 80(2), 18. doi: 10.1007/s00445-018-1193-5
- Rieseberg, L.H. (1996). Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. *Mole. Ecol.* 5:99-105.

- Rohlf, F. J. (2005). Thin-plate splines (TPS) software family: TPSDIG, TPSRELW, TPSREGR, TPSUTIL. *SUNY, Stony Brook*.
- Rohlf, F. J., y Marcus, L. F. (1993). A revolution morphometrics. *Trends in ecology & evolution*, 8(4), 129-132. doi: 10.1016/0169-5347(93)90024-J
- Schaal, B. A., Hayworth, D. A., Olsen, K. M., Rauscher, J. T., y Smith, W. A. (1998). Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology*, 7(4), 465-474. doi: 10.1046/j.1365-294x.1998.00318.x
- Schaal, B., Leverich, W., y Rogstad, S. (1991). Comparison of methods for assessing genetic variation in plant conservation biology. En D.A. Falk y K. E. Holsinger (Eds.), *Genetics and Conservation of Rare Plants* (pp. 123-134). New York: Oxford University Press.
- Sheets, H.D. (2004). IMP Software Series. Buffalo, Canisius College, New York. <http://www.canisius.edu/~sheets/morphsoft.html>
- Silva, C. A., Vieira, M. F., Carvalho-Okano, R. M. D., y Oliveira, L. O. D. (2014). Reproductive success and genetic diversity of *Psychotria hastisepala* (Rubiaceae), in fragmented Atlantic forest, Southeastern Brazil. *Revista de Biología Tropical*, 62(1), 369-380.
- Smith, M. E. (2005). City Size in Late Postclassic Mesoamerica. *Journal of Urban History*, 31(4), 403-434. doi: 10.1177/0096144204274396
- Stephens, M., Smith, N. J., y Donnelly, P. (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *The American Journal of Human Genetics*, 68(4), 978-989. doi: 10.1086/319501
- Tajima, F. (1989b) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3):585-595.
- Taylor, C. M. (1994). Revision of *Hillia* (Rubiaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 571-609.
- Tornese, E. B., y Mazzoglio y Nabar, M. J. (2013). Morfometría del Cuerpo Calloso y de los Cuerpos Mamilares en el Alcoholismo por Resonancia Magnética. *International Journal of Morphology*, 31(4), 1233-1242. doi: 10.4067/S0717-95022013000400015
- Wikström, N., Kainulainen, K., Razafimandimbison, S. G., Smedmark, J. E. E., y Bremer, B. (2015). A revised time tree of the asterids: Establishing a temporal framework for evolutionary studies of the coffee family (Rubiaceae). *PLoS ONE*, 10(5), 1-26. doi: 10.1371/journal.pone.0126690
- Willmer, P. (2011). Pollination by Butterflies and Moths. En P. Willmer (Ed.), *Pollination and Floral Ecology* (pp. 322-336). Princeton University Press.

- Woerner, A.E., Cox, M.P. y Hammer, M.F. (2007). Recombination-filtered genomic datasets by information maximization. *Bioinformatics*, 23(14), 1851-1853. doi: 10.1093/bioinformatics/btm253
- Wolfe, A. D. (2005). ISSR Techniques for Evolutionary Biology. *Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data*, 395, 134-144. doi: 10.1016/s0076-6879(05)95009-x
- Wolfe, K. H., Li, W. H., y Sharp, P. M. (1987). Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(24), 9054-9058.
- Wolff, K., y Morgan-Richards, M. (1999). The use of RAPD data in the analysis of population genetic structure: case studies of *Alkanna* (Boraginaceae) and *Plantago* (Plantaginaceae). En: P. M. Hollingsworth, R. M. Bateman, and R. J. Gornall. (eds.). *Molecular systematics and plant evolution* (p. 51-73). London, United Kingdom: Taylor and Francis.
- Yeh, F.C., Yang, R.C., y Boyle, T. (1999). POPGENE Version 1.32: Microsoft Window-Based Freeware for Population Genetics Analysis. University of Alberta, Edmonton.
- Zhang, Y. H., Wang, I. J., Comes, H. P., Peng, H., y Qiu, Y. X. (2016). Contributions of historical and contemporary geographic and environmental factors to phylogeographic structure in a Tertiary relict species, *Emmenopterys henryi* (Rubiaceae). *Scientific Reports*, 6, 1-14. doi: 10.1038/srep24041
- Zhang, D. X., y Hewitt, G. M. (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, 12(3), 563-584. doi: 10.1046/j.1365-294X.2003.01773.x
- Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., y Sheets, H. D. (2012). *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. Academic Press.