

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

E.A.P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Diversidad genética y relaciones filogenéticas de
Orthopterygium Huaucui (A. Gray) Hemsley, una
Anacardiaceae endémica de la vertiente occidental de la
Cordillera de los Andes**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo con mención en Botánica

AUTOR

Víctor Alberto Jiménez Vásquez

Lima – Perú

2014



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DIVERSIDAD GENÉTICA Y RELACIONES FILOGENÉTICAS DE
*ORTHOPTERYGIUM HUAUCUI***

**(A. GRAY) HEMSLEY, UNA ANACARDIACEAE ENDÉMICA DE LA
VERTIENTE OCCIDENTAL DE LA CORDILLERA DE LOS ANDES**

Tesis para optar al título profesional de Biólogo con mención en Botánica

Bach. VICTOR ALBERTO JIMÉNEZ VÁSQUEZ

Asesor: Dra. RINA LASTENIA RAMIREZ MESÍAS

Lima – Perú

2014

*“... La batalla de la vida no siempre la gana
el hombre más fuerte o el más ligero,
porque tarde o temprano el hombre que gana
es aquél que cree poder hacerlo.”*

Christian Barnard

(Médico sudafricano, realizó el
primer trasplante de corazón)

Agradecimientos

Para María Julia y Alberto, mis principales guías y amigos en esta travesía de más de 25 años, pasando por legos desgastados, lápices rotos, microscopios de juguete y análisis de ADN. Gracias por ayudarme a ver el camino. Para mis hermanos Verónica y Jesús, por conformar este inquebrantable equipo, muchas gracias. Seguiremos creciendo juntos.

A mi asesora, Dra. Rina Ramírez, mi guía académica imprescindible en el desarrollo de esta investigación, gracias por sus lecciones, críticas y paciencia durante estos últimos cuatro años. A la Dra. Blanca León, gestora de la maravillosa idea de estudiar a las plantas endémicas del Perú y conocer los orígenes de la biodiversidad vegetal peruana. Al Dr. Kenneth Young, a ambos muchas gracias por el apoyo brindado, muchas gracias por su confianza.

A mi compañero y colega David Figueroa, por su amabilidad, dedicación durante las colectas de campo y sus buenas ideas. A mis compañeros de laboratorio Sally Molero, Victor Borda, José Olivera y David Morales, testigos de mis horas de trabajo.

A mis asesores durante el IX Curso-Taller Latinoamericano de Genética para la Conservación, Dra. Carina Arguelles, Dr. Daniel Ruzzante y Dr. Marco Méndez los cuales me ayudaron a enfocar no solo esta investigación sino mis planes académicos, muchas gracias.

A la Dra. Mónica Arakaki, profesora y amiga, muchas gracias por su incondicional ayuda desde su estancia en los Estados Unidos hasta su retorno a Perú, fue un honor ser su alumno. Al Dr. Jean-Christophe Pintaud, presente guía en mis estudios de posgrado, crítico de los avances de este trabajo, muchas gracias por su apoyo.

A Cinthya Flores, testigo del progreso de esta investigación, muchas gracias por escuchar mis conjeturas durante horas de discusión, gracias por tu comprensión y paciencia durante todo ese tiempo.

A los revisores de este trabajo, mis profesores Mg. Asunción Cano, Dr. Manuel Marin y Mg. Giovanna Sotil, mis más sinceros agradecimientos por la ayuda brindada, todas sus conjeturas me ayudaron a mejorar este manuscrito. De todos guardo y guardaré gratos recuerdos del tiempo de ejecución de esta investigación, y más aún de mis años de estudiante en esta maravillosa facultad, la facultad de Ciencias Biológicas.

A mi Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con la que estoy en deuda eterna. Siempre me demuestra que es la Decana del estudiante creativo, del líder, del que siempre quiere lograr más. Muchas gracias por el caluroso abrazo académico y ser testigo y guía de mis primeros años de vida adulta, de ciudadano. Este trabajo es también para usted.

Índice General

Resumen.....	viii
Abstract.....	ix
1. Introducción	1
2. Marco Teórico	7
2.1. Características, distribución y sistemática de la familia Anacardiaceae.....	8
2.2. Estudios filogenéticos dentro de Anacardiaceae.....	9
2.3. Estudios intraespecíficos y diversidad genética en Anacardiaceae.....	9
2.4. Diversidad genética de especies endémicas.....	9
2.5. Los marcadores ITS, TrnL y Rps16.....	10
3. Hipótesis	12
3.1. Hipótesis de trabajo.....	13
3.2. Hipótesis nula.....	13
4. Objetivos	14
4.1. Objetivo general.....	15
4.2. Objetivos específicos.....	15
5. Materiales y métodos	16
5.1. Zonas de muestreo.....	17
5.2. Colecta y preparación de muestras para extracción de ADN.....	19
5.3. Extracción de ADN.....	27
5.4. Amplificación por PCR.....	28
5.5. Visualización de amplificados.....	28
5.6. Purificación y secuenciamiento de amplificados.....	29
5.7. Edición y alineamiento múltiple de secuencias.....	29
5.8. Caracterización de las secuencias.....	29
5.9. Posición y origen de <i>Orthopterygium huacui</i> dentro de la familia Anacardiaceae.....	30
6. Resultados	31

6.1.	Diversidad Genética.....	32
6.2.	Distancias genéticas entre <i>Orthopterygium</i> y otras Anacardiaceae.....	32
6.3.	Distancia genética de Julianiaceae dentro de Anacardiaceae.....	40
6.4.	Relaciones filogenéticas de <i>Orthopterygium huaucui</i> en Anacardiaceae.....	44
6.4.1.	Análisis bayesiano con el marcador plastidial TrnL.....	46
6.4.2.	Análisis bayesiano con el marcador plastidial Rps16.....	48
6.4.3.	Análisis bayesiano con el marcador nuclear ITS.....	50
6.4.4.	Análisis bayesiano con los datos plastidiales concatenados.....	52
6.4.5.	Análisis bayesiano con los datos totales concatenados.....	54
6.4.6.	Análisis de Máxima Parsimonia con los datos totales concatenados.....	56
6.4.7.	Análisis de Máxima Verosimilitud con los datos totales concatenados.....	58
6.5.	Origen de <i>Orthopterygium huaucui</i> en la familia Anacardiaceae.....	58
7.	<u>Discusión</u>	65
7.1.	Ausencia de diversidad genética con los marcadores empleados en <i>Orthopterygium huaucui</i>	66
7.1.1.	Contaminación de muestras.....	66
7.1.2.	Característica inherente a poblaciones con bajo recambio generacional y baja tasa mutacional.....	67
7.1.3.	<i>Orthopterygium huaucui</i> es una especie reciente.....	67
7.1.4.	Cuello de botella genético en <i>Orthopterygium huaucui</i>	68
7.1.5.	Reproducción clonal.....	69
7.2.	Distancias genéticas de <i>Orthopterygium huaucui</i> y Julianiaceae dentro de la familia Anacardiaceae.....	69
7.2.1.	Inclusión de pocos individuos de cada género.....	71
7.2.2.	Julaniaceae es un linaje con especies extintas.....	71

7.3.	Posición evolutiva de <i>Orthopterygium</i> y Julianiaceae dentro de Anacardiaceae	71
7.4.	Tiempo de divergencia entre <i>Amphipterygium</i> y <i>Orthopterygium</i>	72
7.5.	Relevancia del estudio para la Conservación de <i>Orthopterygium huacui</i> y la protección de la Vertiente Occidental de los Andes peruanos.....	74
8.	<u>Conclusiones</u>	<u>76</u>
9.	<u>Recomendaciones</u>	<u>78</u>
10.	<u>Referencias Bibliográficas</u>	<u>80</u>
11.	<u>Anexo</u>	<u>92</u>

Índices de figuras y tablas

Figuras

- Figura 1.** Distribución de *Orthopterygium huaucui*. La Vertiente occidental de la Cordillera de los Andes se resalta ente 800 y 3500 msnm. Los puntos de muestreo para este estudio corresponden a las localidades de Canta, Huarochirí, Castrovirreyna y Nazca.....18
- Figura 2.** Vertiente occidental a 16 km de la frontera entre Pisco (Ica) y Castrovirreyna (Huancavelica) a 1766 msnm. Se distinguen cactus columnares. Los arbustos son *Orthopterygium huaucui* (señalado con flechas negras) y *Cnidoscolus basiacanthus* (señalado con flechas naranjas). Foto: Victor Jiménez.....23
- Figura 3.** Individuo en estado vegetativo. Vertiente occidental 16 km de la frontera entre Pisco (Ica) y Castrovirreyna (Huancavelica), a 1693 msnm. Foto: Victor Jiménez.....23
- Figura 4.** Población de *Orthopterygium huaucui* en Cerro Blanco, gran duna de arena a 3 Km de la ciudad de Nazca, a 1380 msnm. Foto: Victor Jiménez.....24
- Figura 5.** Individuo fenemino con abundantes inflorescencias en Cerro Blanco, Nazca, a 1280 msnm. Foto: Victor Jiménez.....24
- Figura 6.** Inflorescencia masculina de *Orthopterygium huaucui*.Castrovirreya (Huancavelica). Foto: Victor Jiménez.....25
- Figura 7.** Inflorescencia femenina *Orthopterygium huaucui*. Castrovirreya (Huancavelica). Foto: Victor Jiménez.....25
- Figura 8.** Rama terminal con hojas tiernas en estado óptimo para la extracción de ADN. Nazca (Ica). Foto: Victor Jiménez.....26
- Figura 9.** Asociación de *Orthopterygium huaucui* con otros arbustos como *Cnidoscolus basiacanthus* y cactáceas columnares como *Haageocereus sp.* Chosica (Lima). Foto: Victor Jiménez.....26
- Figura 10.** Hojas tiernas de *O. huaucui* desarrolladas luego de incluir en agua la rama terminal por dos semanas, procedente de Nazca (Ica). Foto: Victor Jiménez.....27
- Figura 11.** Árbol bayesiano obtenido con el marcador TrnL (consenso al 50%), los números en cada nodo corresponden a la probabilidad posterior. Se emplearon 10 millones de generaciones con muestreos en intervalos de 100 generaciones y un *burn-in* del 25% inicial de árboles generados. La escala representa el número de cambios.....45

Figura 12. Árbol bayesiano obtenido con el marcador Rps16, los números en cada nodo corresponden a la probabilidad posterior. Se emplearon 10 millones de generaciones con muestreos en intervalos de 100 generaciones y un *burn-in* del 25% inicial de árboles generados. La escala representa el número de cambios.....47

Figura 13. Árbol bayesiano obtenido con el marcador ITS, los números en cada nodo corresponden a la probabilidad posterior. Se emplearon 10 millones de generaciones con muestreos en intervalos de 100 generaciones y un *burn-in* del 25% inicial de árboles generados. La escala representa el número de cambios.....49

Figura 14. Árbol bayesiano obtenido con la concatenación de las secuencias plastidiales TrnL y Rps16, los números en cada nodo corresponden a la probabilidad posterior. Se emplearon 20 millones de generaciones con muestreos en intervalos de 100 generaciones y un *burn-in* del 25% inicial de árboles generados. La escala representa el número de cambios.....51

Figura 15. Árbol bayesiano obtenido con la concatenación de los datos plastidiales (TrnL y Rps16) y nuclear (ITS), los números en cada nodo corresponden a la probabilidad posterior. Se emplearon 20 millones de generaciones con muestreos en intervalos de 100 generaciones y un *burn-in* del 25% inicial de árboles generados. La escala representa el número de cambios.....53

Figura 16. Árbol de máxima parsimonia obtenido con la concatenación de los datos plastidiales (TrnL y Rps16) y nuclear (ITS), los números en cada nodo corresponden al soporte *bootstrap* con 1000 repeticiones. Longitud del árbol = 1795, Índice de consistencia (IC) = 0,4602, Índice de homoplasia (IH) = 0,5398, índice de retención (IR) = 0,6403. La escala corresponde al número de pasos.....55

Figura 17. Árbol de máxima verosimilitud obtenido con la concatenación de los datos plastidiales (TrnL y Rps16) y nuclear (ITS), los números en cada nodo corresponden al soporte *bootstrap* con 1000 repeticiones. El valor de verosimilitud del presente árbol es de $-\ln = 14454,5143$. Los parámetros del modelo hallado (GRT + I + G) se especifican a continuación: proporción de bases A=0,3257 C=0,2165 G=0,2000 T=0,2578, números de sitios invariables = 0,3960, parámetro alfa de la distribución gamma= 0,4790, las tasas de cambio = A <-> C 0,5599, A <-> G 1,0755, A <-> T 0,3144, C <-> G 1,0773, C <-> T 2,2834, G <-> T 1,000. La escala corresponde a la distancia calculada.....57

Figura 18. Filocronología bayesiana obtenida con la concatenación de los datos plastidiales (TrnL y Rps16) los números en cada nodo corresponden a las edades estimadas en millones de años y las barras, al 95% de la densidad de probabilidad más alta; las flechas diagonales negras indican los puntos de calibración.....59

Figura 19. Filocronología bayesiana obtenida con la concatenación de los datos plastidiales (TrnL y Rps16) y nuclear (ITS). Los números en cada nodo corresponden a las edades estimadas en millones de años y las barras, al 95% de la densidad de probabilidad más alta; las flechas diagonales negras indican los puntos de calibración.....60

Figura 20. Fragmento de la Filocronología bayesiana obtenida con la concatenación de los datos plastidiales (TrnL y Rps16) correspondiente al clado principalmente sudamericano. La región resaltada en naranja corresponde a Julianiaceae. Los números en cada nodo corresponden a las edades estimadas en millones de años y las barras, al 95% de la densidad de probabilidad más alta. La estrella indica el punto de calibración.....61

Figura 21. Fragmento de la Filocronología bayesiana obtenida con la concatenación de los datos plastidiales (TrnL y Rps16) y nuclear (ITS) correspondiente al clado principalmente sudamericano. La región resaltada en naranja corresponde a Julianiaceae. Los números en cada nodo corresponden a las edades estimadas en millones de años y las barras, al 95% de la densidad de probabilidad más alta. La estrella indica el punto de calibración.....61

Tablas

Tabla 1. Localidades de muestreo de <i>Orthopterygium huaucui</i> para este estudio.....	17
Tabla 2. Números de accesión de los especímenes de <i>Orthopterygium huaucui</i> empleados en este estudio. P, dato pendiente.....	20
Tabla 3. Números de accesión de los especímenes de Anacardiaceae empleados en este estudio. LPB, Herbario Nacional de Bolivia. TEX LL, Herbario de la Universidad de Texas en Austin. ND, dato no disponible.....	22
Tabla 4. Distancias genéticas calculadas con el marcador TrnL entre <i>O. huaucui</i> y otras especies de Anacardiaceae. Modelo de Kimura 2 parámetros. Los asteriscos corresponden a muestras obtenidas en este estudio.....	33
Tabla 5. Tabla 5. Distancias genéticas calculadas con el marcador Rps16 entre <i>O. huaucui</i> y otras especies de Anacardiaceae. Modelo de Kimura 2 parámetros. Los asteriscos corresponden a muestras obtenidas en este estudio.....	35
Tabla 6. Distancias genéticas calculadas con el marcador ITS entre <i>O. huaucui</i> y otras especies de Anacardiaceae. Modelo de Kimura 2 parámetros. Los asteriscos corresponden a muestras obtenidas en este estudio.....	37
Tabla 7. Distancias genéticas calculadas con los datos concatenados de los marcadores TrnL y Rps16 entre <i>O. huaucui</i> y otras especies de Anacardiaceae. Modelo de Kimura 2 parámetros. Los asteriscos corresponden a muestras obtenidas en este estudio.....	39
Tabla 8. Distancias genéticas dentro de géneros/clados de Anacardiaceae halladas con el marcador TrnL.....	41
Tabla 9. Distancias genéticas dentro de géneros/clados de Anacardiaceae, halladas con el marcador Rps16.....	42
Tabla 10. Distancias genéticas dentro de géneros/clados de Anacardiaceae halladas con datos plastidiales concatenados TrnL + Rps16.....	43
Tabla 11. Edades calculadas por el análisis bayesiano en BEAST para los datos plastidiales (TrnL + Rps16).....	62
Tabla 12. Edades calculadas por el análisis bayesiano en BEAST para los datos concatenados (TrnL + Rps16 + ITS).....	63

Resumen

La vertiente occidental de los Andes peruanos es un ecosistema árido y rico en flora endémica, actualmente amenazada por la industria y expansión urbana. Se caracteriza por una flora de cactáceas y arbustos caducifolios, entre estos últimos se encuentra *Orthopterygium huaucui* (A. Gray) Hemsley, una Anacardiaceae endémica de género monotípico, que habita la vertiente occidental en forma de matorrales dispersos en laderas rocosas a lo largo de 500 km de la costa central y cuyas especies más próximas pertenecen al género *Amphipterygium* (presente en México y Centroamérica) con la cual existe una disyunción de más de 3500 km. Con la finalidad de determinar 1) La estructura poblacional de *O. huaucui*, 2) su posición filogenética en la tribu Rhoëae de la familia Anacardiaceae y 3) el tiempo de origen de *O. huaucui* en la familia, se realizó una filocronología bayesiana de la familia calibrada con cinco registros fósiles y se evaluó la diversidad genética. Para ambos objetivos se emplearon los marcadores TrnL, Rps16 (intrones plastidiales) e ITS (nuclear), utilizados en estudios filogenéticos y filogeográficos en vegetales. Se extrajo ADN de material fresco de 54 individuos de *O. huaucui* abarcando la distribución conocida, se secuenciaron ambas hebras y se editaron manualmente. Asimismo, fueron descargadas secuencias disponibles en GenBank de otras Anacardiaceae. La disyunción entre *Orthopterygium* y su género hermano *Amphipterygium* resultó entre 16,52 y 14,82 millones de años, entre ambos se halló una distancia genética similar a linajes con una mayor diversificación; mientras que, no se detectaron mutaciones intraespecíficas en *Orthopterygium*. Este último resultado respondería a una baja dispersión y/o baja tasa mutacional, en vista de estudios ecológicos y moleculares realizados. Sin embargo, siendo la ausencia de mutaciones en marcadores nucleares un patrón común en especies recientes no obstante el origen miocénico detectado en *Orthopterygium*, podría tratarse de un linaje afectado por un severo cuello de botella genético. Más aun tratándose del único representante del género, *Orthopterygium huaucui* sería el resultado de un proceso migratorio de una especie ancestral desde el hemisferio norte de América, a través de un Istmo de Panamá ya formado, que aprovechó la aridez de la vertiente, cuyas características se han mantenido por más de 15 millones de años, para su establecimiento.

Abstract

Peruvian western slopes of the Andes are an arid ecosystem rich in endemic flora currently threatened by industrial and urban expansion. It is characterized by a flora of cacti and deciduous shrubs. *Orthopterygium huaucui* (A. Gray) Hemsley is an endemic monotypic genus of Anacardiaceae family which inhabits this ecosystem as scattered thickets on rocky slopes along 500 km of the central coast and whose closest species belonging to the genus *Amphipterygium* (found in Mexico and Central America). Between those two genera there is a disjunction of more than 3500 km. In order to determine 1) the population structure of *O. huaucui*, 2) the phylogenetic position of *O. huaucui* within the tribe Rhoeeae of the Anacardiaceae family and 3) the divergence time of *O. huaucui* within Anacardiaceae, we performed a Bayesian phylochronology calibrated with five fossil records and determined the genetic diversity. To get these aims we sequenced TrnL, Rps16 (plastid introns) and ITS (nuclear) markers broadly used in plant phylogenetic and phylogeographic studies. We extracted DNA from 51 individuals of *O. huaucui*, we amplified the three regions by PCR, we sequenced each one and edited manually. We downloaded sequences of other anacardiacean species available in GenBank. The disjunction between *Orthopterygium* and *Amphipterygium* resulted in 16,52 and 14,82 million years and a genetic distance between these two species was similar to lineages with greater diversification; whereas no intraspecific mutations were detected in *Orthopterygium*. This result would respond to a low dispersion or low mutation rate in view of ecological and molecular studies. In spite of the fact that the absence of mutations in nuclear markers is a common pattern in recent species and the Miocenic origin of *Orthopterygium*, we propose that this species was affected by a severe genetic bottleneck. Moreover, by considering as the single representative of the genus, *Orthopterygium huaucui* would be the result of an ancestral species migration from the northern hemisphere which has got the western slopes, an arid ecosystem for more than 15 million years, through a well-established Panama isthmus.

1.Introducción

Toda especie de distribución limitada es considerada endémica. Estos “límites y restricciones” son predeterminados por el investigador (Williams et al. 1996a) y pueden corresponder a criterios políticos como continentes, países, provincias o de extensión como áreas menores a 50 000 km² (Terborgh y Winter 1983), un grado cuadrado de longitud-latitud (Williams et al. 1996b) o incluso unidades menores (Williams et al. 1996a; Hopkinson et al. 2001). De las más de 18 000 especies que conforman la flora vascular peruana, cerca del 30% es de carácter endémico, sin duda uno de los más altos grados de endemismo en el continente (León et al. 2007).

La genética de poblaciones predice que especies de tamaños pequeños, como las endémicas en departamentos o provincias, presentarían bajos niveles de diversidad genética (Hamrick y Godt 1990; Soltis y Gitzendanner 1999). Por otro lado, existe una correlación directa observada en numerosos estudios entre el nivel de diversidad genética y el *fitness*, la presión selectiva del medio ambiente sobre los organismos (Reed y Frankham 2003; Vandewoestijne et al. 2008; Markert et al. 2010). De ser así, los niveles bajos de diversidad genética serían perjudiciales para la permanencia de una especie restringida a un hábitat determinado. Esto conlleva a la siguiente pregunta ¿si las especies de limitada distribución presentan niveles bajos de diversidad genética, entonces parte de las especies peruanas estarían en peligro potencial ante cambios climáticos eventuales o perturbaciones ambientales? Esta pregunta cobra relevancia al considerar el porcentaje de endemismo que presenta nuestro país, teniendo en cuenta además la escasa protección que reciben los ambientes naturales (incluso en regiones desarrolladas de la costa peruana), la quema de bosques, contaminación ambiental, minería informal, entre otros.

De ser positiva la respuesta, no solo estaríamos perdiendo ecosistemas, especies y las estrechas interacciones entre ellas, sino también genes (DeSalle 2005), los cuales más allá de revelar información crucial sobre la biodiversidad, podrían aprovecharse en la agricultura, la medicina y otros campos de la ciencia (Mondini et al. 2009). Sin información previa no hay material de base para lograr objetivos concretos en ninguno de aquellos campos y en el Perú los estudios de esta naturaleza aún son escasos, razón por la cual

existe un vacío considerable de información con respecto a este tema, sobre todo para especies nativas y más aún para las endémicas. Siendo así, la pregunta podría encontrar solución eligiendo una especie modelo para un estudio de diversidad genética, cuyos resultados también servirían de base para estudios en otras disciplinas.

Hasta el momento los estudios científicos sobre diversidad florística han estado dirigidos principalmente a la zona amazónica (Van der Hammen 2000; Fine et al. 2010) y andina (Pennington et al. 2010) con esfuerzos recientes para la costa norte (Linares-Palomino et al. 2010), por lo cual es considerable el conocimiento acumulado en algunas de las provincias biogeográficas de estos ambientes. Asimismo, los factores (ambientales, geológicos) que han influido en esta diversidad son estudiados desde hace años, un ejemplo de ello es la orogenia de los Andes que ha afectado no solo a la región andina sino a la amazónica (Antonelli et al. 2009; Hoorn et al. 2010). Sin embargo, se sabe muy poco de los fenómenos que han moldeado la diversidad de otras regiones, como la provincia de la vertiente occidental de la cordillera de los Andes. A su vez, en la actualidad son escasos los estudios de variabilidad genética de especies endémicas del Perú (Sahley 1996; Gengler y Crawford 2000).

Orthopterygium huacui (A.Gray) Hemsley (1907) es un arbusto caducifolio endémico del Perú perteneciente a la familia Anacardiaceae (León et al. 2007), habita en la Vertiente occidental de la Cordillera de los Andes como poblaciones discretas en los departamentos de Lima, Ica y Huancavelica (Weberbauer 1945; Brako y Zarucchi 1993; León et al. 2006) y cuyo ambiente natural está afectado por la expansión urbana y la actividad minera. Se caracteriza por su naturaleza dioica (flores masculinas y femeninas en individuos diferentes, hojas compuestas con folíolos de borde aserrado, frutos samaroides leñosos en estado maduro y tronco color rojo-vino (Hemsley 1907; Hemsley 1908). Mientras que esta especie se desarrolla en la mencionada región del hemisferio sur, su género hermano *Amphipterygium* (Schlechtendal 1843a; Schlechtendal 1843b), ubicado a 3500km de distancia, es exclusivamente mexicano-centroamericano; ambos géneros conformaron por largo tiempo la familia Julianiaceae, la que actualmente se encuentra incluida en la familia Anacardiaceae en base a caracteres moleculares, morfológicos, anatómicos y

bioquímicos (Pell 2004; Stern 1952; Wannan y Quinn 1988; Wannan 2006). Pese a ello, la posición evolutiva del clado Julianiaceae (el grupo de especies conformado por *Amphipterygium* y *Orthopterygium*) dentro de la familia no está esclarecida hasta el momento (Pell 2004), aun cuando a nivel morfológico las flores pistiladas de *Amphipterygium* encuentran cierta similitud con el género *Pistacia* (Bachelier y Endress 2007). *Orthopterygium huaucui* es aparentemente la única anacardiácea de la Vertiente occidental con una distribución limitada al centro del Perú, dado que los demás géneros de esta familia son propios de los valles interandinos (*Haplorhus*), bosques montanos (*Mauria*), bosques secos (*Loxopterygium*) y del bosque tropical húmedo en nuestro país (*Tapirira*), en cuya última región son muy abundantes. El género *Schinus* se encuentra ampliamente distribuido en toda la costa pacífica de Sudamérica y desde la costa sur de Norteamérica, por tanto ocupa gran parte de las provincias biogeográficas del Perú incluyendo la Vertiente occidental (Weberbauer 1945; Simpson y Ogorzaly 2000). Esta provincia biogeográfica se caracteriza por su aridez, laderas con declive pronunciado, suelo de poca profundidad y baja retención de agua, razones por las cuales presenta una flora adaptada a largos periodos de sequía, conformada principalmente por cactáceas como *Echinopsis pachanoi*, *Espostoa lanata*, *Neoraimondia arequipensis*, *Melocactus peruvianus*, y sub-arbustos como *Jatropha macracantha* y *Cnidocolus basiacanthus* (Figura 9). Estas especies se encuentran íntimamente asociadas con *O. huaucui* en una disposición agregada, lo cual ofrece indicios de la estrecha relación ecológica en dicho ambiente tan poco estudiado (Mostacero 2010). En Chosica (Lima) los asentamientos humanos en expansión ya se han establecido sobre la Vertiente occidental generando parches desnudos de vegetación. En las provincias de Chincha e Ica se encuentran establecimientos mineros en medio del matorral disperso del que forma parte esta especie. En Nazca, la actividad turística-recreacional en las dunas de arena amenaza a las plántulas y la germinación de las semillas, el riesgo para estas es mayor considerando que en esta zona se conoce la población más pequeña (León et al. 1997). No obstante, el estudio de diversidad genética en plantas presenta ciertos factores a considerar, tales como tiempo generacional, área de distribución y tipo de reproducción

(Hollingsworth 2011), los cuales, ciertamente, contribuyen a un bajo nivel de diversidad en las siguientes circunstancias: los tiempos generacionales largos como en árboles y arbustos (especies perennes) implican que el recambio de los individuos es suficientemente lento como para fijar las mutaciones, a diferencia de las hierbas o especies estacionales (Yue et al. 2010), que se desarrollan mucho más rápido. Por otro lado, un área de distribución pequeña (endemismo) puede ser producto de una reducción generada por eventos ambientales en el pasado, los cuales conducen a la pérdida de combinaciones cromosómicas de las poblaciones ancestrales. Por último ha de considerarse que mientras la reproducción sexual es fuente de variabilidad, la reproducción asexual produce un efecto opuesto: homogeniza a las poblaciones.

Orthopterygium huaucui sería también una especie de relevancia biomédica y farmacológica aun en potencia. Un estudio fitoquímico realizado por González et al. (1983) reveló la presencia de compuestos triterpenos como los ácidos betulónico y morónico, dos metabolitos de actividad antiviral contra el herpes simple (Kurokawa et al. 1999) y el HIV (Ito et al. 2001; Qian et al. 2010). El derivado del ácido betulónico, el ácido betulínico, es empleado en el tratamiento contra el cáncer de piel (Pisha et al. 1995), cáncer de colon (Chintharlapalli et al. 2011) y el HIV tipo 2 (Dang et al. 2009) entre otras numerosas aplicaciones en la ciencia médica. Mostacero (2010) reporta el uso en la medicina tradicional del latex de *O. huaucui* contra la “uta” o leishmaniasis ocasionada por *Leishmania brasiliensis*, aseveración que encuentra sus bases en numerosos reportes científicos (Alakurtti et al. 2010; Chowdhury et al. 2003; Yli-Kauhaluoma et al. 2010; Das, et al. 2006). Asimismo, *O. huaucui* presenta tres triterpenos (González et al. 1983; González et al. 1984) cuyas actividades aún no han sido ensayadas. Por otro lado, en otro estudio realizado en su especie hermana *Amphipterygium adstringens* se han aislado triterpenos pentacíclicos con actividad anti-úlceras gástrica (Rosas-Acevedo et al. 2011), citotóxica (Giner-Larza et al. 2002; Oviedo-Chávez et al. 2004), antiinflamatoria (Oviedo-Chávez et al. 2004), hipocolesterolémica y gastroprotectora (Arrieta et al. 2003). Además, ha sido patentado en Estados Unidos un tónico capilar derivado del extracto de ambos géneros (Tsuru et al. 1996). Tales antecedentes amplían el panorama de estudio de la

especie en mención y resaltan la necesidad de conocer otros aspectos de la misma, tanto para su futuro aprovechamiento como para su conservación.

2.Marco Teórico

2.1. Características, distribución y sistemática de la familia Anacardiaceae

La familia Anacardiaceae está compuesta por más de 700 especies agrupadas en dos subfamilias, Anacardioideae y Spondioideae con un total de 82 géneros (Lindley 1831; Cronquist 1981). Se caracteriza por presentar porte arbustivo y arbóreo, hojas estipuladas simples o pinnaticompuestas, disco nectarífero intraestaminal en las flores y óvulos apótropos (Cronquist 1981; Judd 2008). Entre las especies más conocidas podemos citar a *Mangifera indica* “mango”, *Anacardium occidentale* “cacho” con frutos comerciales, y dos representantes del género *Schinus*, *S. molle* y *S. terebinthifolius* “molles”, ornamentales cuyos frutos además son consumidos como “pimienta roja”, y por último a *Spondias purpurea* “ciruela”. A nivel bioquímico presentan fenoles, ésteres y taninos con actividades antimicrobianas (Saxena et al. 1994), antifúngicas y repelente contra insectos y herbívoros (Chen et al. 1984), son también de especial interés los componentes causantes de dermatitis presentes en 32 géneros (Aguilar-Ortigoza et al. 2004). En cuanto a su distribución, esta familia se encuentra en el continente americano, desde Canadá hasta la Patagonia; África; sur de Europa; Asia subtropical y tropical; y gran parte de las islas del Pacífico. Los centros de diversidad primario corresponden a México, Sudamérica, África ecuatorial y sur, Madagascar, Indochina y Malasia, siendo el Paleotrópico más rico en especies que el Neotrópico (Kubitzki 2011).

Estudios filogenéticos a nivel molecular corroboran la inclusión de la familia Anacardiaceae en el orden Sapindales (Terrazas 1994; Gadek et al. 1996) y a la familia Burseraceae como su grupo hermano. En la actualidad, la investigación más completa corresponde a la tesis doctoral de carácter filogenético realizada por Pell (2004) quien empleó los marcadores moleculares plastidiales TrnLTrnLF, Rps16 y matK, en él se distinguen dos grandes clados que corresponden a las subfamilias Anacardioideae y Spondioideae, tal como fue planteado por Bentham y Hooker (1862); dentro de Anacardioideae se distinguen a su vez las tribus Rhoeeae, Anacardieae y Semecarpeae, siendo estas dos últimas de estrecha relación y hermanas de la primera; este estudio además ubica a la familia Julianiaceae, a la cual perteneció *O. huacui* (junto con *Amphipterygium*), dentro de la tribu Rhoeeae; no obstante, las relaciones evolutivas de

Julianiaceae con las especies restantes de esta tribu no se han resuelto aún. Esto podría deberse a un muestreo incompleto, métodos filogenéticos empleados o a la insuficiente información ofrecida por los marcadores utilizados.

2.2. Estudios filogenéticos dentro de Anacardiaceae

Hasta el momento se han realizado estudios filogenéticos a nivel de la subfamilia Anacardioideae en los siguientes géneros: *Rhus* (Miller et al. 2001; Yi et al. 2007), *Pistacia* (Parfitt y Badenes 1997; Yi et al. 2008), *Toxicodendron* (Nie et al. 2009), *Mangifera* (Eiadthong et al. 1999; Yonemori et al. 2002; Fitmawati 2010), *Abrahamia - Protorhus* (Pell 2004; Pell et al. 2011) y por último en *Bonetiella*, *Smodingium* y *Pseudosmodingium* por Aguilar-Ortigoza et al. (2004). Según los resultados, todos ellos a excepción de *Rhus*, un género con numerosas especies y de amplia distribución, presentan carácter monofilético. Sin embargo, más allá de la tesis de Pell (2004), estos datos aislados no se han adicionado en un único trabajo para esclarecer la filogenia de Anacardiaceae en cuanto a sus relaciones intergenéricas.

2.3. Estudios intraespecíficos y diversidad genética en Anacardiaceae

Aparentemente los únicos estudios intraespecíficos realizados en la familia son de carácter filogeográfico y para el género *Astronium* en las especies *A. urundeuva* (Caetano et al. 2008a), *A. fraxinifolium* y *A. balansae* (Caetano et al. 2008b). Curiosamente estas especies de amplia distribución en el Cerrado, La Caatinga, Chaco, y Bosque estacional seco (Pennington et al. 2010) presentan niveles bajos y muy similares de diversidad genética con marcadores moleculares plastidiales y microsatélites. Tales resultados pueden deberse a cuellos de botella genéticos sufridos durante el Pleistoceno y al largo tiempo requerido para el recambio generacional. Este trabajo demuestra la limitada información existente en cuanto a variación intraespecífica de Anacardiaceae.

2.4. Diversidad genética de especies endémicas

La genética de poblaciones predice que especies de distribución muy restringida y tamaños poblacionales pequeños deberían presentar bajos niveles de diversidad genética

(Hamrick et al. 1979; Hamrick y Godt 1990; Karron 1991; Godt et al. 1996; Frankham et al. 2010; Avise 2000). Esto debido a que la deriva génica facilitaría la fijación de alelos y la pérdida de otros, fenómeno menos probable en poblaciones grandes y ampliamente distribuidas (Barrett y Kohn 1991; Ellstrand y Elam 1993). Asimismo, se esperaría una estructuración poblacional en estos casos, dado que la deriva actuaría de manera independiente en cada una de estas pequeñas poblaciones fijando diferentes alelos (Hamrick y Godt 1990; Avise 2000; Frankham et al. 2010).

El estudio de la diversidad genética de plantas endémicas requiere también la consideración de la historia natural, y para ello es muy importante el empleo de especies cercanamente relacionadas (Soltis y Gitzendanner 1999). Gitzendanner y Soltis (2000) realizaron una revisión de datos publicados en diversidad genética en especies cercanas y hallaron muchos casos de correlación directa entre limitada distribución (rarezas) y baja diversidad genética, cumpliéndose así las predicciones teóricas. Sin embargo hallaron también curiosas excepciones también reportadas por otros autores (Maki et al. 1999; Neel y Ellstrand 2001; Dodd y Helenurm 2002; Broadhurst y Coates 2004). En base a esta revisión y otros estudios (Helenurm y Hall 2005) se puede resaltar la importancia de las fluctuaciones históricas de los tamaños poblacionales (demografía) en el moldeado de la diversidad genética.

2.5. Los marcadores ITS, TrnL y Rps16

Las secuencias de ADN contienen información evolutiva dependiendo de su naturaleza y origen (genomas nuclear, plastidial o mitocondrial), por tal motivo pueden considerarse como marcadores moleculares y serán útiles según la escala de la caracterización genética que se requiera por ejemplo filogenia, filogeografía, genética de poblaciones o diversidad genética (Avise 2004). El genoma nuclear ofrece la posibilidad de observar los fenómenos de introgresión y dispersión del polen, asimismo presenta una tasa mutacional mayor que los genomas plastidial y mitocondrial (Wolfe et al. 1987; Clegg et al. 1997). El marcador nuclear ITS (del inglés *Internal Transcribed Spacer*), región del genoma nuclear correspondiente a ARN ribosomal, contiene dos regiones no codificantes (ITS 1 e ITS 2)

entre las cuales se ubica la región codificante 5.8S. Dentro de las virtudes que presenta se puede mencionar las siguientes: herencia biparental, razón por la cual ofrece la posibilidad de observar fenómenos de hibridación, poliploidia (Rieseberg et al. 2000), así como evolución reticulada (Sang et al. 1995); universalidad, dado que se encuentra en todos los organismos eucariotas, ha permitido el desarrollo de cebadores universales (White et al. 1990); repetición en tandem de la secuencia, lo cual facilita su amplificación a diferencia de aquellas medianamente repetidas o de copia única (Baldwin y Markos 1998); uniformidad intragenómica, es decir que todas las copias presentan, usualmente, la misma secuencia por evolución concertada (Koch et al. 2003); variabilidad intergenómica, lo cual permite el empleo del polimorfismo en los estudios filogenéticos; grado de neutralidad, dado que es no codificante y removido por *splicing* durante la maduración del transcripto.

El genoma plastidial vegetal, al presentar un tamaño menor que el nuclear (aproximadamente 150 kb), ofrece la posibilidad de observar los efectos de ciertas fuerzas evolutivas como la deriva génica; asimismo, al ser transmitido por la ovocélula (gameto femenino) al igual que el genoma mitocondrial por el ovocito en animales, muestra la herencia materna por medio de dispersión de semillas (Raven y Allen 2003); además de presentar una tasa mutacional mucho menor que el genoma nuclear (Shaw et al. 2007; Soria-Hernanz et al. 2008). Los marcadores plastidiales TrnL y Rps16 han sido ampliamente usados en estudios de filogenia, filogeografía y diversidad (Zhang y Yang 2000; Kenicer et al. 2005; Yuan et al. 2008; Collevatti et al. 2009; Oliveira et al. 2010; Byrne y Hankinson 2012; Lee et al. 2013). Ambos codifican ARN de transferencia correspondiente al aminocácido Leucina y RNA ribosomal 16S, respectivamente, y contienen una región intrónica, es decir no codificante. El desarrollo de cebadores universales para estos marcadores los ha convertido en dos de los más empleados en estudios moleculares de diversidad en filogenia, filogeografía y diversidad, principalmente por la presencia de intrones, los cuales presentan tasas mutacionales mayores que sus regiones codificantes (Taberlet et al. 1991; Oxelman et al. 1997).

3. Hipótesis

3.1. Hipótesis de trabajo

- Dada su distribución restringida, *Orthopterygium huaucui* presenta una baja diversidad genética aun cuando sus poblaciones forman parches de vegetación.
- El análisis filogenético con los marcadores ITS, TrnL y Rps16 ubica a *Orthopterygium huaucui* dentro de un clado de la tribu Rhoeeae en la familia Anacardiaceae, resolviendo su posición evolutiva.
- El análisis de filocronología bayesiana con los marcadores ITS, TrnL y Rps16 permite conocer antigüedad de *Orthopterygium huaucui*.

3.2. Hipótesis nula

- Las poblaciones aisladas de *Orthopterygium huaucui* corresponden a unidades genéticamente diferenciadas, por lo que presenta una alta diversidad genética.
- El análisis filogenético con los marcadores ITS, TrnL y Rps16 no permite resolver la posición evolutiva de *Orthopterygium huaucui* dentro de la tribu Rhoeeae en familia Anacardiaceae.
- El análisis de filocronología bayesiana con los marcadores ITS, TrnL y Rps16 no permite conocer antigüedad de *Orthopterygium huaucui*.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

- Caracterizar la diversidad genética de las poblaciones de *Orthopterygium huaucui* en el rango de su distribución conocida mediante secuencias de ADN, resolver su posición filogenética en la tribu Rhoëae de la familia Anacardiaceae y conocer el tiempo de origen de *Orthopterygium* en la familia.

4.2. Objetivos específicos

- Obtener secuencias de ADN de los marcadores plastidiales TrnL y Rps16, así como del marcador nuclear ITS de *Orthopterygium huaucui* y de otras especies de Anacardiaceae.
- Caracterizar los haplotipos de cada marcador en las poblaciones de *Orthopterygium huaucui*.
- Reconstruir la filogenia de la familia Anacardiaceae con la información de los marcadores TrnL, Rps16 e ITS.
- Reconstruir la filogenia calibrada de la familia Anacardiaceae con la información de los tres marcadores mencionados e información de registros fósiles.

5. Materiales y Métodos

5.1. Zonas de muestreo

Se realizaron muestreos en las provincias de Canta y Huarochirí (Lima), en la provincia de Nazca (Ica) (Figura 4) y en la provincia de Castrovirreyna (Huancavelica) (Figura 2). Se siguió una ruta de norte a sur con la finalidad de abarcar la distribución más completa de esta especie (Figura 1), basándonos en los reportes de las poblaciones encontradas en diferentes estudios. Es de importancia mencionar que no se pretendió determinar la distribución total de la especie, y las localidades de acceso restringido no fueron incluidas en este estudio.

Tabla 1. Localidades de muestreo de *Orthopterygium huaucui* para este estudio.

Departamento	Provincia	Localidad	Latitud	Longitud	Altitud
Lima	Canta	C1	11°39'57.96"S	76°46'37.82"W	1300
		C2	11°33'07.17"S	76°42'54.10"W	1765
	Huarochirí	SE1	11°50'42.02"S	76°38'02.12"W	1400
		SE2	11°50'23.87"S	76°37'50.33"W	1450
		SE3	11°49'49.75"S	76°37'43.50"W	1650
Ica	Nazca	N1	14°51'19.20"S	74°50'22.90"W	1380
		N2	14°51'30.00"S	74°50'51.00"W	1493
		N3	14°51'06.10"S	74°50'37.00"W	1280
Huancavelica	Castrovirreyna	T1	13°27'35.80"S	75°28'20.20"W	1806
		T2	13°27'31.30"S	75°28'18.10"W	1676
		T3	13°27'32.00"S	75°28'14.70"W	1766

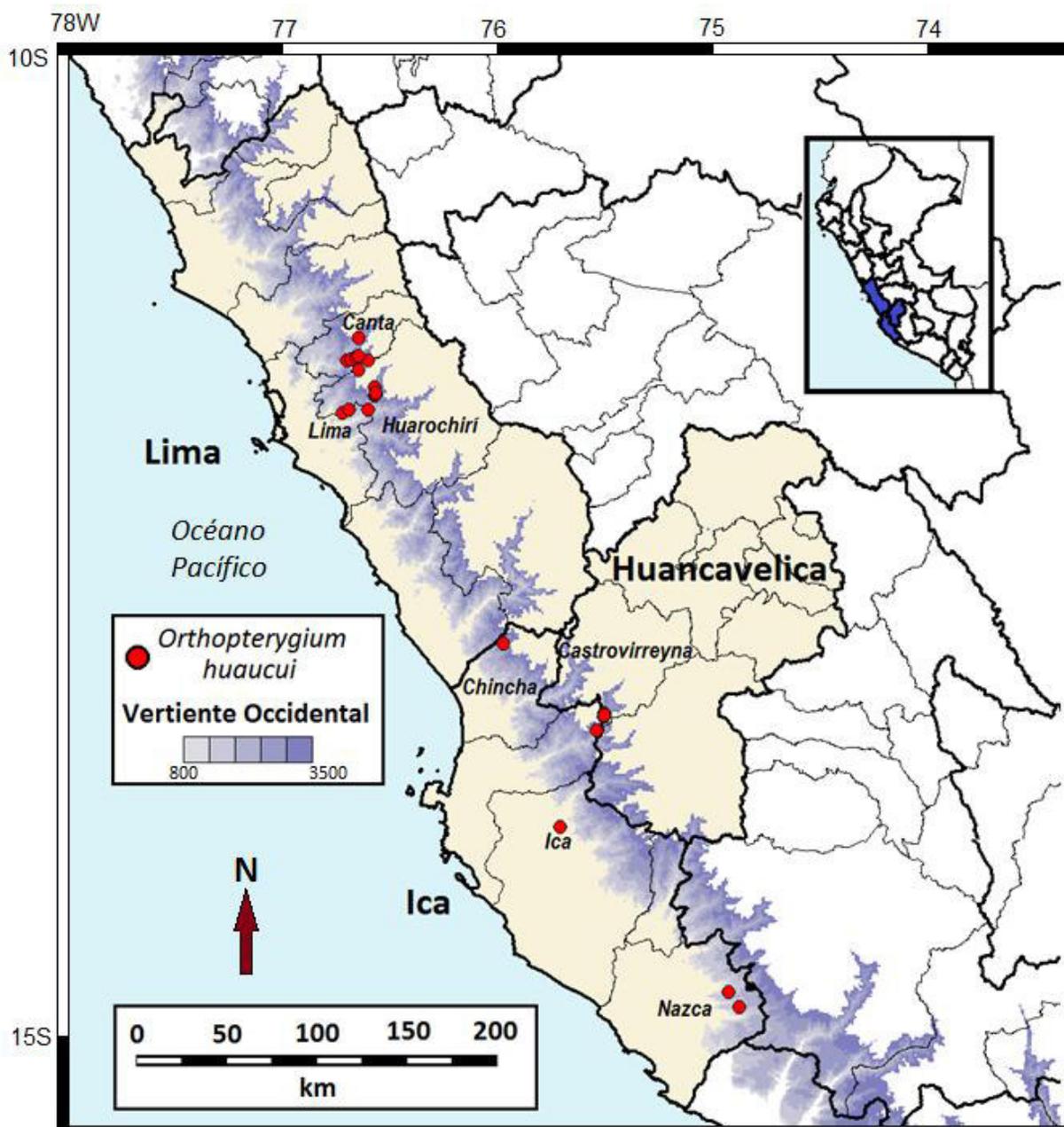


Figura 1. Distribución de *Orthopterygium huaucui*. La Vertiente occidental de la Cordillera de los Andes se resalta ente 800 y 3500 msnm. Los puntos de muestreo para este estudio corresponden a las localidades de Canta, Huarochirí, Castrovirreyna y Nazca.

5.2. Colecta y preparación de muestras para extracción de ADN

En cada localidad se realizaron colectas en las zonas baja, media y alta. Fueron seleccionadas un mínimo de 5 hojas vigorosas por individuo, éstas debían mostrar buenos estados metabólicos, es decir verdes y turgentes (Figura 8). Para evitar rametos, se colectaron individuos distanciados 20 metros como mínimo. Las hojas se colocaron en sobres de papel toalla, renovado cada 24 horas hasta su almacenamiento final en Lima, para lo cual se deshidrataron a una temperatura de 37 °C en una estufa, luego de lo cual se guardaron con silica gel en bolsas plásticas selladas. Se colectaron un total de 51 individuos (Tabla 2).

En la localidad de Cerro Blanco (Nazca), debido al estado caducifolio/reproductivo de casi todos los individuos observados (Figura 4), se colectaron ramas terminales de aproximadamente 15 cm las que fueron cuidadosamente envueltas en papel toalla (sin lastimar la yema terminal) y almacenadas en envases cilíndricos. Resultados previos demostraron que ramas terminales con yemas en buen estado sumergidas en agua hasta la mitad de su longitud desarrollan hojas en un lapso de una semana (datos no publicados). Este procedimiento resultó exitoso y se lograron hojas en buen estado (Figura 10).

Asimismo, se contó con muestras provenientes del herbario Nacional de Bolivia, LPB (*Loxopterygium grisebachii* y *Cardenasiodendron brachypterum*) y del Herbario de la Universidad de Texas en Austin - Plant Resources Center, TEX-LL (*Pistacia texana*) (Tabla 3).

Tabla 2. Números de accesoión de los especímenes de *Orthopterygium huaucui* empleados en este estudio. P, dato pendiente.

Especie	Nº USM	Nº Colecta	Departamento	Provincia	Localidad	País	Colector	Fecha de colecta
<i>O. huaucui</i>	P	PH1143	Huancavelica	Castrovirreyna	T1	Perú	V. Jiménez y D. Figueroa	13/04/2012
<i>O. huaucui</i>	P	PH1231	Huancavelica	Castrovirreyna	T1	Perú	V. Jiménez y D. Figueroa	13/04/2012
<i>O. huaucui</i>	P	PH1342	Huancavelica	Castrovirreyna	T1	Perú	V. Jiménez y D. Figueroa	13/04/2012
<i>O. huaucui</i>	P	PH2135	Huancavelica	Castrovirreyna	T2	Perú	V. Jiménez y D. Figueroa	13/04/2012
<i>O. huaucui</i>	P	PH2236	Huancavelica	Castrovirreyna	T2	Perú	V. Jiménez y D. Figueroa	13/04/2012
<i>O. huaucui</i>	P	PH2330	Huancavelica	Castrovirreyna	T2	Perú	V. Jiménez y D. Figueroa	13/04/2012
<i>O. huaucui</i>	P	PH3141	Huancavelica	Castrovirreyna	T3	Perú	V. Jiménez y D. Figueroa	13/04/2012
<i>O. huaucui</i>	P	PH3344	Huancavelica	Castrovirreyna	T3	Perú	V. Jiménez y D. Figueroa	13/04/2012
<i>O. huaucui</i>	P	PH4129	Huancavelica	Castrovirreyna	T3	Perú	V. Jiménez y D. Figueroa	13/04/2012
<i>O. huaucui</i>	P	PH4345	Huancavelica	Castrovirreyna	T3	Perú	V. Jiménez y D. Figueroa	13/04/2012
<i>O. huaucui</i>	P	PH5337	Huancavelica	Castrovirreyna	T3	Perú	V. Jiménez y D. Figueroa	13/04/2012
<i>O. huaucui</i>	275697	CBN2.1	Ica	Nazca	N1	Perú	V. Jiménez y D. Figueroa	15/04/2012
<i>O. huaucui</i>	275698	CBNd1	Ica	Nazca	N1	Perú	V. Jiménez y D. Figueroa	15/04/2012
<i>O. huaucui</i>	275699	CBN1.1	Ica	Nazca	N1	Perú	V. Jiménez y D. Figueroa	15/04/2012
<i>O. huaucui</i>	275700	CBNs.n.	Ica	Nazca	N1	Perú	V. Jiménez y D. Figueroa	15/04/2012
<i>O. huaucui</i>	275701	CBNhuayco	Ica	Nazca	N1	Perú	V. Jiménez y D. Figueroa	15/04/2012
<i>O. huaucui</i>	275702	CBNd2	Ica	Nazca	N2	Perú	V. Jiménez y D. Figueroa	15/04/2012
<i>O. huaucui</i>	275703	CBN1.2	Ica	Nazca	N2	Perú	V. Jiménez y D. Figueroa	15/04/2012
<i>O. huaucui</i>	275704	CBNd3	Ica	Nazca	N2	Perú	V. Jiménez y D. Figueroa	15/04/2012
<i>O. huaucui</i>	275705	CBN1.3	Ica	Nazca	N2	Perú	V. Jiménez y D. Figueroa	15/04/2012
<i>O. huaucui</i>	275706	CBNd4	Ica	Nazca	N2	Perú	V. Jiménez y D. Figueroa	15/04/2012
<i>O. huaucui</i>	275707	CBN2.4	Ica	Nazca	N3	Perú	V. Jiménez y D. Figueroa	15/04/2012
<i>O. huaucui</i>	275708	CBN1.4	Ica	Nazca	N3	Perú	V. Jiménez y D. Figueroa	15/04/2012
<i>O. huaucui</i>	275709	CBN1.5	Ica	Nazca	N3	Perú	V. Jiménez y D. Figueroa	15/04/2012
<i>O. huaucui</i>	275710	CBNd5	Ica	Nazca	N3	Perú	V. Jiménez y D. Figueroa	15/04/2012
<i>O. huaucui</i>	275711	CBN2.5	Ica	Nazca	N3	Perú	V. Jiménez y D. Figueroa	15/04/2012

Especie	Nº USM	Nº Colecta	Departamento	Provincia	Localidad	País	Colector	Fecha de colecta
<i>O. huaucui</i>	P	C111	Lima	Chillón	C1	Perú	Blanca León	22/01/2009
<i>O. huaucui</i>	P	C126	Lima	Chillón	C1	Perú	Blanca León	22/01/2009
<i>O. huaucui</i>	P	C1311	Lima	Chillón	C1	Perú	Blanca León	22/01/2009
<i>O. huaucui</i>	P	C1415	Lima	Chillón	C1	Perú	Blanca León	22/01/2009
<i>O. huaucui</i>	P	C1519	Lima	Chillón	C1	Perú	Blanca León	22/01/2009
<i>O. huaucui</i>	P	C1623	Lima	Chillón	C1	Perú	Blanca León	22/01/2009
<i>O. huaucui</i>	P	C212	Lima	Chillón	C2	Perú	Blanca León	22/01/2009
<i>O. huaucui</i>	P	C227	Lima	Chillón	C2	Perú	Blanca León	22/01/2009
<i>O. huaucui</i>	P	C2312	Lima	Chillón	C2	Perú	Blanca León	22/01/2009
<i>O. huaucui</i>	P	C2416	Lima	Chillón	C2	Perú	Blanca León	22/01/2009
<i>O. huaucui</i>	P	C2520	Lima	Chillón	C2	Perú	Blanca León	22/01/2009
<i>O. huaucui</i>	P	SE113	Lima	Huarocharí	SE1	Perú	Blanca León	02/02/2009
<i>O. huaucui</i>	P	SE128	Lima	Huarocharí	SE1	Perú	Blanca León	02/02/2009
<i>O. huaucui</i>	P	SE1313	Lima	Huarocharí	SE1	Perú	Blanca León	02/02/2009
<i>O. huaucui</i>	P	SE1417	Lima	Huarocharí	SE1	Perú	Blanca León	02/02/2009
<i>O. huaucui</i>	P	SE1521	Lima	Huarocharí	SE1	Perú	Blanca León	02/02/2009
<i>O. huaucui</i>	P	SE215	Lima	Huarocharí	SE2	Perú	Blanca León	02/02/2009
<i>O. huaucui</i>	P	SE215	Lima	Huarocharí	SE2	Perú	Blanca León	02/02/2009
<i>O. huaucui</i>	P	SE2210	Lima	Huarocharí	SE2	Perú	Blanca León	02/02/2009
<i>O. huaucui</i>	P	SE314	Lima	Huarocharí	SE3	Perú	Blanca León	02/02/2009
<i>O. huaucui</i>	P	SE329	Lima	Huarocharí	SE3	Perú	Blanca León	02/02/2009
<i>O. huaucui</i>	P	SE3314	Lima	Huarocharí	SE3	Perú	Blanca León	02/02/2009
<i>O. huaucui</i>	P	SE3418	Lima	Huarocharí	SE3	Perú	Blanca León	02/02/2009
<i>O. huaucui</i>	P	SE3522	Lima	Huarocharí	SE3	Perú	Blanca León	02/02/2009
<i>O. huaucui</i>	P	SE3624	Lima	Huarocharí	SE3	Perú	Blanca León	02/02/2009

Tabla 3. Números de accesión de los especímenes de Anacardiaceae empleados en este estudio. LPB, Herbario Nacional de Bolivia.

TEX LL, Herbario de la Universidad de Texas en Austin. ND, dato no disponible.

Especie	Herbario	Accesion	Departamento	Provincia	País	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)	Fecha de Colecta
<i>Cardenasiodendron brachypterum</i>	LPB	Es - 918	Cochabamba	Narciso Campero Leyes	Bolivia	ND	ND	2280	09/01/1994
<i>Cardenasiodendron brachypterum</i>	LPB	Fzr - 4527	Tarija	Burnet O'Connor	Bolivia	21°02'65"S	64°12'07"W	1500	09/03/2006
<i>Loxopterygium grisebachii</i>	LPB	MN - 49074	Santa Cruz	Cordillera	Bolivia	18°38'S	63°14'W	510	19/04/1998
<i>Loxopterygium grisebachii</i>	LPB	MN - 845	Potosi	Oronko'ta	Bolivia	ND	ND	2050	10/11/2000
<i>Loxopterygium grisebachii</i>	LPB	MN - 53703	Santa Cruz	J.M. Caballero	Bolivia	18°06'05"S	64°31'05"W	1710	09/12/2005
<i>Loxopterygium grisebachii</i>	LPB	R-4046	Tarija	Gran Chaco	Bolivia	21°17'S	63°37'W	612	20/09/2004
<i>Loxopterygium grisebachii</i>	LPB	J.R.I. Wood 10634	Santa Cruz	Valle Grande	Bolivia	ND	ND	1900	12/02/1996
<i>Loxopterygium grisebachii</i>	LPB	J.R.I. Wood 10592	Santa Cruz	Valle Grande	Bolivia	18°20'S	64°09'W	1550	10/02/1996
<i>Pistacia texana</i>	TEX LL	B.Leon 5510	ND	ND	USA	ND	ND	ND	10/2012



Figura 2. Vertiente occidental a 16 km de la frontera entre Pisco (Ica) y Castrovirreyna (Huancavelica) a 1766 msnm. Se distinguen cactus columnares. Los arbustos son *Orthopterygium huacui* (señalado con flechas negras) y *Cnidoscolus basiacanthus* (señalado con flechas naranjas). Foto: Victor Jiménez.



Figura 3. Individuo en estado vegetativo. Vertiente occidental 16 km de la frontera entre Pisco (Ica) y Castrovirreyna (Huancavelica), a 1693 msnm. Foto: Victor Jiménez.



Figura 4. Población de *Orthoptegyium huaucui* en Cerro Blanco, gran duna de arena a 3 Km de la ciudad de Nazca, a 1380 msnm. Foto: Victor Jiménez.



Figura 5. Individuo fenemino con abundantes inflorescencias en Cerro Blanco, Nazca, a 1280 msnm. Foto: Victor Jiménez.



Figura 6. Inflorescencia masculina de *Orthopterygium huaucui*.Castrovirreya (Huancavelica). Foto: Victor Jiménez.



Figura 7. Inflorescencia femenina de *Orthopterygium huaucui*. Castrovirreya (Huancavelica). Foto: Victor Jiménez.



Figura 8. Rama terminal con hojas tiernas en estado óptimo para la extracción de ADN. Nazca (Ica). Foto: Victor Jiménez.



Figura 9. Asociación de *Orthopterygium huacui* con otros arbustos como *Cnidoscolus basiacantus* y cactáceas columnares como *Haageocereus sp.* Chosica (Lima). Foto: Victor Jiménez.



Figura 10. Hojas tiernas de *O. huaucui* desarrolladas luego de incluir en agua la rama terminal por dos semanas, proveniente de Nazca (Ica). Foto: Victor Jiménez.

5.3. Extracción de ADN

El trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Sistemática Molecular y Filogeografía de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM). Las muestras secas se pulverizaron en nitrógeno líquido con la finalidad de romper la pared vegetal. Posteriormente se empleó el *kit* de extracción para material vegetal Quiagen, que consiste de un conjunto de reactivos y columnas de filtración que permiten obtener ADN total en un promedio de 3 horas, también se empleó el protocolo de extracción con *buffer* CTAB (Doyle y Doyle 1987). Las extracciones de ADN fueron realizadas en momentos diferentes y los microtubos empleados para las amplificaciones fueron cuidadosamente rotulados. La cuantificación de ADN se realizó en un equipo NanoDrop 2000. Las muestras muy concentradas (mayores a 40 ng/uL) fueron diluidas con agua bidestilada, aquellas muy diluidas (menores a 4 ng/uL) fueron concentradas por evaporación a 50 °C en una estufa. Aquellas con relaciones ADN-proteína 260/280 menores a 1,7 fueron relavadas con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) o se realizó una nueva extracción.

5.4. Amplificación por PCR

Para la amplificación de la región ITS se utilizaron los cebadores universales ITS4 e ITS5 diseñados por White (White et al. 1990) los cuales permiten obtener una región que contiene los espaciadores ITS1 e ITS2. Para la región plastidial TrnL se utilizaron los cebadores Trn5' y Trn3' diseñados por Taberlet (Taberlet et al. 1991), esta región codifica para ARN de transferencia del aminoácido leucina, sin embargo presenta un intron el cual es amplificado por estos cebadores. Finalmente para la región Rps 16 se utilizaron los cebadores RpsF y RpsR2 diseñados por Oxelman (1997), con los cuales se amplifica el intron. Los productos resultaron de aproximadamente 800, 600 y 1000 pb respectivamente. Cada reacción empleó un volumen de 12,5 µl, el contenido se detalla a continuación: agua bidestilada, 0,5 unidades de Taq polimerasa, solución *buffer* 1X, 0,2mM de dNTP, 1,25mM de MgCl₂, 0,2 µM de cada primer y 2 µl de ADN total. El programa seguido en este procedimiento fue de 7 minutos de predenaturación a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a la temperatura variable de hibridación y 1 minuto a 72 °C para la elongación, con una elongación final de 7 minutos a 72 °C. La temperatura de hibridación (*annealing*) dependió de la obtención de bandas únicas y específicas, considerando en principio, 55°C para ITS y 52°C para las regiones plastidiales. De obtener más de una banda se procedió a aumentar esta temperatura gradualmente y de obtener bandas tenues, se disminuyó gradualmente.

5.5. Visualización de amplificadores

La visualización de amplificadores se realizó mediante electroforesis submarina en *buffer* TBE 0,5X, en geles de agarosa al 1% durante 30 minutos a 100 voltios. Para ello se retiró 4 µl de cada muestra (PCR) a la cual se añadió 1µl de *buffer* de carga Syber Green. Para la identificación de tamaño de amplificadores se empleó un marcador de tamaño molecular con bandas de 1000 a 100 pb en intervalos de 100. Cada reacción positiva y óptima (aquella que presentó una única banda luminosa) fue repetida a 20 µl de volumen de reacción para su posterior purificación y secuenciamiento.

5.6. Purificación y secuenciamiento de amplificadores

La purificación tiene por finalidad aislar el amplificado de los demás compuestos y residuos del proceso de PCR para un eficiente secuenciamiento. Tanto la purificación por el método de perlas magnéticas como el secuenciamiento mediante el método de Sanger fueron llevados a cabo por los servicios de la compañía MACROGEN INC. (Corea del Sur). Para asegurar la calidad de los datos, se secuenciaron ambas hebras de ADN.

5.7. Edición y alineamiento múltiple de secuencias

Las secuencias en formato AB1 (cromatogramas) se analizaron visualmente con el programa Chromas Lite (McCarthy 1996), para verificar la calidad del proceso según la buena definición de cada base como una onda o pico. Las secuencias consenso se obtuvieron con el programa en línea CAP3 (Huang y Madan 1999). El paso siguiente corresponde al alineamiento múltiple de las mismas con el programa Clustal X2 (Thompson et al. 1997), el cual compara las posiciones de los nucleótidos identificando similitudes entre ellas; éste permite reconocer además regiones conservadas y variables. Se realizó un ajuste manual de cada alineamiento con el programa Bioedit (Hall 1999), que facilita la inclusión de espacios o gaps, para mejorar la calidad del alineamiento.

5.8. Caracterización de las secuencias

Se evaluó la idoneidad de las secuencias con la herramienta BLAST disponible en la base de datos GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>), esto permitió corroborar la identidad de cada marcador mediante una comparación de las secuencias de *O. huacui*, *Loxopterygium grisebachii*, *Cardenasiodendron brachypterum* y *Pistacia texana* con las de otras Anacardiaceae. También se descargaron secuencias de otras especies para evaluar la composición y proporción de bases de cada marcador con el programa DAMBE (Xia y Xie 2001). Las secuencias fueron analizadas independientemente o concatenadas, esta última operación se realizó con el programa Phyutility v2.2 (Smith y Dunn 2008).

5.9. Posición y origen de *Orthopterygium huaucui* dentro de la familia Anacardiaceae

Se evaluaron las relaciones evolutivas de *O. huaucui* dentro de la familia Anacardiaceae sobre la base de los marcadores ITS, TrnL intron y Rps16 intron. Estas fueron contrastadas con secuencias para otras especies de Anacardiaceae que se obtuvieron también en el presente estudio y adicionalmente con aquellas disponibles en la base de datos GenBank. La divergencia genética fue analizada con el programa Mega5 (Tamura et al. 2011), empleando el modelo de Kimura 2 parámetros. Mientras que para la reconstrucción de la filogenia se utilizaron los siguientes métodos filogenéticos: Máxima parsimonia (MP) Máxima verosimilitud (MV) e Inferencia Bayesiana (IB). Los dos primeros con el programa PAUP 4.0 (Swofford 2003) y el último, con Mr.Bayes (Huelsenbeck y Ronquist 2001). En este último se emplearon 10 ó 20 millones de generaciones con muestreos cada 100 generaciones. Se realizaron 1000 repeticiones *bootstrap* para evaluar el soporte de cada nodo en los árboles de MP y MV; mientras que para el árbol IB se consideró el nivel de probabilidad posterior. Como herramienta diagnóstica de la convergencia de cadenas en el análisis bayesiano se consideró la desviación estándar entre las dos corridas independientes del análisis MCMC y se realizó un *burn-in* del 25% de árboles iniciales generados. Asimismo, se hallaron los mejores modelos de sustitución nucleotídica con el programa Modeltest (Posada y Crandall 1998). La evaluación de los tiempos de divergencia se determinó con el programa BEAST v1.7.5 (Drummond y Rambaut 2007) mediante un árbol relajado con 20 millones de generaciones (filocronología bayesiana) una vez identificados los principales clados en la filogenia bayesiana. Se calibraron cinco nodos con información de las edades confiables de registros fósiles para la familia y el orden, los cuales corresponden al orden Sapindales $74 \pm 9,5$ ma (Knobloch y Mai 1986), la familia Anacardiaceae 60 ± 5 ma (Muller 1984), la edad del nodo correspondiente a *Rhus-Pistacia* 44 ± 1 ma (Manchester 1994), el género *Mangifera* $33,9 \pm 1,5$ ma (Mehrotra et al. 1998) y el género *Loxopterygium* $10,2 \pm 1,5$ ma (Burnham y Carranco 2004). Las herramientas diagnósticas para el análisis en BEAST fueron la gráfica “número de generación vs. Verosimilitud” y el valor ESS (*Effective Sampling Size* o Tamaño efectivo de muestreo) en el programa Tracer (Rambaut y Drummond 2009). Se realizó un *burn-in* del 10% de los árboles iniciales en todos los casos en el programa Treeannotator para obtener cada árbol de filocronología bayesiana.

6. Resultados

Para el desarrollo del presente estudio se muestrearon individuos de *Orthopterygium huaucui* en localidades ubicadas en los departamentos de Lima, Ica y Huancavelica (a 16km del límite con la provincia de Pisco en Ica) con la finalidad de realizar un estudio poblacional. Para la determinación de la posición evolutiva de *Orthopterygium huaucui* dentro de la familia Anacardiaceae se incluyeron algunas especies de la familia, para lograr estos objetivos se emplearon dos marcadores plastidiales (TrnL, Rps16) y uno nuclear (ITS).

6.1. Diversidad Genética

Se logró una correcta amplificación en gran parte de los individuos, tal como revelaron los alineamientos de a pares con la herramienta BLAST de la base de datos GenBank, sin embargo, no se detectó variación intraespecífica para ninguno de los marcadores empleados (TrnL, Rps16, ITS), esto es, existe un solo tipo de secuencia de cada marcador en todos los individuos. No obstante, la identificación de una delección de 1pb en algunas secuencias del marcador Rps16 fue descartada por tratarse de un error observado en los cromatogramas.

6.2. Distancias genéticas entre *Orthopterygium* y otras Anacardiaceae

Todas las distancias fueron obtenidas mediante el modelo de Kimura 2 parámetros y calculadas con las secuencias plastidiales independientes y concatenadas con la finalidad de comparar el aporte informativo de cada marcador. Tanto para el marcador TrnL (100 secuencias, Tabla 4) como para los datos concatenados (55 secuencias, Tabla 7), la especie más similar a *O. huaucui* es *Amphipterygium adstringens* (género con el que conformó por muchos años la familia Julianiaceae), siendo las distancias como se detallan a continuación: $0,0049 \pm 0,0033$ y $0,0073 \pm 0,0024$ respectivamente; mientras que el marcador Rps16 (71 secuencias, Tabla 5) identifica a *Cotinus obovatus*, nativa del sudeste de Estados Unidos, como especie más similar con un valor de $0,0056 \pm 0,0031$, Por otro lado, el marcador nuclear ITS identifica a *Loxostylis alata*, nativa del sur de África, como la especie más próxima, con una distancia de $0,1231 \pm 0,0158$ (Tabla 6),

Tabla 4. Distancias genéticas calculadas con el marcador TrnL entre *O. huaucui* y otras especies de Anacardiaceae. Modelo de Kimura 2 parámetros. Los asteriscos corresponden a muestras obtenidas en este estudio.

Especie	Distancia	Desviación estandar
<i>Amphipterygium adstringens</i>	0,0049	0,0033
<i>Thyrsodium puberulum</i>	0,0051	0,0035
<i>Bonetiella anomala</i>	0,0074	0,0040
<i>Lithrea molleoides</i>	0,0074	0,0042
<i>Lithrea ternifolia</i>	0,0074	0,0042
<i>Loxostylis alata</i>	0,0074	0,0042
<i>Mauria simplicifolia</i>	0,0074	0,0042
<i>Pachycormus discolor</i>	0,0074	0,0041
<i>Pseudosmodingium andrieu</i>	0,0074	0,0042
<i>Smodingium argutum</i>	0,0074	0,0042
<i>Malosma laurina</i>	0,0074	0,0041
<i>Mauria heterophylla</i>	0,0080	0,0044
<i>Ochoterena colombiana</i>	0,0099	0,0049
<i>Searsia undulate</i>	0,0099	0,0049
<i>Searsia pyroides</i>	0,0099	0,0049
<i>Toxicodendron succedaneum</i>	0,0099	0,0047
<i>Toxicodendron sylvestre</i>	0,0099	0,0047
<i>Pistacia texana*</i>	0,0099	0,0046
<i>Abrahamia ditimena</i>	0,0099	0,0051
<i>Abrahamia sericea</i>	0,0099	0,0051
<i>Astronium urundeuva</i>	0,0099	0,0047
<i>Heeria argentea</i>	0,0099	0,0051
<i>Micronychia macrophylla</i>	0,0099	0,0051
<i>Micronychia tsiramiramy</i>	0,0099	0,0051
<i>Astronium balansae</i>	0,0099	0,0047
<i>Pistacia atlantica</i>	0,0099	0,0046
<i>Pistacia chinensis</i>	0,0099	0,0046
<i>Pistacia integerrima</i>	0,0099	0,0046
<i>Pistacia Mexicana</i>	0,0099	0,0046
<i>Pistacia vera</i>	0,0099	0,0046
<i>Schinopsis balansae</i>	0,0099	0,0048
<i>Schinopsis lorentzii</i>	0,0099	0,0048
<i>Semecarpus gigantifolia</i>	0,0099	0,0048
<i>Toxicodendron trichocarpum</i>	0,0099	0,0048
<i>Apterokarpos gardneri</i>	0,0099	0,0050
<i>Hermogenodendron concinnum</i>	0,0102	0,0049
<i>Schinus molle*</i>	0,0124	0,0053
<i>Rhus erosa</i>	0,0124	0,0054
<i>Schinus areira</i>	0,0124	0,0053
<i>Schinus molle</i>	0,0124	0,0053
<i>Cotinus coggygria</i>	0,0124	0,0053

<i>Protorhus longifolia</i>	0,0124	0,0054
<i>Rhus taratana</i>	0,0124	0,0056
<i>Toxicodendron rydbergii</i>	0,0124	0,0053
<i>Abrahamia buxifolia</i>	0,0124	0,0056
<i>Faguetia falcate</i>	0,0124	0,0054
<i>Trichoscypha acuminata</i>	0,0124	0,0055
<i>Ozoroa insignis</i>	0,0124	0,0054
<i>Pistacia khinjuk</i>	0,0124	0,0053
<i>Rhus thouarsii</i>	0,0125	0,0057
<i>Actinocheita filicina</i>	0,0149	0,0058
<i>Cotinus obovatus</i>	0,0149	0,0058
<i>Mosquitoxylum jamaicense</i>	0,0149	0,0058
<i>Ozoroa obovata</i>	0,0149	0,0059
<i>Toxicodendron radicans</i>	0,0149	0,0058
<i>Cardenasiodendron brachypterum*</i>	0,0149	0,0062
<i>Rhus copallina</i>	0,0149	0,0059
<i>Metopium brownie</i>	0,0149	0,0060
<i>Rhus aromatic</i>	0,0149	0,0058
<i>Rhus lanceolata</i>	0,0149	0,0059
<i>Rhus typhina</i>	0,0149	0,0059
<i>Semecarpus anacardium</i>	0,0149	0,0061
<i>Sorindeia madagascariensis</i>	0,0149	0,0059
<i>Trichoscypha ulugurensis</i>	0,0149	0,0060
<i>Rhus perrieri</i>	0,0150	0,0062
<i>Abrahamia littoralis</i>	0,0150	0,0062
<i>Abrahamia thouvenotii</i>	0,0150	0,0062
<i>Comocladia engleriana</i>	0,0151	0,0060
<i>Schinus terebinthifolius*</i>	0,0152	0,0058
<i>Mangifera indica</i>	0,0174	0,0068
<i>Rhus chinensis</i>	0,0174	0,0063
<i>Rhus trilobata</i>	0,0174	0,0065
<i>Loxopterygium huasango*</i>	0,0176	0,0065
<i>Mangifera camptosperma</i>	0,0198	0,0085
<i>Bouea macrophylla</i>	0,0199	0,0072
<i>Gluta wallichii</i>	0,0199	0,0070
<i>Loxopterygium grisebachii*</i>	0,0201	0,0069
<i>Loxopterygium grisebachii</i>	0,0201	0,0069
<i>Loxopterygium huasango</i>	0,0253	0,0079
<i>Anacardium occidentale</i>	0,0328	0,0087
<i>Fegimanra Africana</i>	0,0352	0,0093
<i>Harpephyllum caffrum</i>	0,0457	0,0101
<i>Lannea rivae</i>	0,0457	0,0102
<i>Pegia nitida</i>	0,0457	0,0100
<i>Tapirira obtuse</i>	0,0484	0,0105
<i>Lannea welwitschii</i>	0,0491	0,0105
<i>Cyrtocarpa edulis</i>	0,0509	0,0108
<i>Cyrtocarpa procera</i>	0,0509	0,0108
<i>Choerospondias axillaris</i>	0,0510	0,0108

<i>Lanea schweinfurthii</i>	0,0510	0,0108
<i>Tapirira bethanniana</i>	0,0511	0,0106
<i>Pleiogynium timoriense</i>	0,0535	0,0110
<i>Poupartiosis spondiocarpus</i>	0,0537	0,0114
<i>Antrocaryon amazonicum</i>	0,0537	0,0112
<i>Operculicarya decaryi</i>	0,0562	0,0113
<i>Poupartia minor</i>	0,0562	0,0113
<i>Spondias mombin</i>	0,0570	0,0119
<i>Crepidospermum prancei</i>	0,0724	0,0127
<i>Bursera microphylla</i>	0,0756	0,0135

Tabla 5. Distancias genéticas calculadas con el marcador Rps16 entre *O. huaucui* y otras especies de Anacardiaceae. Modelo de Kimura 2 parámetros. Los asteriscos corresponden a muestras obtenidas en este estudio.

Espece	Distancia	Desviacion estandar
<i>Rhus virens</i>	0,0056	0,0031
<i>Pachycormus discolor</i>	0,0075	0,0036
<i>Rhus aromatica</i>	0,0093	0,0040
<i>Astronium urundeuva</i>	0,0093	0,0039
<i>Astronium fraxinifolium</i>	0,0094	0,0039
<i>Cotinus obovatus</i>	0,0094	0,0040
<i>Mosquitoxylum jamaicense</i>	0,0095	0,0039
<i>Loxopterygium huasango *</i>	0,0112	0,0044
<i>Amphipterygium adstringens</i>	0,0112	0,0044
<i>Apterotharpos gardneri</i>	0,0112	0,0045
<i>Pistacia texana *</i>	0,0112	0,0044
<i>Pistacia Mexicana</i>	0,0112	0,0044
<i>Rhus trilobata</i>	0,0130	0,0050
<i>Pistacia chinensis</i>	0,0130	0,0047
<i>Bonetiella anomala</i>	0,0131	0,0050
<i>Schinopsis brasiliensis</i>	0,0131	0,0047
<i>Rhus chinensis</i>	0,0131	0,0049
<i>Thyrsodium spruceanum</i>	0,0131	0,0048
<i>Faguetia falcate</i>	0,0134	0,0048
<i>Cardenasiodendron brachypterum *</i>	0,0149	0,0051
<i>Loxopterygium grisebachii *</i>	0,0149	0,0052
<i>Micronychia tsiramiramy</i>	0,0149	0,0052
<i>Micronychia macrophylla</i>	0,0168	0,0055
<i>Sorindeia madagascariensis</i>	0,0168	0,0053
<i>Loxostylis alata</i>	0,0168	0,0056
<i>Smodingium argutum</i>	0,0168	0,0054
<i>Heeria argentea</i>	0,0168	0,0054
<i>Searsia undulate</i>	0,0168	0,0058
<i>Loxopterygium sagotii</i>	0,0169	0,0055

<i>Abrahamia nitida</i>	0,0170	0,0056
<i>Rhus perrieri</i>	0,0187	0,0057
<i>Rhus thouarsii</i>	0,0187	0,0057
<i>Protorhus longifolia</i>	0,0187	0,0058
<i>Rhus lanceolata</i>	0,0187	0,0059
<i>Rhus erosa</i>	0,0188	0,0059
<i>Schinus molle</i>	0,0188	0,0059
<i>Toxicodendron radicans</i>	0,0188	0,0060
<i>Rhus copallina</i>	0,0206	0,0061
<i>Rhus taratana</i>	0,0206	0,0062
<i>Schinus molle</i> *	0,0207	0,0062
<i>Rhus ambigua</i>	0,0207	0,0064
<i>Schinus areira</i>	0,0207	0,0062
<i>Rhus typhina</i>	0,0208	0,0064
<i>Metopium brownie</i>	0,0225	0,0065
<i>Schinus terebinthifolius</i> *	0,0226	0,0064
<i>Toxicodendron vernicifluum</i>	0,0236	0,0066
<i>Semecarpus anacardium</i>	0,0264	0,0068
<i>Bouea macrophylla</i>	0,0301	0,0072
<i>Comocladia dodonaea</i>	0,0301	0,0076
<i>Mangifera andamanica</i>	0,0320	0,0076
<i>Mangifera camptosperma</i>	0,0321	0,0076
<i>Gluta wallichii</i>	0,0321	0,0075
<i>Gluta renghas</i>	0,0322	0,0075
<i>Mangifera griffithii</i>	0,0340	0,0078
<i>Mangifera indica</i>	0,0340	0,0078
<i>Mangifera zeylanica</i>	0,0340	0,0078
<i>Mangifera odorata</i>	0,0340	0,0078
<i>Fegimanra Africana</i>	0,0398	0,0085
<i>Harpephyllum caffrum</i>	0,0419	0,0088
<i>Cyrtocarpa procera</i>	0,0437	0,0090
<i>Sclerocarya birrea</i>	0,0437	0,0090
<i>Tapirira obtuse</i>	0,0457	0,0092
<i>Lannea schweinfurthii</i>	0,0459	0,0091
<i>Pleiogynium timoriense</i>	0,0460	0,0092
<i>Tapirira bethanniana</i>	0,0476	0,0094
<i>Antrocaryon amazonicum</i>	0,0481	0,0097
<i>Operculicarya decaryi</i>	0,0499	0,0094
<i>Choerospondias axillaris</i>	0,0512	0,0106
<i>Bursera fagaroides</i>	0,0791	0,0122
<i>Bursera microphylla</i>	0,0810	0,0122

Tabla 6. Distancias genéticas calculadas con el marcador ITS entre *O. huaucai* y otras especies de Anacardiaceae. Modelo de Kimura 2 parámetros. Los asteriscos corresponden a muestras obtenidas en este estudio.

Especie	Distancia	Desviación estandar
<i>Loxostylis alata</i>	0,1231	0,0158
<i>Searsia lucida</i>	0,1235	0,0153
<i>Actinocheita filicina</i>	0,1242	0,0159
<i>Rhus sandwicensis</i>	0,1243	0,0152
<i>Rhus chinensis</i>	0,1262	0,0154
<i>Searsia dentata</i>	0,1268	0,0170
<i>Rhus glabra</i>	0,1279	0,0153
<i>Rhus taitensis</i>	0,1281	0,0152
<i>Rhus coriaria</i>	0,1283	0,0156
<i>Rhus michauxii</i>	0,1283	0,0157
<i>Rhus rubifolia</i>	0,1283	0,0158
<i>Rhus microphylla</i>	0,1287	0,0159
<i>Rhus typhina</i>	0,1289	0,0152
<i>Searsia undulata</i>	0,1295	0,0153
<i>Schinus areira</i>	0,1298	0,0168
<i>Rhus trilobata</i>	0,1300	0,0153
<i>Rhus potaninii</i>	0,1302	0,0152
<i>Rhus punjabensis</i>	0,1302	0,0152
<i>Rhus ambigua</i>	0,1307	0,0158
<i>Rhus aromatica</i>	0,1310	0,0155
<i>Pistacia integerrima</i>	0,1312	0,0163
<i>Pistacia mexicana</i>	0,1329	0,0152
<i>Pistacia chinensis</i>	0,1331	0,0160
<i>Schinopsis brasiliensis</i>	0,1334	0,0164
<i>Searsia quartiniana</i>	0,1334	0,0155
<i>Toxicodendron rydbergii</i>	0,1345	0,0160
<i>Rhus taratana</i>	0,1346	0,0153
<i>Pistacia vera</i>	0,1349	0,0165
<i>Searsia ciliata</i>	0,1352	0,0156
<i>Astronium urundeuva</i>	0,1353	0,0159
<i>Pistacia terebinthus</i>	0,1354	0,0165
<i>Rhus erosa</i>	0,1357	0,0158
<i>Rhus pachyrrhachis</i>	0,1361	0,0164
<i>Rhus virens</i>	0,1363	0,0163
<i>Rhus choriophylla</i>	0,1365	0,0162
<i>Rhus schiedeana</i>	0,1365	0,0163
<i>Rhus ovate</i>	0,1368	0,0162
<i>Pistacia atlantica</i>	0,1370	0,0164
<i>Searsia leptodictya</i>	0,1372	0,0160
<i>Pistacia texana</i>	0,1379	0,0160
<i>Searsia lancea</i>	0,1386	0,0158
<i>Toxicodendron diversilobum</i>	0,1393	0,0164
<i>Toxicodendron grandiflorum</i>	0,1408	0,0164
<i>Rhus integrifolia</i>	0,1410	0,0165

<i>Searsia pyroides</i>	0,1415	0,0160
<i>Faguetia falcate</i>	0,1415	0,0160
<i>Schinus terebinthifolius</i>	0,1420	0,0168
<i>Schinus molle</i>	0,1430	0,0165
<i>Toxicodendron radicans</i>	0,1430	0,0164
<i>Pistacia khinjuk</i>	0,1433	0,0170
<i>Micronychia macrophylla</i>	0,1434	0,0168
<i>Toxicodendron trichocarpum</i>	0,1437	0,0167
<i>Toxicodendron hookeri</i>	0,1445	0,0162
<i>Rhus pendulina</i>	0,1445	0,0164
<i>Toxicodendron delavayi</i>	0,1464	0,0165
<i>Toxicodendron yunnanense</i>	0,1466	0,0167
<i>Rhus kearneyi</i>	0,1466	0,0172
<i>Mauria heterophylla</i>	0,1469	0,0175
<i>Pistacia weinmaniifolia</i>	0,1497	0,0173
<i>Rhus thouarsii</i>	0,1517	0,0165
<i>Ozoroa insignis</i>	0,1525	0,0175
<i>Toxicodendron griffithii</i>	0,1530	0,0171
<i>Toxicodendron wallichii</i>	0,1534	0,0168
<i>Toxicodendron fulvum</i>	0,1554	0,0172
<i>Rhus perrieri</i>	0,1558	0,0167
<i>Toxicodendron vernix</i>	0,1559	0,0167
<i>Heeria argentea</i>	0,1560	0,0180
<i>Toxicodendron succedaneum</i>	0,1565	0,0168
<i>Abrahamia ibiyensis</i>	0,1570	0,0166
<i>Thyrsodium puberulum</i>	0,1575	0,0175
<i>Pistacia lentiscus</i>	0,1584	0,0183
<i>Malosma laurina</i>	0,1596	0,0178
<i>Protorhus longifolia</i>	0,1599	0,0184
<i>Abrahamia sericea</i>	0,1639	0,0174
<i>Abrahamia lenticellata</i>	0,1639	0,0173
<i>Sorindeia madagascariensis</i>	0,1640	0,0185
<i>Abrahamia nitida</i>	0,1647	0,0168
<i>Toxicodendron striatum</i>	0,1658	0,0178
<i>Abrahamia ditimena</i>	0,1678	0,0177
<i>Abrahamia elongata</i>	0,1700	0,0179
<i>Abrahamia littoralis</i>	0,1712	0,0179
<i>Abrahamia thouvenotii</i>	0,1724	0,0174
<i>Mangifera indica</i>	0,1734	0,0180
<i>Mangifera oblongifolia</i>	0,1735	0,0177
<i>Abrahamia latifolia</i>	0,1738	0,0187
<i>Mangifera odorata</i>	0,1742	0,0181
<i>Abrahamia viguieri</i>	0,1747	0,0180
<i>Cardenasiodendron brachypterum</i>	0,1758	0,0188
<i>Mangifera gedebe</i>	0,1761	0,0178
<i>Mangifera sylvatica</i>	0,1777	0,0185
<i>Mangifera laurina</i>	0,1803	0,0183
<i>Mangifera macrocarpa</i>	0,1821	0,0188
<i>Mangifera camptosperma</i>	0,1841	0,0185
<i>Mangifera cochinchinensis</i>	0,1842	0,0185
<i>Mangifera foetida</i>	0,1850	0,0186
<i>Mangifera flava</i>	0,1877	0,0190

<i>Trichoscypha acuminata</i>	0,1880	0,0198
<i>Mangifera zeylanica</i>	0,1893	0,0190
<i>Loxopterygium sagotii</i>	0,1896	0,0208
<i>Mangifera griffithii</i>	0,1907	0,0188
<i>Mangifera gracilipes</i>	0,1952	0,0196
<i>Mangifera pentandra</i>	0,1952	0,0196
<i>Mangifera caloneura</i>	0,1957	0,0196
<i>Toxicodendron sylvestre</i>	0,1997	0,0206
<i>Loxopterygium grisebachii</i>	0,2049	0,0204
<i>Tapirira guianensis</i>	0,2133	0,0214
<i>Bouea macrophylla</i>	0,2159	0,0207
<i>Operculicarya decaryi</i>	0,2249	0,0218
<i>Spondias mombin</i>	0,2334	0,0223
<i>Trichoscypha ulugurensis</i>	0,2380	0,0336
<i>Anacardium occidentale</i>	0,2465	0,0226
<i>Poupartia minor</i>	0,2493	0,0230
<i>Poupartiopsis spondiocarpus</i>	0,2530	0,0237
<i>Loxopterygium huasango</i>	0,2706	0,0264
<i>Bursera microphylla</i>	0,2971	0,0255

Tabla 7. Distancias genéticas calculadas con los datos concatenados de los marcadores TrnL y Rps16 entre *O. huacui* y otras especies de Anacardiaceae. Modelo de Kimura 2 parámetros. Los asteriscos corresponden a muestras obtenidas en este estudio.

Especie	Distancia	Desviación estandar
<i>Amphipterygium adstringens</i>	0,0073	0,0024
<i>Bonetiella anomala</i>	0,0091	0,0028
<i>Astronium urundeuva</i>	0,0091	0,0029
<i>Cotinus obovatus</i>	0,0100	0,0030
<i>Pistacia chinensis</i>	0,0100	0,0031
<i>Rhus aromatic</i>	0,0100	0,0029
<i>Mosquitoxylum jamaicense</i>	0,0101	0,0031
<i>Loxostylis alata</i>	0,0109	0,0031
<i>Apterokarpos gardneri</i>	0,0109	0,0031
<i>Pistacia mexicana</i>	0,0109	0,0032
<i>Pistacia texana*</i>	0,0109	0,0032
<i>Smodingium argutum</i>	0,0119	0,0032
<i>Faguetia falcata</i>	0,0120	0,0033
<i>Rhus trilobata</i>	0,0137	0,0036
<i>Micronychia macrophylla</i>	0,0137	0,0035
<i>Searsia undulate</i>	0,0137	0,0037
<i>Micronychia tsiramiramy</i>	0,0138	0,0037
<i>Loxopterygium huasango*</i>	0,0138	0,0037
<i>Protorhus longifolia</i>	0,0146	0,0036
<i>Heeria argentea</i>	0,0146	0,0037
<i>Cardenasiodendron brachypterum</i>	0,0146	0,0034

<i>Sorindeia madagascariensis</i>	0,0146	0,0038
<i>Rhus chinensis</i>	0,0146	0,0034
<i>Rhus thouarsii</i>	0,0155	0,0036
<i>Schinus molle</i>	0,0156	0,0038
<i>Rhus perrieri</i>	0,0165	0,0037
<i>Rhus taratana</i>	0,0165	0,0037
<i>Rhus lanceolata</i>	0,0165	0,0037
<i>Loxopterygium grisebachii*</i>	0,0165	0,0040
<i>Rhus erosa</i>	0,0165	0,0039
<i>Rhus typhina</i>	0,0166	0,0038
<i>Rhus copallina</i>	0,0174	0,0040
<i>Toxicodendron radicans</i>	0,0174	0,0038
<i>Schinus molle*</i>	0,0174	0,0040
<i>Schinus areira</i>	0,0174	0,0040
<i>Metopium brownie</i>	0,0193	0,0039
<i>Schinus terebinthifolius*</i>	0,0202	0,0044
<i>Semecarpus anacardium</i>	0,0211	0,0041
<i>Bouea macrophylla</i>	0,0267	0,0050
<i>Mangifera indica</i>	0,0286	0,0052
<i>Mangifera camptosperma</i>	0,0294	0,0055
<i>Gluta wallichii</i>	0,0314	0,0053
<i>Fegimanra Africana</i>	0,0409	0,0061
<i>Harpephyllum caffrum</i>	0,0467	0,0065
<i>Cyrtocarpa procera</i>	0,0476	0,0067
<i>Tapirira obtuse</i>	0,0487	0,0065
<i>Lannea schweinfurthii</i>	0,0496	0,0067
<i>Pleiogynium timoriense</i>	0,0506	0,0068
<i>Tapirira bethanniana</i>	0,0506	0,0067
<i>Choerospondias axillaris</i>	0,0509	0,0069
<i>Antrocaryon amazonicum</i>	0,0518	0,0069
<i>Operculicarya decaryi</i>	0,0545	0,0071
<i>Bursera microphylla</i>	0,0854	0,0090

6.3. Distancia genética de Julianiaceae dentro de Anacardiaceae

Dentro de Julianiaceae se halló una distancia de $0,005 \pm 0,0025$ con el marcador TrnL (100 secuencias), mientras que con el marcador Rps16 (71 secuencias) ésta fue de $0,0113 \pm 0,004$, tal diferencia es producto de las 3 substituciones con TrnL en comparación con las 7 substituciones más una inserción de 20pb en Rps16, No se consideran las distancias con el marcador ITS porque no hay secuencias de *Amphipterygium* disponibles en GenBank para el agrupamiento. La distancia genética, hallada luego de concatenar las 2 secuencias plastidiales (55 taxa), dentro del clado Julianiaceae - conformado por los géneros

Orthopterygium y *Amphipterygium* - es de $0,0073 \pm 0,0024$. En comparación con otros linajes y géneros como *Loxopterygium* (*Cardenasiodendron* + *Loxopterygium* + *Apterokarpus*) y *Schinus* (*S. molle* + *S. therebinthifolia* + *S. areira*), estos valores son moderados, mientras que los niveles más bajos detectados corresponden a las dos especies del género *Mangifera* y los niveles más altos a las especies del complejo *Rhus* (*Pistacia* vs. *Rhus*, *Pistacia* vs. *Toxicodendron*, *Rhus* vs. *Toxicodendron*). Ver tabla 8.

Tabla 8. Distancias genéticas dentro de géneros/clados de Anacardiaceae halladas con el marcador TrnL.

Marcador	GENERO/CLADO	Distancia	Desviación estándar
TrnL	<i>Astronium</i>	0	0
TrnL	<i>Lithrea</i>	0	0
TrnL	<i>Tapirira</i>	0,0011	0,00113667
TrnL	<i>Loxopterygium</i>	0,00118484	0,00167561
TrnL	<i>Mangifera</i>	0,00140203	0,00133751
TrnL	<i>Schinus</i>	0,0020457	0,00164125
TrnL	<i>Pistacia</i>	0,00215585	0,00140594
TrnL	<i>Ozoroa</i>	0,00245512	0,00168084
TrnL	<i>Trichoscypha</i>	0,0025	0,00173558
TrnL	<i>Loxopterygium</i>	0,0034973	0,00160611
TrnL	<i>Schinopsis</i>	0,0037	0,00203121
TrnL	<i>Abrahamia</i>	0,00480043	0,00281657
TrnL	Julianiaceae	0,00495168	0,00248255
TrnL	<i>Protorhus – Ozoroa</i>	0,0055152	0,00089525
TrnL	<i>Searsia</i>	0,0062	0,00277313
TrnL	<i>Toxicodendron</i>	0,0070294	0,00351566
TrnL	<i>Lannea</i>	0,00734011	0,00449274
TrnL	<i>Rhus (Africa)</i>	0,01065684	0,0070732
TrnL	<i>Rhus (Norte)</i>	0,01163021	0,00361025
TrnL	<i>Pistacia – Rhus</i>	0,01392616	0,00257774
TrnL	<i>Pistacia – Toxicodendron</i>	0,01402789	0,0016928
TrnL	<i>Cardenasiodendron – Loxopterygium</i>	0,01444793	0,00166376
TrnL	Complejo <i>Rhus</i>	0,01472999	0,00253396
TrnL	Clado <i>Loxopterygium</i>	0,01495194	0,00182927
TrnL	<i>Rhus – Toxicodendron</i>	0,01667447	0,00229646
TrnL	<i>Anacardium – Fegimanra</i>	0,0198	0,00499507
TrnL	<i>Rhus - Rhus erosa</i>	0,02358876	0,00294487

Tabla 9. Distancias genéticas dentro de géneros/clados de Anacardiaceae, halladas con el marcador Rps16.

Marcador	GENERO/CLADO	Distancia	Desviacion estandar
Rps16	<i>Pistacia</i>	0,0010507	0,00090994
Rps16	<i>Astronium</i>	0,00158919	0,00154248
Rps16	<i>Mangifera</i>	0,00362466	0,00317243
Rps16	<i>Loxopterygium</i>	0,00441117	0,00482169
Rps16	<i>Mangifera – Bouea</i>	0,0053291	0,00193901
Rps16	<i>Micronychia</i>	0,00642768	0,0032831
Rps16	<i>Gluta</i>	0,00642833	0,00308515
Rps16	Clado <i>Loxopterygium</i>	0,00724634	0,00585707
Rps16	<i>Schinus</i>	0,00743266	0,00481516
Rps16	<i>Tapirira</i>	0,00799241	0,00320487
Rps16	<i>Rhus</i> (Africa)	0,00845909	0,00458952
Rps16	<i>Loxopterygium</i>	0,0097	0,00585358
Rps16	Julianiaceae	0,01130357	0,00411129
Rps16	<i>Rhus</i> (Norte)	0,01421163	0,0058118
Rps16	<i>Toxicodendron</i>	0,01454203	0,00457948
Rps16	Complejo <i>Rhus</i>	0,01503009	0,00628841
Rps16	<i>Pistacia – Rhus</i>	0,01540961	0,00478195
Rps16	<i>Bouea – Gluta</i>	0,01777951	7,1519E-06
Rps16	<i>Pistacia – Toxicodendron</i>	0,01880432	0,00333387
Rps16	<i>Gluta – Mangifera</i>	0,02024373	0,00130525
Rps16	<i>Fegimanra – Semecarpus</i>	0,03606105	0,0074943

Tabla 10. Distancias genéticas dentro de géneros/clados de Anacardiaceae halladas con datos plastidiales concatenados TrnL - Rps16.

	Genero /clado	Distancia	Desviación estándar
TrnL-Rps16	<i>Mangifera</i>	0,0010	0,0010
TrnL-Rps16	<i>Pistacia</i>	0,00181365	0,00157067
TrnL-Rps16	<i>Loxopterygium</i>	0,00196173	0,00171128
TrnL-Rps16	<i>Tapirira</i>	0,0045	0,0020
TrnL-Rps16	<i>Rhus</i> (Africa)	0,00545252	0,0024097
TrnL-Rps16	<i>Schinus</i>	0,00568402	0,00254122
TrnL-Rps16	Julianiaceae	0,0073	0,0024
TrnL-Rps16	Clado <i>Loxopterygium</i>	0,00769813	0,00362585
TrnL-Rps16	<i>Rhus</i> (Hemisferio Norte)	0,01226933	0,00355953
TrnL-Rps16	<i>Pistacia-Rhus</i>	0,01388925	0,00281213
TrnL-Rps16	<i>Pistacia-Toxicodendron</i>	0,01587302	0,00053817
TrnL-Rps16	<i>Rhus-Toxicodendron</i>	0,02132762	0,00274789

6.4. Relaciones filogenéticas de *Orthopterygium huaucui* en Anacardiaceae

Se obtuvieron árboles bayesianos con los datos independientes (ITS, TrnL, Rps16), con la concatenación de secuencias plastidiales (TrnL - Rps16) y con la concatenación de todas las secuencias (ITS - TrnL - Rps16); mientras que con los métodos de Máxima Parsimonia y Máxima verosimilitud solo árboles con los datos combinados totales (ITS - TrnL - Rps16).

En todas las filogenias se distinguen dos grandes grupos con un máximo grado de soporte estadístico que corresponden a las 2 subfamilias reconocidas, ellas son Spondioideae (resaltada en cuadro celeste) y Anacardioideae (el resto de Anacardiaceae). Dentro de esta última subfamilia se distinguen, en todos los árboles, grupos que corresponden a las tribus Anacardieae (en cuadros amarillos) y Rhoaeae (el resto de cuadros). En las filogenias bayesianas de datos plastidiales (Fig 14) y concatenados (Fig 15) además de la filogenia de máxima verosimilitud (Fig 17) se distinguen dentro de Rhoaeae dos grupos que corresponden a especies “africanas” (en cuadro gris) y “no africanas” (el resto de cuadros). Aunque la especie *Faguetia falcata* es reconocida como integrante de la tribu Rhoaeae y la especie *Semecarpus anacardium* dentro de la tribu Semecarpeae, por motivos prácticos y dado que todas las filogenias las incluyen en la tribu Anacardieae, se considerará a dichas especies dentro de esta última tribu.

La especie en estudio, *Orthopterygium huaucui*, se encuentra en la tribu Rhoaeae de la Subfamilia Anacardioideae y forma un clado, que llamaremos en adelante “Julianiaceae”, junto con su especie hermana *Amphipterygium adstringens*. En las siguientes líneas se presentan los resultados independientes de cada análisis con especial énfasis en la posición *O. huaucui*.

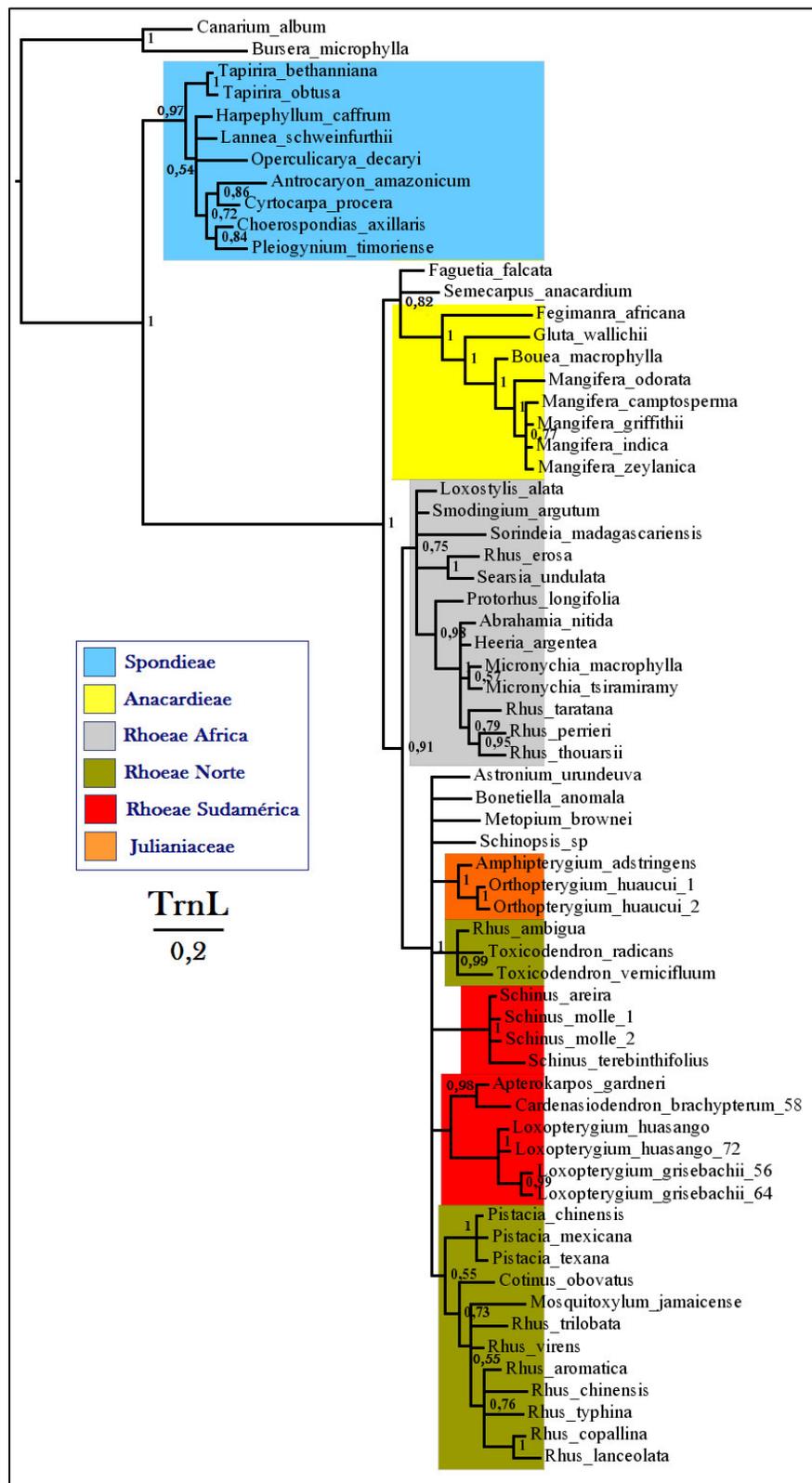


Figura 11. Árbol bayesiano obtenido con el marcador TrnL (consenso al 50%), los números en cada nodo corresponden a la probabilidad posterior. Se emplearon 10 millones de generaciones con muestreos en intervalos de 100 generaciones y un *burn-in* del 25% inicial de árboles generados. La escala representa el número de cambios.

6.4.1. Análisis bayesiano con el marcador plastidial TrnL

La filogenia bayesiana obtenida con el marcador TrnL permite distinguir dos grandes clados en la familia Anacardiaceae con máximo soporte de probabilidad posterior, una correspondiente a la subfamilia Spondioideae (cuya única tribu Spondieae aparece resaltada en el cuadro celeste) y la otra, a la subfamilia Anacardioideae (cuyas tribus y/o clados aparecen resaltadas en cuadros gris, verde, rojo o naranja). Para esta última, se distinguen dos clados que pertenecen a las tribus Anacardieae (en amarillo) y Rhoeeae, con valores de probabilidad posterior de 0,82 y 0,91 respectivamente. Los soportes estadísticos dentro del primero son máximos a excepción del nodo de la politomía para las especies del género *Mangifera*; para el segundo se identifican dos clados, uno de ellos agrupa a especies principalmente africanas (en gris), mientras que el otro agrupa a especies del hemisferio norte (en verde) como *Rhus*, *Pistacia*, *Mosquitoxylum* y *Cotinus* en un clado , y a *Toxicodendron* y *Rhus ambigua* en otro, así como especies sudamericanas (en rojo) en las que se distingue un clado que agrupa a *Loxopterygium*, *Cardenasiodendron* y *Apterokarpos*, además de otro clado para Julianiaceae (en naranja).

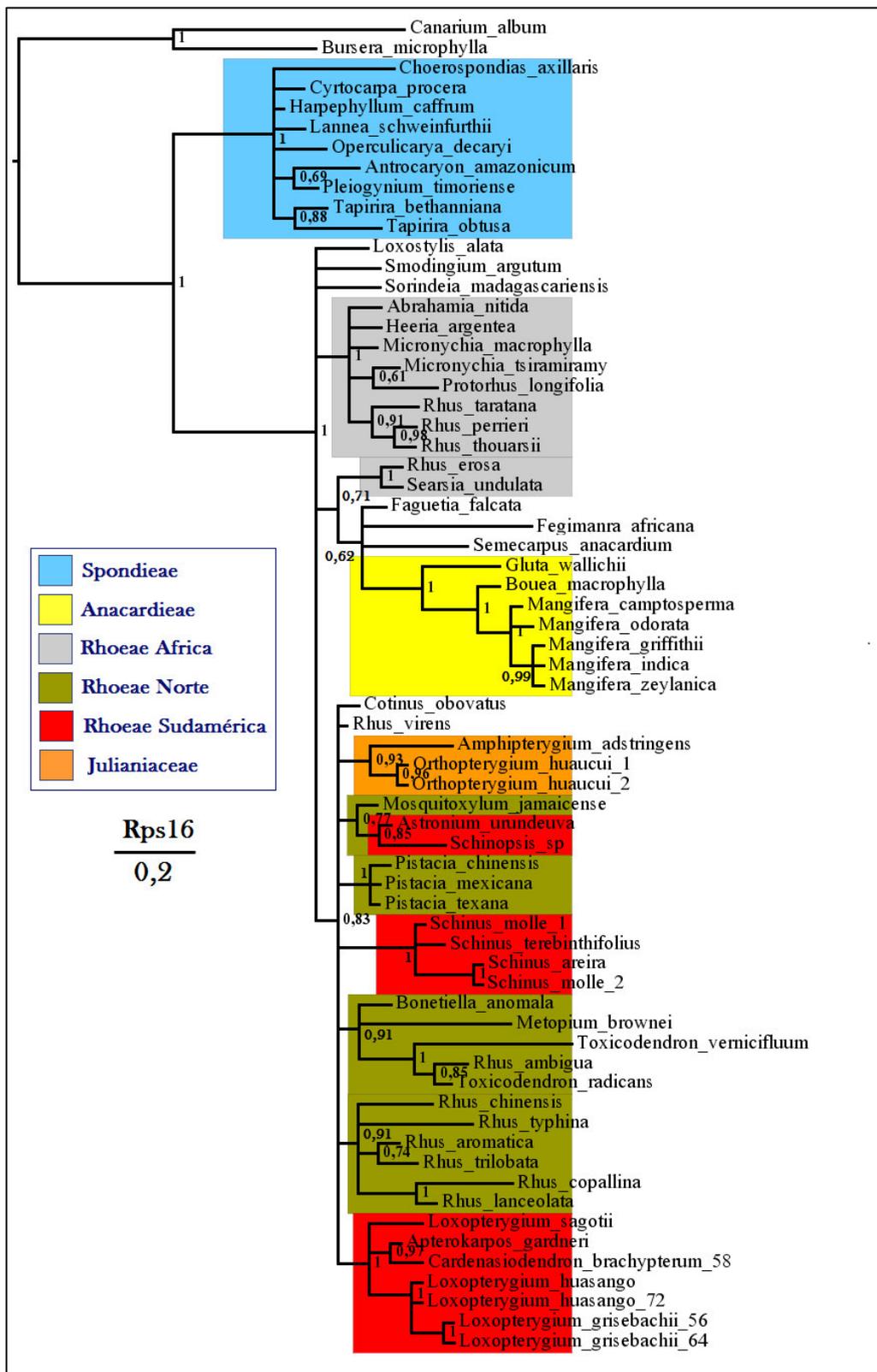


Figura 12. Árbol bayesiano obtenido con el marcador Rps16, los números en cada nodo corresponden a la probabilidad posterior. Se emplearon 10 millones de generaciones con muestreos en intervalos de 100 generaciones y un *burn-in* del 25% inicial de árboles generados. La escala representa el número de cambios.

6.4.2. Análisis bayesiano con el marcador plastidial Rps16

La filogenia bayesiana obtenida con el marcador Rps16 permite distinguir las dos subfamilias ya mencionadas (Spondioideae y Anacardioideae). Tanto el nodo de esta dicotomía como los nodos de cada una de las subfamilias presentan valores máximos de soporte estadístico. Dentro de la segunda, se distinguen también las dos tribus Anacardeiae y Rhoaeae; sin embargo el clado formado por *Rhus erosa* y *Searsia undulata*, dos géneros de Rhoaeae, aparecen como grupo hermano de Anacardieae, generando así polifilia. En la subfamilia Rhoaeae, se distinguen también clados de especies sudamericanas (en rojo), como los clados de *Loxopterygium*, *Schinus* y *Julianiaceae* también identificados con el marcador TrnL; al igual que especies del hemisferio norte (en verde) como *Rhus*, *Pistacia*, *Toxicodendron*, *Bonetiella* y *Metopium*; sin embargo, no se distinguen monofilias en ellos.

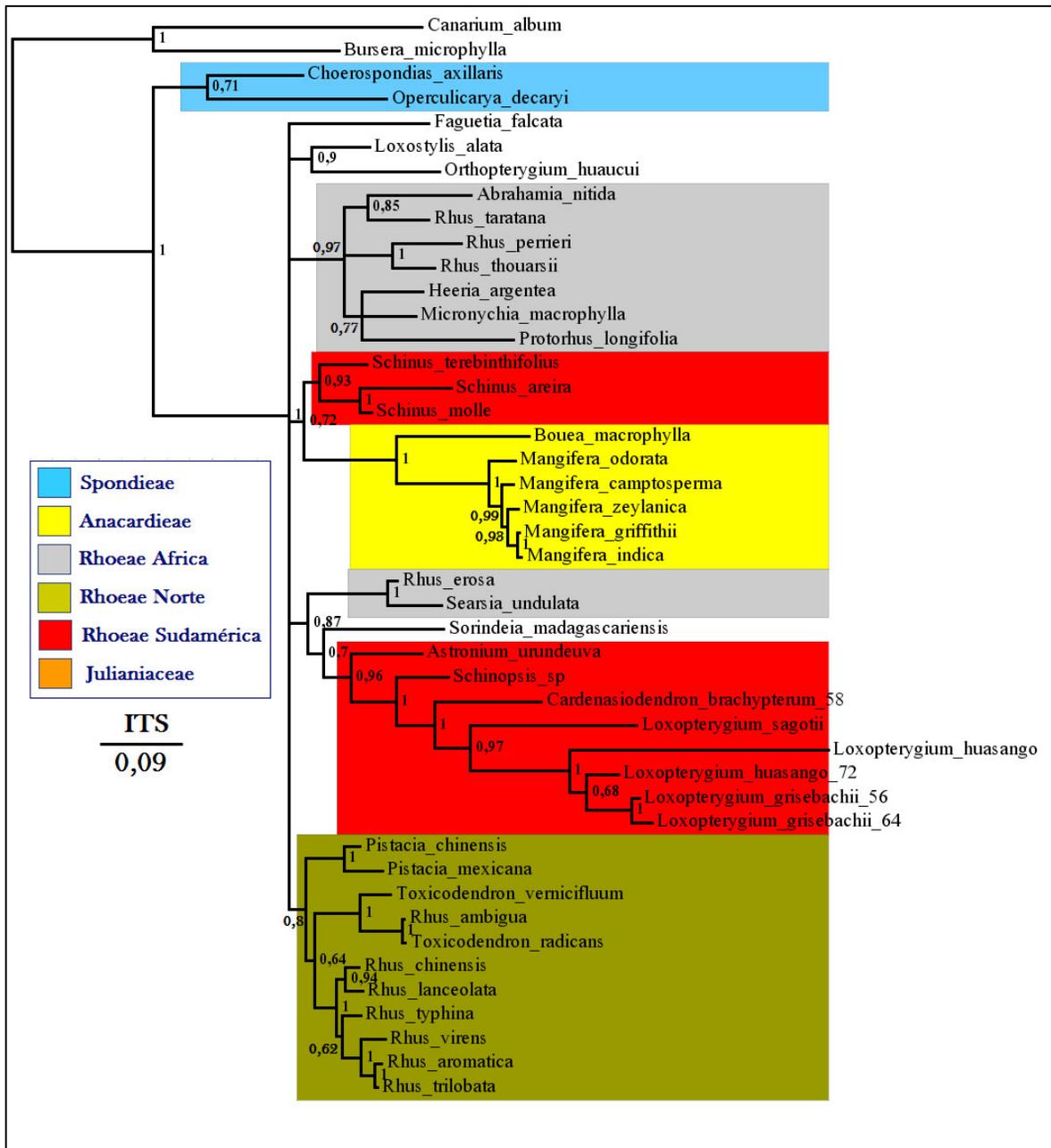


Figura 13. Árbol bayesiano obtenido con el marcador ITS, los números en cada nodo corresponden a la probabilidad posterior. Se emplearon 10 millones de generaciones con muestreos en intervalos de 100 generaciones y un *burn-in* del 25% inicial de árboles generados. La escala representa el número de cambios.

6.4.3. Análisis bayesiano con el marcador nuclear ITS

En la filogenia bayesiana obtenida con el marcador ITS se distinguen las dos subfamilias ya mencionadas (Spondioideae y Anacardioideae) con altos soportes estadísticos. Sin embargo, La subfamilia Anacardioideae no presenta los patrones ya identificados con los marcadores plastidiales. La tribu Anacardieae, que con este marcador solo contiene a *Bouea macrophylla* y cuatro especies del género *Mangifera*, forma un clado con el género *Schinus* con un soporte de 0,72. Por otro lado, las especies de Anacardiaceae africanas aparecen en dos grupos, uno de ellos conformado por *Rhus erosa* y *Searsia undulata* formando un clado con el grupo de especies sudamericanas de la tribu Rhoeeae, y otro conformado por el resto de especies ya agrupadas en las filogenias plastidiales. Este último clado sudamericano conformado por *Astronium*, *Schinopsis*, *Cardenasiodendron* y *Loxopterygium* presenta niveles altos de probabilidad posterior. Otro clado en esta politomía es aquel conformado por las especies del complejo *Rhus* en el que *Toxicodendron* y *Rhus* aparecen como grupos hermanos de *Pistacia*. En esta filogenia, *Orthopterygium* aparece unido a *Loxostylis alata*, una especie sudafricana.

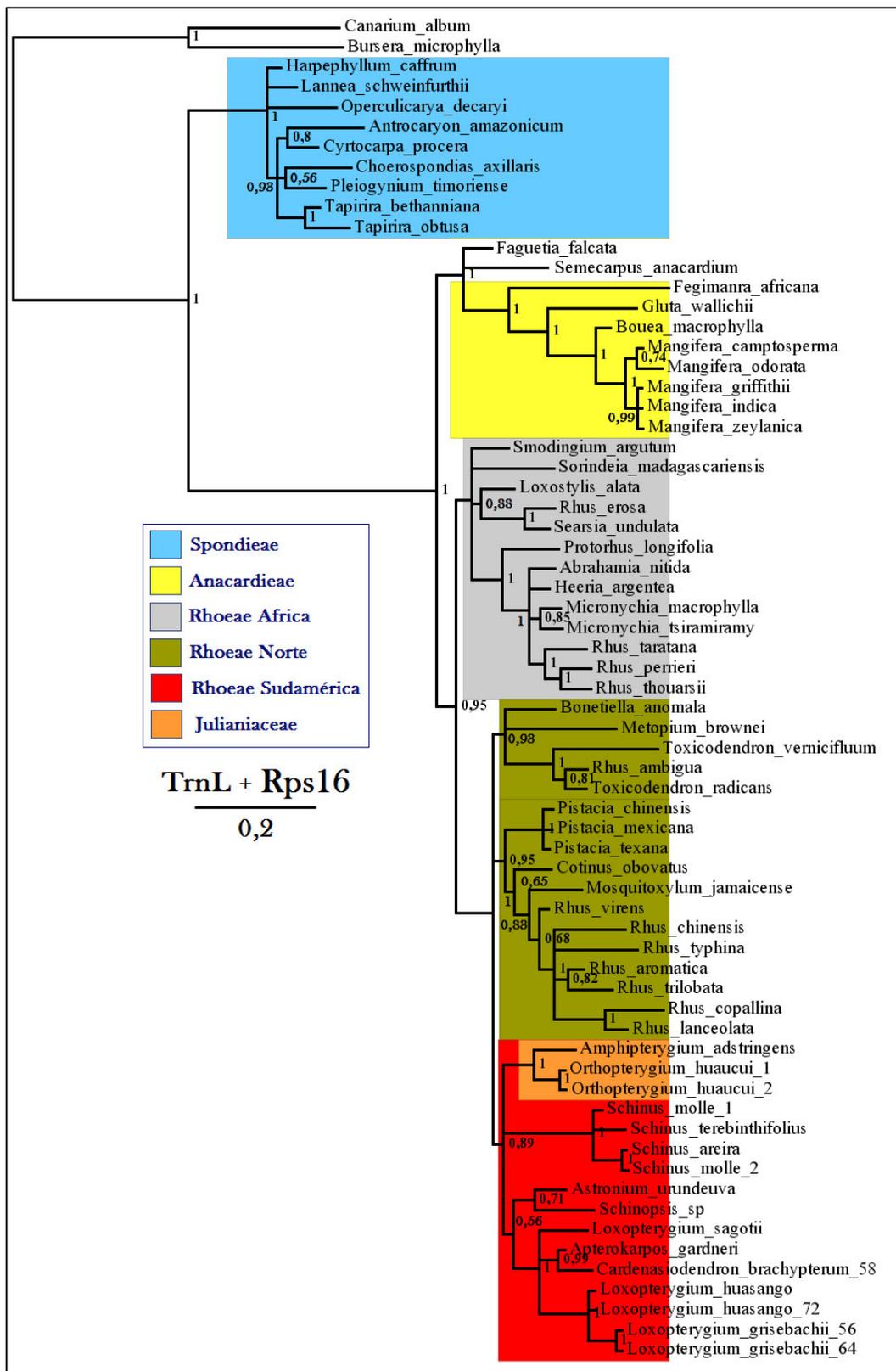


Figura 14. Árbol bayesiano obtenido con la concatenación de las secuencias plastidiales TrnL y Rps16, los números en cada nodo corresponden a la probabilidad posterior. Se emplearon 20 millones de generaciones con muestreos en intervalos de 100 generaciones y un *burn-in* del 25% inicial de árboles generados. La escala representa el número de cambios.

6.4.4. Análisis bayesiano con los datos plastidiales concatenados

La filogenia plastidial resultante de la concatenación de las secuencias TrnL y Rps16, distingue entre las dos subfamilias con soporte máximo de probabilidad posterior. Las relaciones evolutivas dentro de la tribu Spondieae no presentan soportes significativos, mientras que en la subfamilia Anacardioideae, las tribus Anacardieae (en amarillo) y Rhoeae (clado restante) presentan soportes máximos. En Anacardieae, se distinguen claramente las relaciones evolutivas, mientras que en Rhoeae las especies africanas aparecen como hermanas de los grupos del hemisferio norte (en verde) y sudamericanas (en rojo), clado dentro del que se encuentra Julaniaceae (*Orthopterygium* y *Amphipterygium*) con un soporte máximo de probabilidad posterior. Una vez más las especies de *Astronium*, *Schinopsis*, *Cardenasiodendron*, *Apterokarpos* y *Loxopterygium* aparecen agrupadas.

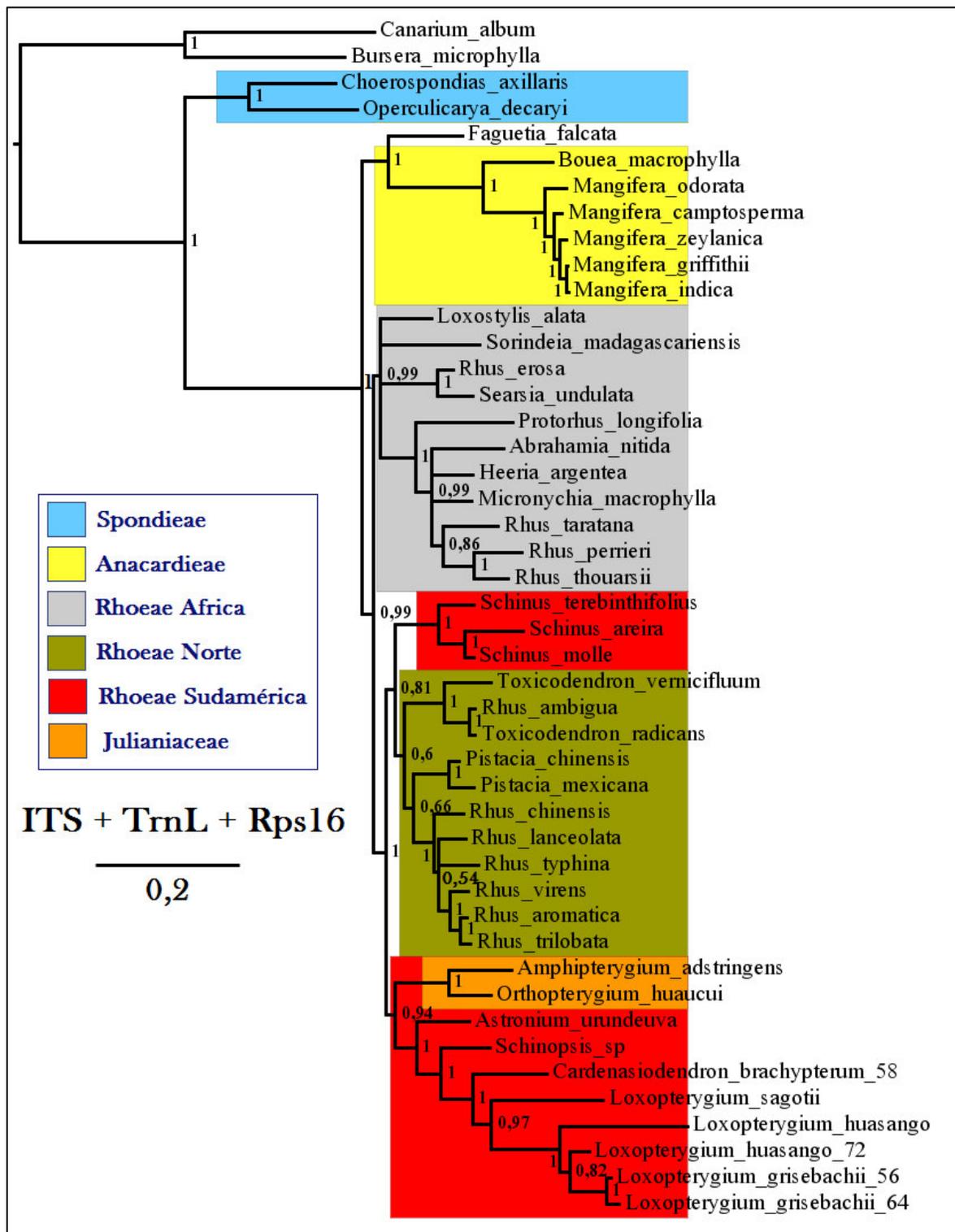


Figura 15. Árbol bayesiano obtenido con la concatenación de los datos plastidiales (TrnL - Rps16) y nuclear (ITS), los números en cada nodo corresponden a la probabilidad posterior. Se emplearon 20 millones de generaciones con muestreos en intervalos de 100 generaciones y un *burn-in* del 25% inicial de árboles generados. La escala representa el número de cambios.

6.4.5. Análisis bayesiano con los datos totales concatenados

La filogenia bayesiana resultante de la concatenación de los tres marcadores (TrnL, Rps16 e ITS) muestra el mismo patrón que la filogenia plastidial: Dos subfamilias soportadas con máxima probabilidad posterior. La tribu Anacardieae presenta también soportes máximos y la tribu Rhoeeae, distingue entre especies "africanas" y "no africanas". En estas últimas sin embargo, aparece *Schinus* como grupo hermano del complejo *Rhus* (siendo *Pistacia* y *Rhus*, grupo hermano de *Toxicodendron*). Finalmente, el clado sudamericano restante está conformado por Julianiaceae (*Orthopterygium* y *Amphipterygium*) como grupo hermano del clado conformado por *Astronium*, *Schinopsis*, *Cardenasiodendron* y *Loxopterygium*.

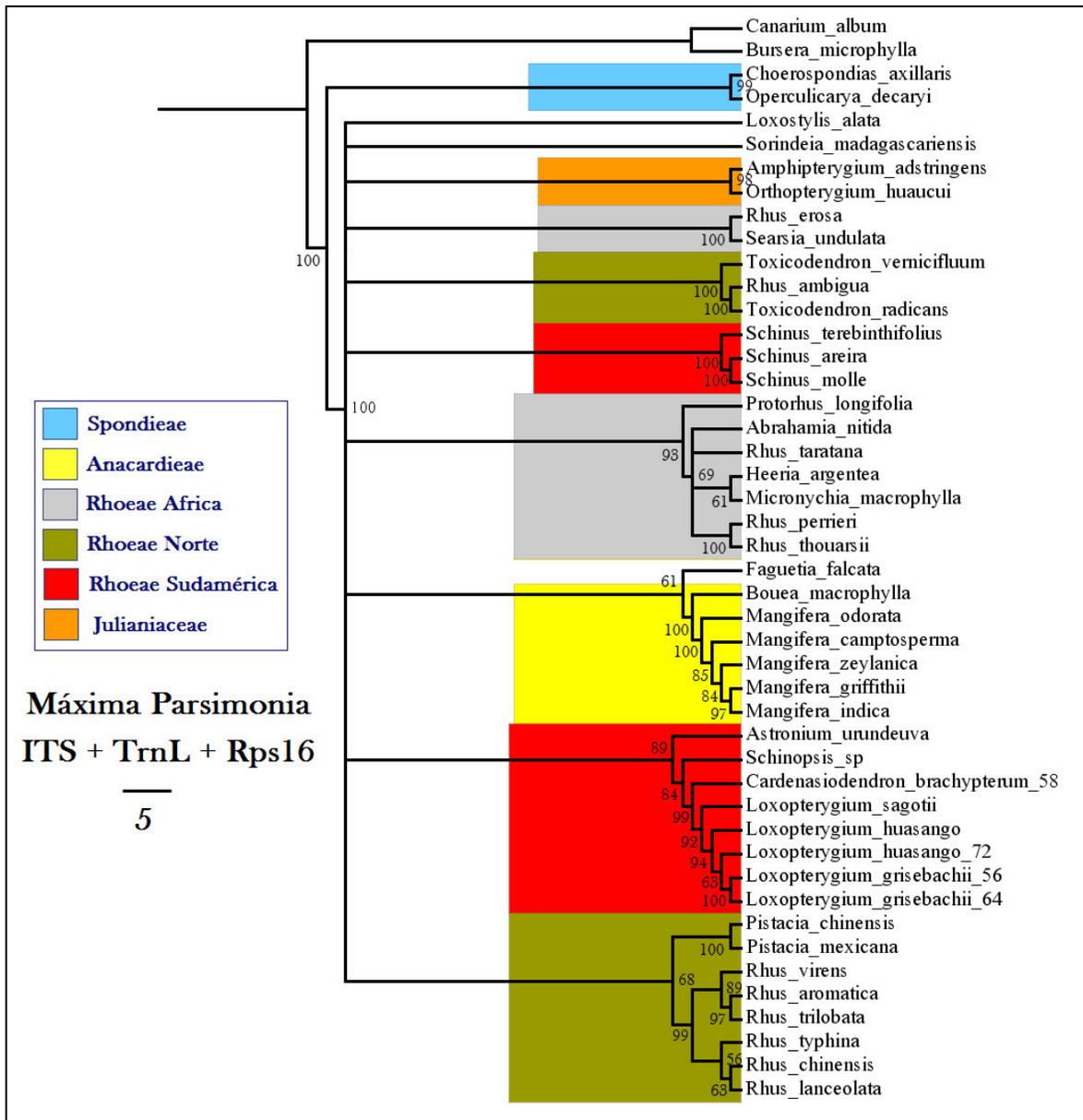


Figura 16. Árbol de máxima parsimonia obtenido con la concatenación de los datos plastidiales (TrnL y Rps16) y nuclear (ITS), los números en cada nodo corresponden al soporte *bootstrap* con 1000 repeticiones. Longitud del árbol = 1795, Índice de consistencia (IC) = 0,4602, Índice de homoplasia (IH) = 0,5398, índice de retención (IR) = 0,6403. La escala corresponde al número de pasos.

6.4.6. Análisis de Máxima Parsimonia con los datos totales concatenados

El árbol de máxima parsimonia resultante de la concatenación de los datos (TrnL - Rps16 - ITS), distingue entre las dos subfamilias y las tribus dentro de Anacardioideae. Se observa un buen soporte en la tribu Anacardieae; sin embargo en la tribu Rhoeeae se muestra una gran politomía. Las especies africanas aparecen en dos grupos, uno de ellos agrupa a *Searsia* y *Rhus erosa*; el otro, con soporte *bootstrap* de 97%, agrupa a *Protorhus*, *Abrahamia*, *Rhus* y *Micronychia*. El complejo *Rhus* también se ve segregado al observarse el clado de *Rhus* y *Pistacia* (con soporte *bootstrap* de 74%) sin incluir a *Toxicodendron*. Por otro lado, aunque las dos especies están agrupadas con soporte máximo, no se establece el vínculo evolutivo de Julianiaceae (en naranja) dentro de la Tribu.

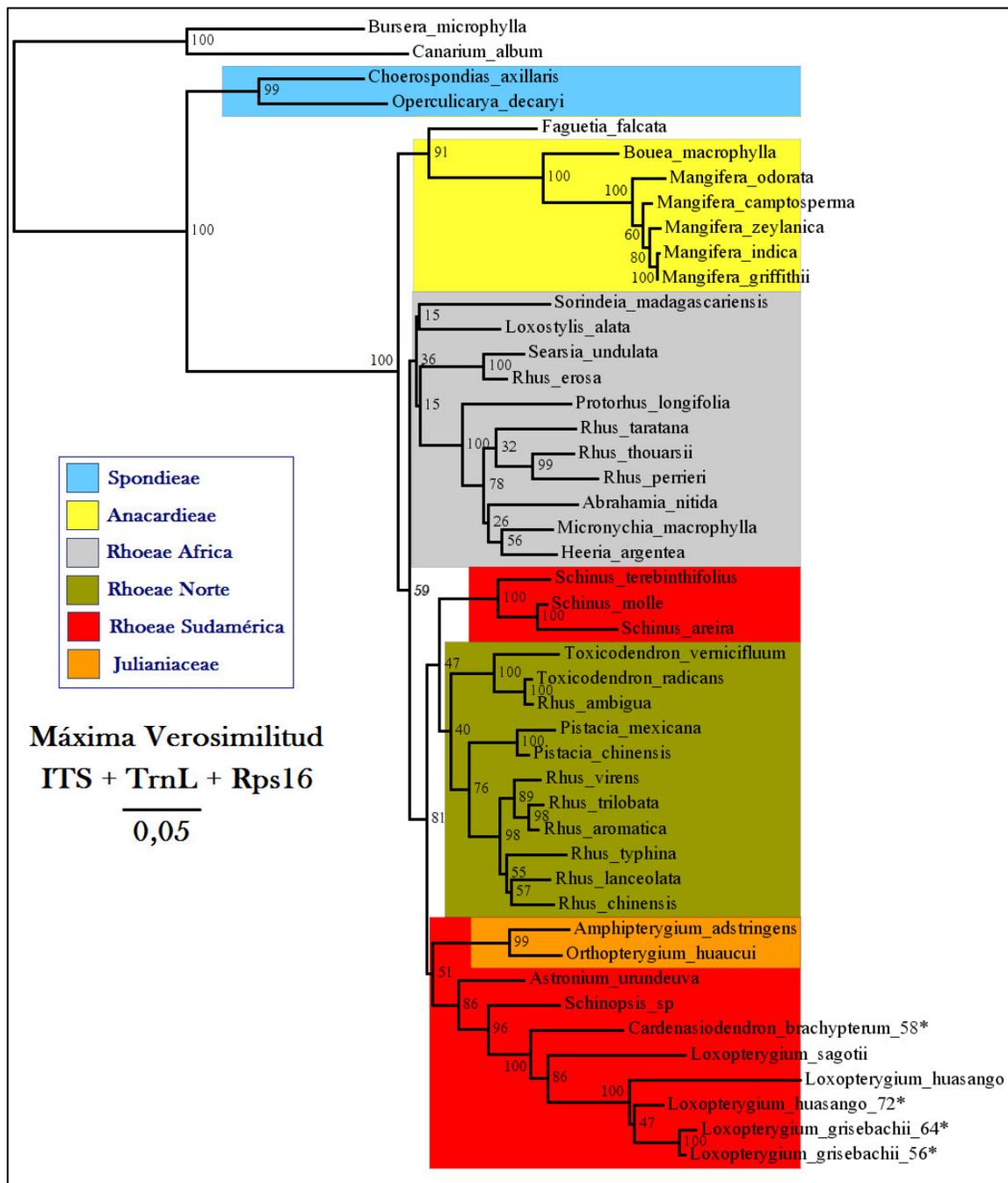


Figura 17. Árbol de máxima verosimilitud obtenido con la concatenación de los datos plastidiales (TrnL - Rps16) y nuclear (ITS), los números en cada nodo corresponden al soporte *bootstrap* con 1000 repeticiones. El valor de verosimilitud del presente árbol es de $-Ln = 14454,5143$. Los parámetros del modelo hallado (GRT + I + G) se especifican a continuación: proporción de bases A=0,3257 C=0,2165 G=0,2000 T=0,2578, números de sitios invariables = 0,3960, parámetro alfa de la distribución gamma= 0,4790, las tasas de cambio = A ↔ C 0,5599, A ↔ G 1,0755, A ↔ T 0,3144, C ↔ G 1,0773, C ↔ T 2,2834, G ↔ T 1,000. La escala corresponde a la distancia calculada.

6.4.7. Análisis de Máxima Verosimilitud con los datos totales concatenados

El árbol de máxima verosimilitud resultante de la concatenación de los datos (TrnL, Rps16 e ITS), distingue entre las dos subfamilias y las tribus dentro de Anacardioideae. En la tribu Rhoeeae se distingue claramente entre especies "africanas" y "no africanas". Julianiaceae, pertenece a este último grupo, y aparece asociado a las otras especies sudamericanas. En el complejo *Rhus* aparecen dos grupos, el primero de *Pistacia* y *Rhus*; el segundo, de *Toxicodendron* y *Rhus ambigua* aunque con un soporte estadístico de solo 47.

6.5. Origen de *Orthopterygium huacui* en la familia Anacardiaceae

Durante el desarrollo del presente estudio, se realizó un análisis de filocronología bayesiana con la finalidad de determinar la ancestría del linaje Julianiaceae y más apropiadamente, el tiempo de divergencia de *Orthopterygium huacui* con una de sus especies más próximas, *Amphipterygium adstringens*. Para ello se emplearon los siguientes datos en conjunto:

- La información filogenética brindada por los análisis mencionados líneas arriba con los marcadores TrnL, Rps16 e ITS.
- Edades confiables de cinco registros fósiles para la familia y el orden (ver página 30).

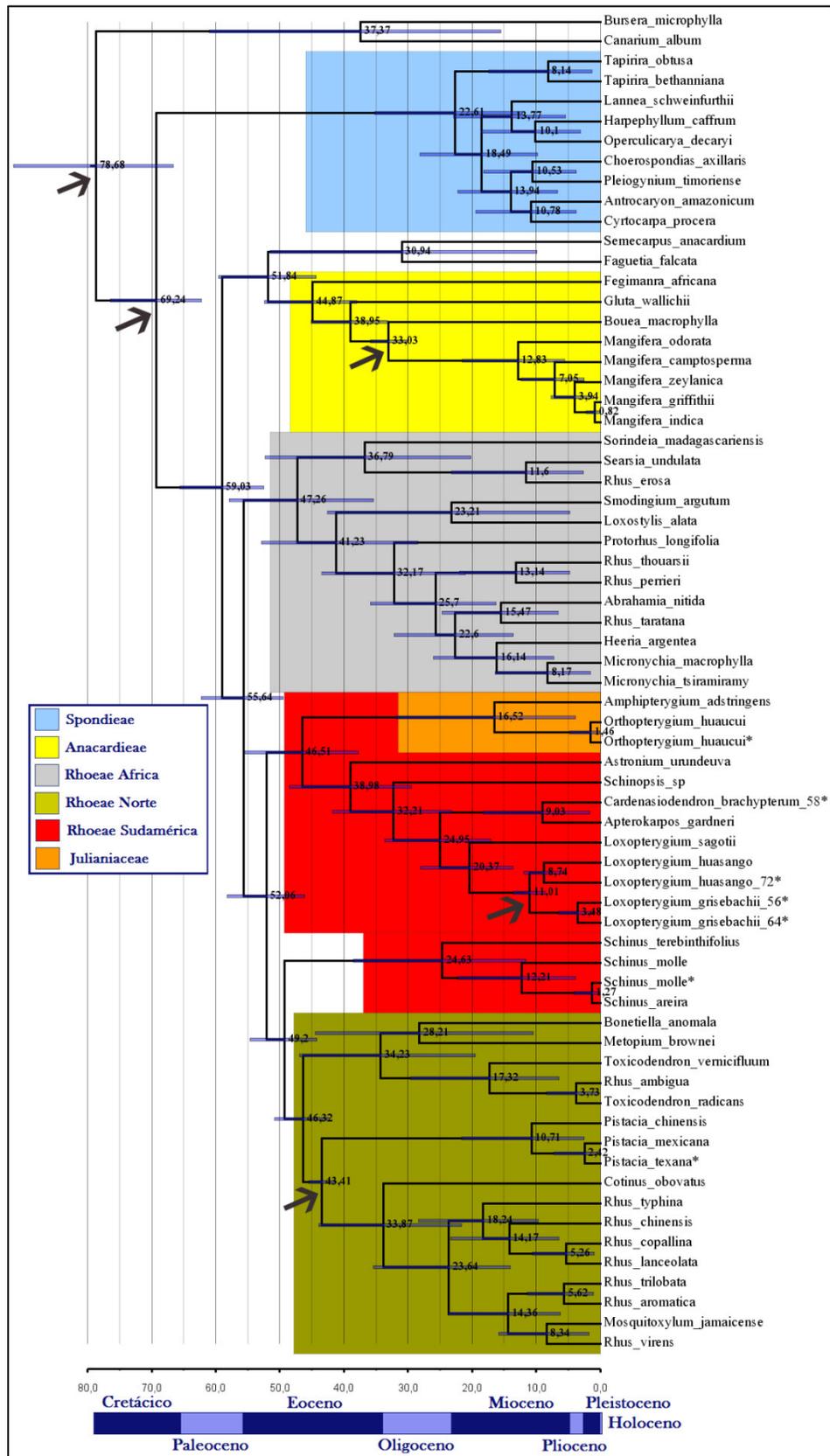


Figura 18. Filocronología bayesiana obtenida con la concatenación de los datos plastidiales (TrnL y Rps16) los números en cada nodo corresponden a las edades estimadas en millones de años y las barras, al 95% de la densidad de probabilidad más alta; las flechas diagonales negras indican los puntos de calibración.



Figura 19. Filocronología bayesiana obtenida con la concatenación de los datos plastidiales (TrnL y Rps16) y nuclear (ITS). Los números en cada nodo corresponden a las edades estimadas en millones de años y las barras, al 95% de la densidad de probabilidad más alta; las flechas diagonales negras indican los puntos de calibración.

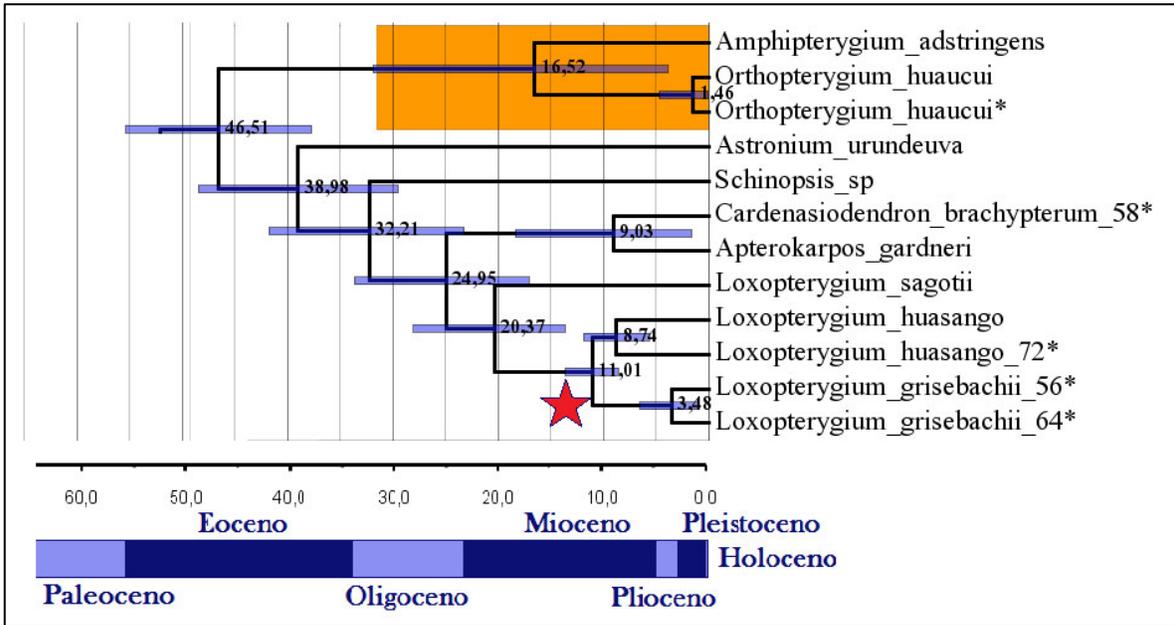


Figura 20. Fragmento de la Filocronología bayesiana obtenida con la concatenación de los datos plastidiales (TrnL y Rps16) correspondiente al clado principalmente sudamericano. La región resaltada en naranja corresponde a Julaniaceae. Los números en cada nodo corresponden a las edades estimadas en millones de años y las barras, al 95% de la densidad de probabilidad más alta. La estrella indica el punto de calibración.

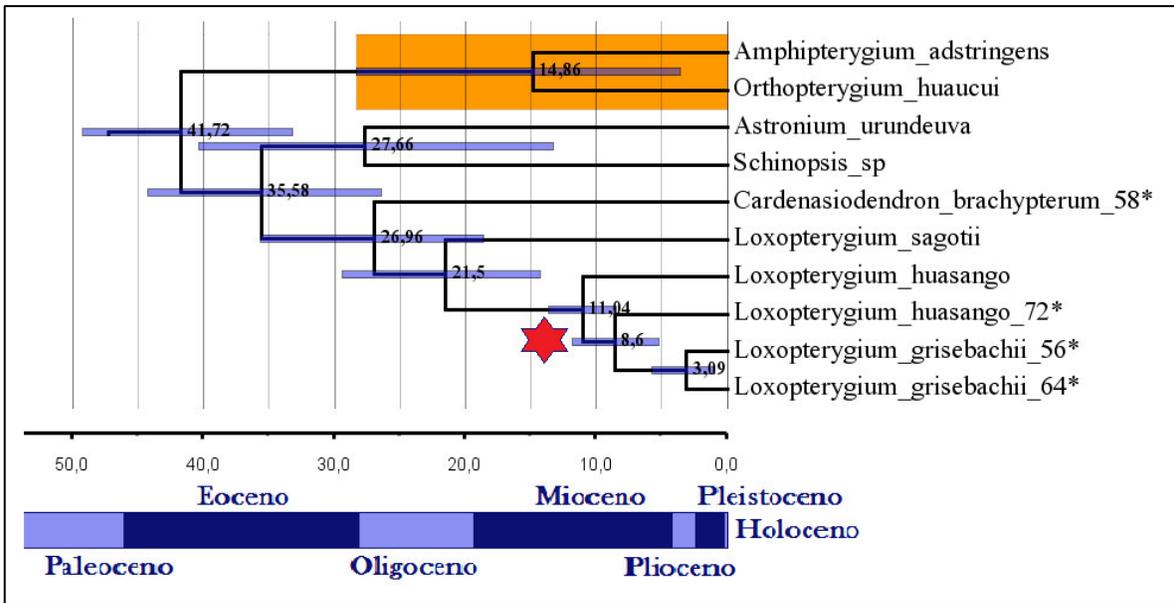


Figura 21. Fragmento de la Filocronología bayesiana obtenida con la concatenación de los datos plastidiales (TrnL y Rps16) y nuclear (ITS) correspondiente al clado principalmente sudamericano. La región resaltada en naranja corresponde a Julaniaceae. Los números en cada nodo corresponden a las edades estimadas en millones de años y las barras, al 95% de la densidad de probabilidad más alta. La estrella indica el punto de calibración.

Tabla 11. Edades calculadas por el análisis bayesiano en BEAST para los datos plastidiales (TrnL + Rps16).

Parámetros estadísticos	Sapindales	Anacardiaceae	<i>Rhus-Pistacia</i>	<i>Mangifera-Bouea</i>	Julianiaceae	<i>Loxopterygium grisebachii-L. sagotii</i>
Edad promedio (millones de años)	78,6843	69,237	43,3845	33,0266	16,5181	11,0147
Desviación estándar	0,1515	9,35E-02	7,19E-03	1,64E-02	0,1544	4,76E-02
Mediana	78,1178	69,1918	43,3845	33,0214	15,2437	10,9985
Media geométrica	78,4167	69,1406	43,3732	32,9938	14,7522	10,9381
95% densidad probabilidad del límite inferior	66,6459	62,2191	41,462	30,1308	3,8837	8,5569
95% densidad probabilidad del límite superior	91,5862	76,47	45,3421	35,8635	31,8618	13,6028
Tiempo de autocorrelación (ACT)	24096,0897	29446,6739	2368,445	5576,8451	17953,4348	61086,5405
Tamaño de muestra efectiva (ESS)	1867,5644	1528,2201	19000,2303	8069,2576	2506,5399	736,6762

Tabla 12. Edades calculadas por el análisis bayesiano en BEAST para los datos concatenados (TrnL + Rps16 + ITS).

Parámetros estadísticos	Sapindales	Anacardiaceae	<i>Rhus-Pistacia</i>	<i>Mangifera-Bouea</i>	Julianiaceae	<i>Loxopterygium grisebachii-L. sagotii</i>
Edad promedio (millones de años)	63,9812	62,2674	42,9729	33,3074	14,8144	11,0409
Desviación estándar	6,61E-02	6,92E-02	6,84E-03	1,40E-02	9,96E-02	2,66E-02
Mediana	63,8851	62,2132	42,9731	33,311	13,7769	11,0232
Media geométrica	63,8972	62,1946	42,9616	33,2754	13,2973	10,9627
95% densidad probabilidad del límite inferior	57,5507	56,4765	41,0904	30,4828	3,6963	8,5641
95% densidad probabilidad del límite superior	70,433	68,3174	44,939	36,2432	28,2902	13,6677
Tiempo de autocorrelación (ACT)	18217,9418	23736,5531	2176,0538	4124,706	9813,0196	18753,8524
Tamaño de muestra efectiva (ESS)	2470,1473	1895,8524	20680,0955	10910,1108	4585,8463	2399,5603

Las filocronologías bayesianas de los datos plastidiales (Fig 18) y de los datos totales (Fig 19) identifican los mismos grupos ya descritos anteriormente. Las edades para estos grupos son las siguientes en ambos resultados, respectivamente: divergencia entre ambas subfamilias resulta en 69,24 / 62,28 ma; diversificación de la tribu Rhoaeae, 55,64 / 49,75 ma; diversificación del clado africano de Rhoaeae, 47,26 / 43,53 ma; diversificación del clado no africano, 52,06 / 47,32 ma; diversificación del clado sudamericano, 46,51 / 41,72 ma (excluyendo a *Schinus* para este último).

Las figuras 20 y 21 resaltan el clado sudamericano con los marcadores plastidiales (TrnL, Rps16) y con la concatenación de datos (TrnL, Rps16, ITS). Se encuadra en naranja el clado perteneciente a Julianiaceae con edades de diversificación de 16,52 y 14,82 ma respectivamente. La diversificación del género *Loxopterygium* resulta en 20,37 y 21,5 ma respectivamente y dentro de este género, la divergencia entre *L. grisebachii* y *L. huasango* resulta en 11,01 y 11,04 ma con cada grupo de datos respectivamente.

Los Tablas 10 y 11 muestran las edades, desviaciones y límites resultantes del análisis bayesiano luego de la calibración con 5 registros fósiles con los datos plastidiales y concatenados respectivamente. Se identifican ligeras diferencias entre ambos resultados, principalmente en los límites de las edades de divergencia. El clado correspondiente a Julianiaceae (al que pertenecen *Amphipterygium* y *Orthopterygium*) presenta una edad de 16,52 ma con datos límites en 31,86 y 3,88 ma para los datos plastidiales y 14,82 ma con datos límites en 28,29 y 3,7 ma para los tres marcadores.

7. Discusión

7.1. Ausencia de diversidad genética con los marcadores empleados en *Orthopterygium huacui*

En los vegetales el genoma plastidial presenta una tasa mutacional menor que el genoma nuclear, siendo así el resultado esperado correspondería a niveles de variación mayores en las secuencias nucleares que en las plastidiales (Wolfe et al. 1987). Por otro lado, numerosos estudios postulan que la baja diversidad es una característica de especies recientes. Bajo estas consideraciones, dada la ausencia de diferencias tanto en las regiones plastidiales (TrnL y Rps16) como en la nuclear (ITS), podríamos postular las siguientes causas:

7.1.1. Contaminación de muestras

Se trabajó no solo con muestras de *O. huacui*, si no, como se ha detallado en materiales y métodos, con otras muestras de Anacardiaceae . Las secuencias obtenidas, en todos los casos correspondieron a las diferentes especies de Anacardiaceae trabajadas, al ser contrastadas con la base de datos GenBank mediante la herramienta BLAST. Asimismo, los análisis filogenéticos realizados han ubicado apropiadamente a nuestras especies en los clados ya detallados, por tal razón se descarta la posibilidad de contaminación de muestras, dado que hubieran resultado ambigüedades e incongruencias en estas otras especies de Anacardiaceae.

7.1.2. Característica inherente a poblaciones con bajo recambio generacional y baja tasa mutacional

Como ya se ha mencionado, *Orthopterygium* es un arbusto como casi todas las Anacardiaceae, pero con una característica muy particular: su limitada distribución. Los arbustos y árboles, a diferencia de las hierbas, presentan tasas evolutivas más bajas (Smith y Donoghue 2008). En estas especies, por causa de un ciclo vital más largo, el recambio generacional es más lento y en muchos casos el periodo de floración puede darse en intervalos de años (Bawa et al. 2003), esto limita considerablemente la aparición de variantes o mutaciones en una población. Considerando ese hecho, nuestros resultados serían un reflejo de las características reproductivas de esta especie, dado que cada generación permanece durante muchos años, las variantes generadas en el marcador ITS y más aún en los marcadores cloroplastidiales, no se transmitirían con la suficiente velocidad como para ser detectadas en un análisis de esta naturaleza (Yue et al. 2010). Estudios recientes parecen indicar que las Anacardiaceae arbustivas como *Orthopterygium* presentarían niveles bajos de diversidad genética. Un estudio genético-poblacional realizado por Coppi (2010) en *Boswellia sacra*, una Burseraceae arbórea distribuida a lo largo de 150 km en la costa Indica-Africana, encontró niveles menores de diversidad (heterocigosidad = 0,136) con respecto al promedio registrado en angiospermas (heterocigosidad = 0,22) con el empleo de marcadores ISSR (Nybom 2004). Burseraceae es la familia hermana de Anacardiaceae y, al igual que esta última, presenta muchas especies de porte arbóreo y arbustivo, por tal razón consideramos que *Orthopterygium* reflejaría los mismos patrones de evolución molecular por pertenecer al mismo linaje y ser un arbusto.

7.1.3. *Orthopterygium huaucui* es una especie reciente

Numerosos estudios reportan la asociación entre especies recientes y baja diversidad genética (Arden y Lambert 1997; Calero et al. 1999; Suh et al. 2000; Meunier et al. 2001; Galli et al. 2006). Descartando efectos de la deriva genética, este patrón es producto de la mutación en un corto tiempo. La ausencia de diversidad en *Orthopterygium* indicaría que se trata de una especie con cientos de miles de años o pocos millones de años, es decir,

este resultado observado correspondería acaso a una especie originada en el Plioceno (5,33-2,58 ma) o más apropiadamente durante el Pleistoceno (2,58-0,01 ma). Sin embargo, la aparición de mutaciones sería tan lenta en esta especie arbustiva, que habríamos de considerar efectos de deriva genética (como un cuello de botella) para explicar nuestros resultados.

7.1.4. Cuello de botella genético en *Orthopterygium huaucui*

Las especies que padecen reducciones de tamaño poblacional, presentan por lo general niveles bajos de diversidad genética, haplotipos que se diferencian por muy pocas variaciones, en muchos casos por una o dos mutaciones, y en la cual hay haplotipos con mayor frecuencia que otros (Hamrick y Godt 1990; Soltis y Gitzendanner 1999). No se reportan estudios a nivel poblacional o filogeográficos en Anacardiaceae, en su lugar se tienen estudios de carácter filogenético que incluyen más de un individuo de la misma especie, se trata de los géneros *Pistacia*, *Toxicodendron* y *Mangifera*. En el primero se obtienen para las especies *P. mexicana*, *P. lentiscus*, *P. chinensis*, *P. terebinthus* y *P. vera*, distancias iguales o menores a 0,8%, 2,20%, 0,31%, 0,06% y 1,1% respectivamente (Yi *et al.* 2008); mientras que en el segundo, se obtienen para las especies *T. grandiflorum*, *T. radicans*, *T. vernicifluum* y *T. succedaneum* distancias menores a 1,14%, 4,82%, 7,67% y 10,07% respectivamente (Nie *et al.* 2009); en el tercero, en el que se incluyen variedades y cultivares de *Mangifera indica*, se hallan diferencias menores al 1,12% (Yonemori *et al.* 2002). Si nuestra especie hubiera sido afectada por un cuello de botella genético, el marcador nuclear ITS mostraría cambios mínimos entre haplotipos reflejando diferencias menores a las halladas en las especies de Anacardiaceae mencionadas líneas arriba, en las cuales no se reportan dichos efectos. Sin embargo, ante la ausencia de variaciones en el marcador ITS, planteamos un cuello de botella suficientemente severo como para reducir todas las variantes a un solo haplotipo de ITS.

7.1.5. Reproducción clonal

En las localidades de muestreo de *Orthopterygium* se observan estructuras que semejan los estolones que desarrollan algunas plantas con reproducción clonal, esto, además de la escasa observación de plántulas e individuos juveniles y la baja tasa de germinación de las semillas, alimentan la idea de que *Orthopterygium* presentaría una reproducción predominantemente asexual. De ser así, la posibilidad de hallar variabilidad genética resultaría limitada aun con el empleo de los marcadores más variables como los microsatélites (SSR). En este escenario las secuencias ITS serían copias de una misma secuencia originaria al igual que los marcadores cloroplastidiales. Este sería un resultado esperado para cada población de manera independiente, es decir cada población portaría una sola variante de cada tipo, sin embargo el resultado en este estudio es una secuencia de cada marcador para todas las poblaciones.

7.2. Distancias genéticas de *Orthopterygium huaucai* y *Julianiaceae* dentro de la familia *Anacardiaceae*

Las distancias genéticas obtenidas obedecen al patrón ya descrito en vegetales donde a diferencia de lo observado en animales, los marcadores nucleares como ITS presentan mayor variabilidad que los plastidiales como TrnL y Rps16 (Wolfe et al. 1987). Por otro lado, las especies más cercanas a *Orthopterygium* no fueron las mismas en todos los casos. Solo para el marcador TrnL, *Amphipterygium* fue la más próxima; mientras que con Rps16 fue *Rhus virens*, junto a otras ocho especies más próximas que *Amphipterygium*, y para ITS fue *Loxostylis alata*. Con TrnL se obtuvo un resultado esperado, dado que *Amphipterygium* es el género hermano de *Orthopterygium*; pero con Rps16 la proximidad de *Rhus virens* se puede deber a la longitud del marcador disponible en GenBank el cual solo tiene 220 pb que corresponde a una región poco variable con respecto a *Orthopterygium*. Por otro lado entre *Amphipterygium* y *Orthopterygium* existen para este marcador trece diferencias y una inserción de 13pb, característica que no presentan las otras ocho especies más próximas. Según el marcador ITS la especie más próxima no es una especie americana sino una de origen africano, *Loxostylis alata*; este resultado puede

deberse a la gran variabilidad (tasa mutacional) interespecifica que presenta el marcador ITS dentro de la familia Anacardiaceae, principalmente con respecto a las regiones ITS 1 e ITS 2, las mismas que dificultan el alineamiento de las secuencias. Como producto de esta alta tasa mutacional, dos secuencias pueden presentar bases en común por efecto del azar más no por ser próximas en términos evolutivos, esto es homoplasia. No consideramos una mala determinación taxonómica dado que las secuencias plastidiales correspondientes a este espécimen (*L. alata*) permiten su inclusión en el clado africano mostrado en la sección de resultados.

La concatenación de datos plastidiales ubica a *Amphipterygium adstringens* como la especie más cercana, con una distancia de 0,0073, un valor intermedio entre los obtenidos con TrnL y Rps16, seguida por especies de la tribu Rhoëae y finalmente por especies de la tribu Anacardiæe y la subfamilia Spondioideæ. Esto corresponde claramente a un patrón taxonómico esperado. La distancia calculada para Julianiaceæ, el grupo conformado por *Amphipterygium* y *Orthopterygium* (representado por las secuencias de *Amphipterygium adstringens* y *Orthopterygium huacui*) presenta un nivel intermedio dentro de los grupos o géneros de Anacardiaceæ incluidos en este estudio, este patrón se da para ambos marcadores plastidiales y para la concatenación de ambos. Julianiaceæ está conformado por 5 especies, el presente estudio no las incluye a todas, no obstante, presenta valores de distancia genética cercanos o por encima de muchos grupos o géneros con mayores números de especies, tal es el caso de *Schinopsis* (7 especies), *Astronium* (7 especies), *Tapirira* (8 especies), *Pistacia* (12 especies), *Abrahamia* (19 especies), *Schinus* (30 especies), *Trichoscypha* (32 especies), *Ozoroa* (40 especies) y *Mangifera* (69 especies) para el marcador TrnL y adicionalmente *Gluta* (30 especies) y *Micronychia* (10 especies) para el marcador Rps16. Como ya se ha mencionado, con la combinación de ambos marcadores este resultado persiste pese a que el número de géneros incluidos es menor. Considerando que no son incluidas todas las especies de los géneros mencionados, sino todas aquellas disponibles en GenBank, Julianiaceæ presenta niveles de diversidad similares a géneros con más de 7 especies. Este resultado podría obedecer a las siguientes explicaciones:

7.2.1. Inclusión de pocos individuos de cada género

La inclusión de pocos especímenes de cada género puede provocar que las distancias halladas no reflejen los valores reales, sobre todo cuando las secuencias pertenecen a especies cercanamente relacionadas comparadas con el resto de especies que conformarían el género. Este puede ser el caso para *Tapirira*, *Gluta*, *Micronychia* y *Schinopsis* en el que solo se incluyeron dos especies de cada uno, mientras que para el resto de géneros con distancias menores a Julaniaceae se incluyeron entre 4 y 6 especies y secuencias. Sin embargo, estas cifras no dejan de ser bajas para el número de especies aceptadas para cada género.

7.2.2. Julaniaceae es un linaje con especies extintas

Si Julaniaceae presenta tanta o mayor distancia genética que géneros o grupos con un mayor número de especies, podríamos postular que este clado estaría conformado por especies aun no descritas o ya extintas. Dadas las particularidades de las estructuras florales y frutos de estas especies que no encuentran similitudes dentro de la familia Anacardiaceae, resulta muy particular el bajo número de especies reportadas hasta el momento.

7.3. Posición evolutiva de *Orthopterygium* y Julaniaceae dentro de Anacardiaceae

Los análisis realizados corroboran los resultados obtenidos por Pell (2004) sobre la filogenia Anacardiaceae, al identificar dos clados con soportes estadísticos máximos que corresponden a las dos subfamilias reconocidas: Spondioideae y Anacardioideae, al igual que las tribus Anacardieae y Rhoaeae dentro de esta última. A diferencia de Pell (2004), este estudio no empleó el marcador plastidial matK; sin embargo la adición del marcador nuclear ITS (con una tasa mutacional mayor) permite distinguir dentro de Anacardioideae además de las tribus ya mencionadas, un patrón biogeográfico en grupos o clados de especies africanas y no africanas (Figuras 4 y 5). Mediante los análisis filogenéticos de inferencia bayesiana y máxima verosimilitud se reconoce el clado sudamericano del que Julaniaceae forma parte dentro de Rhoaeae. El análisis de parsimonia por el contrario, no

permite distinguir los mismos clados y en lugar de ello muestra una politomía. Este resultado responde a la cantidad de información que este método requiere para lograr una filogenia informativa con respecto a los dos primeros métodos (Holder y Lewis 2003; Kolaczowski y Thornton 2004). Julianiaceae comparte el clado de Anacardiaceae sudamericanas junto con *Astronium*, *Schinopsis*, *Loxopterygium* y *Cardenasiodendron*, géneros entre los cuales hay muchas especies de zonas áridas como el bosque tropical estacionalmente seco (*seasonally dry tropical forest* o STDF, por sus siglas en inglés) (Pennington et al. 2010; Linares-Palomino et al. 2010; Linares-Palomino 2002). Ciertas especies en este clado presentan frutos de tipo sámara (*Cardenasiodendron*), samaroides (*Loxopterygium*, *Schinopsis*) con proyecciones alares o de tipo aquenio (*Apterokarpos*) (Kubitzki 2011), similares a las especies de Julianiaceae. Con respecto a las relaciones evolutivas de este clado, Bachelier y Endress (2007) postulan las similitudes en las estructuras florales entre *Amphipterygium* y *Pistacia*, sin embargo tanto en el presente estudio filogenético como en el realizado por Pell (2004), *Pistacia* pertenece a un clado en el que se encuentran *Rhus*, *Toxicodendron*, *Mosquitoxylum*, *Metopium* y *Bonetiella*, este grupo es llamado complejo *Rhus*, por tanto, dichas similitudes pueden ser producto de evolución convergente, es decir homoplasia.

7.4. Tiempo de divergencia entre *Amphipterygium* y *Orthopterygium*

La edad estimada para la divergencia entre *Orthopterygium* y *Amphipterygium* fue calculada en 16,52 ma (31,86 – 3,88 ma) y 14,82 ma (28,29 – 3,70 ma) con los datos plastidiales y concatenados respectivamente, esta edad corresponde al Mioceno comprendida entre 23,03 y 5,33 ma. Ambos géneros están distanciados por aproximadamente 3000 kilómetros y se desconoce registro fósil de Julianiaceae en esta brecha que ofrezca indicios sobre el patrón histórico de migración. Sin embargo, dado que Julianiaceae presenta un mayor número de especies en el Norte, podríamos postular una ruta hacia el sur a través de puentes continentales.

El Istmo de Panamá ofrece una alternativa para la presencia de *Orthopterygium* en el Hemisferio Sur. Estudios clásicos consideran el cierre definitivo de este puente hace 3 ma

en el Plioceno (5,33 – 2,58 ma, Keigwin 1978; Keigwin 1982; Coates et al. 1992; Coates et al. 2004) y dado que los límites superiores del tiempo de divergencia calculado se encuentran en este rango, resultaría una opción tentativa. Sin embargo, gran parte del rango de esta edad, considerando la media, (16,52 y 14,82 ma) se encuentra en las edades del Oligoceno y Mioceno respectivamente. La hipótesis del puente caribeño que conectó Las Antillas con el norte de Sudamérica (GAARlandia, Great Antilles and Aves Ridge, por sus siglas en inglés) se presume entre 35 - 33 ma (Iturralde-Vinent y MacPhee 1999; Ali 2012), y resulta anterior a nuestros límites inferiores, por tal razón no explicaría la disyunción entre ambos géneros.

Por otro lado, estudios filogenéticos recientes postulan la necesidad de un istmo de Panamá mucho más antiguo para explicar migraciones entre las Américas, como ejemplo podemos citar disyunciones en palmeras de la tribu Trachycarpeae (Bacon et al. 2013), árboles amazónicos (Dick et al. 2003), leguminosas (Lavin et al. 2004), Zingiberaceae (Särkinen et al. 2007), en todos estos estudios las edades de diversificación de clados con orígenes norteamericanos amparados en registros fósiles se remontan al Mioceno, período en el que, según la teoría clásica, Panamá se encontraba en formación. De acuerdo con estudios geomorfológicos recientes, la brecha entre Centro y Sudamérica habría sido lo suficientemente estrecha (< 200km) hace 25 ma como para permitir un flujo migratorio, es decir, gran parte del Istmo ya había emergido hacia el Mioceno inferior hace 23 ma y prácticamente completado su formación hace 15 ma y no hace 3 ma (Farris et al. 2011; Montes et al. 2012a; Montes et al. 2012b). Bajo este escenario se esperaría un patrón migratorio de Norte a Sur de linajes vegetales miocénicos favorecido por las características que presentan muchas especies con producción de semillas dormantes y reproducción vegetativa y, tal como han demostrado Cody et al. (2010), existe una tendencia de edades de diversificación para estos linajes vegetales precedente al Plioceno (entre 5,33 y 2,58 ma) en comparación con linajes de especies animales, principalmente mamíferos. Esto indicaría efectivamente que ciertas especies vegetales presentarían mayor capacidad de dispersión. Todas estas evidencias fortalecen el establecimiento de la ruta migratoria de Julianiaceae a través del Istmo de Panamá durante el Mioceno. Sin

embargo, esclarecer la dirección Norte-Sur o viceversa de este flujo requiere de nuevos estudios que amplíen el tamaño muestral en el clado Julianiaceae y el empleo de nuevos marcadores. Por el momento, la presencia de una sola especie en el hemisferio sur como producto de aquel arribo en lugar de una “diversificación” permite un planteamiento en dirección Norte-Sur. Indicios de aquel posible flujo migratorio en Anacardiaceae se tienen a partir de estudios palebotánicos en los géneros *Haplorhus* y *Tapirira*, el primero es un género monotípico con una especie de distribución muy limitada (*Haplorhus peruviana*) y disyunta en los Andes Centrales de Perú y Norte de Chile con un registro fósil Oligocénico en México de 33,9-23,03 ma (Ramírez y Cevallos-Ferriz 2002); el segundo, *Tapirira*, es un género con mayor número de especies en Sudamérica con registros fósiles de inicios del Mioceno de 25-22 ma en México (Martínez-Cabrera y Cevallos-Ferriz 2004), este último autor también menciona el descubrimiento de restos fósiles oligocénicos posiblemente pertenecientes a una especie de *Loxopterygium* (un género actualmente sudamericano con tres especies), en México. Todo ello, además de numerosos registros fósiles de Anacardiaceae en Norteamérica, refuerza la idea de un origen Norteamericano para *Orthopterygium*.

7.5. Relevancia del estudio para la Conservación de *Orthopterygium huaucui* y la protección de la Vertiente occidental de los Andes peruanos

La edad de origen de *Orthopterygium huaucui* ofrece indicios del posible establecimiento de la flora actual en la vertiente occidental. Si estos resultados se replican en otras especies de géneros como *Cnidoscolus*, *Jatropha*, *Espositoa*, *Echinopsis*, entre otros, nos encontraríamos ante una flora muy antigua, Miocénica, en comparación con especies vegetales andinas y más aún amazónicas, cuyos orígenes han sido influenciados principalmente por la orogénesis andina (de 10 ma en adelante). La Vertiente occidental es un ambiente árido que pertenece a un sistema continuo entre los cuales se encuentran el desierto de Sechura y el punto más seco de la Tierra, el desierto de Atacama; hay indicios de que esta zona ha permanecido como tal por más de 15 ma, por tanto sería de esperar que ante una ausencia de presión ambiental, junto a las características ya mencionadas de *Orthopterygium*, esta especie no muestre variaciones a nivel molecular.

Las implicancias para la Biología de la Conservación de este estudio radicarían en el descubrimiento de que la vertiente occidental alberga especies muy antiguas que podrían desaparecer no solo ante cambios ambientales, sino por efectos de intervención humana directa. En la actualidad este ambiente no recibe protección alguna y por el contrario se ve amenazado por la expansión urbana, deforestación y actividades industriales. Estudios filogenéticos y poblacionales futuros contribuirán con la determinación de las antigüedades de estas especies y fortalecerán las iniciativas en favor de la protección de este ambiente natural.

8. Conclusiones

- La ausencia de diversidad genética detectada en *Orthopterygium huaucui* con los marcadores de ADN ensayados podría explicarse como producto de un severo cuello de botella genético sufrido en el pasado, mas no por tratarse de una especie reciente. Esto en virtud de su antigüedad y divergencia con su género más próximo, *Amphipterygium adstringens*.
- Se corrobora, mediante el empleo de los marcadores plastidiales TrnL y Rps16 además del marcador nuclear ITS en el análisis filogenético, que *Orthopterygium huaucui* pertenece a la tribu Rhoëae y que además de ello pertenece a un clado de Anacardiaceae sudamericanas que habitan principalmente ambientes secos.
- La divergencia entre *Orthopterygium* y *Amphipterygium* (su género hermano) estimada en 16,52 y 14,82 millones de años con los datos plastidiales y concatenados, respectivamente, sería explicada por una migración acontecida durante el Mioceno. En tal periodo es factible un evento migratorio desde el Hemisferio Norte a través del Istmo de Panamá, el cual ya estaría completamente formado o con una brecha flanqueable.

9. Recomendaciones

- Se recomienda el empleo de material vegetal en estadio de desarrollo, como hojas jóvenes, para una extracción de ADN con alto grado de pureza. Dado que en etapas iniciales de desarrollo, los vegetales presentan niveles elevados de material genético y menor cantidad de metabolitos secundarios, en comparación con estadios maduros, los cuales pueden interferir con la amplificación génica (PCR).
- Ante la ausencia de diversidad genética, la información brindada por filocronologías bayesianas calibradas con información fosil confiable es útil en la determinación de posibles causas que explican los patrones de disyunción entre especies relacionadas, se recomienda por tanto la asociación entre estudios de diversidad genética y filocronológicos.
- Ante la ausencia de variabilidad genética con el marcador nuclear ensayado (ITS), se recomienda el empleo de marcadores nucleares como microsatélites (SSR), RAPDs o ISSRs, siendo estos últimos los de mayor uso práctico debido a su bajo costo y practicidad.

10. Referencias Bibliográficas

- Aguilar-Ortigoza, Carlos, Victoria Sosa, y Guillermo Angeles. 2004 «Phylogenetic Relationships of Three Genera in Anacardiaceae: Bonetiella, Pseudosmodingium, and Smodingium». *Brittonia* 56 (2): 169-84.
- Alakurtti, Sami, Pia Bergstrom, Nina Sacerdoti-Sierra, Charles L Jaffe, y Jari Yli-Kauhaluoma. 2010. «Anti-leishmanial activity of betulin derivatives». *The Journal of Antibiotics* 63 (3): 123-26.
- Ali, Jason R. 2012. «Colonizing the Caribbean: is the GAARlandia land-bridge hypothesis gaining a foothold?» *Journal of Biogeography* 39 (3): 431-33.
- Antonelli, Alexandre, Johan A. A. Nylander, Claes Persson, y Isabel Sanmartín. 2009. «Tracing the impact of the Andean uplift on Neotropical plant evolution». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (24): 9749 -9754.
- Ardern, S. L., y D. M. Lambert. 1997. «Is the black robin in genetic peril?» *Molecular Ecology* 6 (1): 21-28. doi:10.1046/j.1365-294X.1997.00147.x.
- Arrieta, Jesús, Javier Benitez, Edith Flores, Carlos Castillo, y Andrés Navarrete. 2003. «Purification of Gastroprotective Triterpenoids from the Stem Bark of *Amphipterygium adstringens*; Role of Prostaglandins, Sulfhydryls, Nitric Oxide and Capsaicin-Sensitive Neurons». *Planta Med* 69 (10): 905-9.
- Avise, John. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press.
- . 2004. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. 2.^a ed. Sinauer Associates Inc.
- Bachelier, J. B, y P. K Endress. 2007. «Development of inflorescences, cupules, and flowers in *Amphipterygium* and comparison with *Pistacia* (Anacardiaceae)». *International Journal of Plant Sciences* 168 (9): 1237-53.
- Bacon, Christine D., Andrés Mora, Warren L. Wagner, y Carlos A. Jaramillo. 2013. «Testing geological models of evolution of the Isthmus of Panama in a phylogenetic framework». *Botanical Journal of the Linnean Society* 171 (1): 287-300.
- Baldwin, Bruce G., y Staci Markos. 1998. «Phylogenetic Utility of the External Transcribed Spacer (ETS) of 18S–26S rDNA: Congruence of ETS and ITS Trees of *Calycadenia* (Compositae)». *Molecular Phylogenetics and Evolution* 10 (3): 449-63. doi:10.1006/mpev.1998.0545.
- Barrett, S., y J. Kohn. 1991. «Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation». En *Genetics and Conservation of Rare Plants*, editado por D. Falk y K. Holsinger, 1-30. New York, USA: Oxford University Press.
- Bawa, Kamaljit S., Hyesoon Kang, y Michael H. Grayum. 2003. «Relationships among time, frequency, and duration of flowering in tropical rain forest trees». *American Journal of Botany* 90 (6): 877-87.
- Bentham, G., y J Hooker. 1862. *Anacardiaceae*. Reeve and Company. Genera Plantarum 1. London, UK.
- Brako, L, y J Zarucchi. 1993. *Catalogue of the flowering plants and gymnosperms of Peru*. Monographs in Systematic Botany. Vol. 45. St. Louis: Missouri Botanical Garden.

- Broadhurst, Linda, y David Coates. 2004. «Genetic Divergence among and Diversity within Two Rare Banksia Species and Their Common Close Relative in the subgenus *sostylis* R.Br. (Proteaceae)». *Conservation Genetics* 5 (6): 837-46.
- Burnham, Robyn J., y Nina L. Carranco. 2004. «Miocene winged fruits of *Loxopterygium* (Anacardiaceae) from the Ecuadorian Andes». *American Journal of Botany* 91 (11): 1767-73. doi:10.3732/ajb.91.11.1767.
- Byrne, M, y M Hankinson. 2012. «Testing the variability of chloroplast sequences for plant phylogeography». *Australian Journal of Botany* 60 (7): 569-74.
- Caetano, S., L. Nusbaumer, y Y. Naciri. 2008b. «Chloroplast and microsatellite markers in *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. and close species of Anacardiaceae : toward the definition of a species complex?» *Candollea* 63 (1): 115-30.
- Caetano, S., D. Prado, R. T. Pennington, S. Beck, A. Oliveira-Filho, R. Spichiger, y Y. Naciri. 2008a. «The history of Seasonally Dry Tropical Forests in eastern South America: inferences from the genetic structure of the tree *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae).» *Molecular Ecology* 17 (13): 3147-59.
- Calero, Cristina, Olga Ibáñez, Maria Mayol, y Josep A. Rosselló. 1999. «Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers detect a single phenotype in *Lysimachia minoricensis* J.J. Rodr. (Primulaceae), a wild extinct plant». *Molecular Ecology* 8 (12): 2133-36.
- Chen, T. K, D. F Wiemer, y J. J Howard. 1984. «A volatile leafcutter ant repellent from *Astronium graveolens*». *Naturwissenschaften* 71 (2): 97-98.
- Chintharlapalli, Sudhakar, Sabitha Papineni, Ping Lei, Satya Pathi, y Stephen Safe. 2011. «Betulinic acid inhibits colon cancer cell and tumor growth and induces proteasome-dependent and -independent downregulation of specificity proteins (Sp) transcription factors». *BMC Cancer* 11 (1): 371.
- Chowdhury, Arnab Roy, Suparna Mandal, Anindya Goswami, Monidipa Ghosh, Labanya Mandal, Debabani Chakraborty, Agneyo Ganguly, Gayatri Tripathi, y Sibabrata Mukhopadhyay. 2003. «Dihydrobetulinic Acid Induces Apoptosis in *Leishmania donovani* by Targeting DNA Topoisomerase I and II: Implications in Antileishmanial Therapy». *Molecular Medicine* 9 (1-2): 26-36.
- Clegg, M, Michae Cummings, y Mary Durbin. 1997. «The evolution of plant nuclear genes». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (15): 7791-98.
- Coates, Anthony G., Laurel S. Collins, Marie-Pierre Aubry, y William A. Berggren. 2004. «The Geology of the Darien, Panama, and the late Miocene-Pliocene collision of the Panama arc with northwestern South America». *Geological Society of America Bulletin* 116 (11-12): 1327-44.
- Coates, Anthony G., Jeremy B. C. Jackson, Laurel S. Collins, Thomas M. Cronin, Harry J. Dowsett, Laurel M. Bybell, Peter Jung, y Jorge A. Obando. 1992. «Closure of the Isthmus of Panama: The near-shore marine record of Costa Rica and western Panama». *Geological Society of America Bulletin* 104 (7): 814-28.
- Cody, Sarah, James E. Richardson, Valentí Rull, Christopher Ellis, y R. Toby Pennington. 2010. «The Great American Biotic Interchange revisited». *Ecography* 33 (2): 326-32.

- Collevatti, Rosane Garcia, Suelen Gonçalves Rabelo, y Roberto F. Vieira. 2009. «Phylogeography and disjunct distribution in *Lychnophora ericoides* (Asteraceae), an endangered cerrado shrub species». *Annals of Botany* 104 (4): 655 -664. doi:10.1093/aob/mcp157.
- Coppi, Andrea, Lorenzo Cecchi, Federico Selvi, y Mauro Raffaelli. 2010. «The Frankincense Tree (*Boswellia Sacra*, Burseraceae) from Oman: ITS and ISSR Analyses of Genetic Diversity and Implications for Conservation». *Genetic Resources and Crop Evolution* 57 (7): 1041-52.
- Cronquist, Arthur. 1981. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. New York: Columbia University Press.
- Dang, Zhao, Weihong Lai, Keduo Qian, Phong Ho, Kuo-Hsiung Lee, Chin-Ho Chen, y Li Huang. 2009. «Betulinic Acid Derivatives as Human Immunodeficiency Virus Type 2 (HIV-2) Inhibitors». *Journal of Medical Chemistry* 52 (23): 7887-91.
- Das, Benu Brata, Nilkantha Sen, Somdeb Bose Dasgupta, Agneyo Ganguly, Rakhee Das, y Hemanta Majumder. 2006. «Topoisomerase research of kinetoplastid parasite *Leishmania*, with special reference to development of therapeutics». *Indian Journal of Medical Research* 123: 221-32.
- DeSalle, R. 2005. «Conservation genetics: Genetics at the brink of extinction». *Heredity* 94 (4): 386-87.
- Dick, Christopher W, Kobinah Abdul-Salim, y Eldredge Bermingham. 2003. «Molecular Systematic Analysis Reveals Cryptic Tertiary Diversification of a Widespread Tropical Rain Forest Tree». *The American Naturalist* 162 (6): 691-703.
- Dodd, Shana C., y Kaius Helenurm. 2002. «Genetic diversity in *Delphinium variegatum* (Ranunculaceae): a comparison of two insular endemic subspecies and their widespread mainland relative». *American Journal of Botany* 89 (4): 613-22.
- Doyle, J. J., y J. L. Doyle. 1987. «A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue». *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Drummond, A. J., y A. Rambaut. 2007. «BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees». *BMC Evol Biol* 7: 214.
- Eiadthong, Wichan, Keizo Yonemori, Akira Sugiura, Naoki Utsunomiya, y Suranant Subhadrabandhu. 1999. «Analysis of phylogenetic relationships in *Mangifera* by restriction site analysis of an amplified region of cpDNA». *Scientia Horticulturae* 80 (3-4): 145-55.
- Ellstrand, N., y D. Elam. 1993. «Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation». *Annual Review of Ecology and Systematics*, n.º 24: 217-242.
- Farris, David W., Carlos Jaramillo, German Bayona, Sergio A. Restrepo-Moreno, Camilo Montes, Agustin Cardona, Andres Mora, Robert J. Speakman, Michael D. Glascock, y Victor Valencia. 2011. «Fracturing of the Panamanian Isthmus during initial collision with South America». *Geology* 39 (11): 1007-10.
- Fine, Paul V. A., Roosevelt García-Villacorta, Nigel C. A. Pitman, Italo Mesones, y Steven W. Kembel. 2010. «A Floristic Study of the White-Sand Forests of Peru1». *Annals of the Missouri Botanical Garden* 97 (3): 283-305.

- Fitmawati, Alex Hartana. 2010. «Phylogenetic Study of *Mangifera laurina* and its Related Species Using cpDNA TrnL-F Spacer Markers». *HAYATI Journal of Biosciences* 17 (1): 9-14.
- Frankham, R., J. Ballou, y D. Briscoe. 2010. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press.
- Gadek, Paul A., Edwino S. Fernando, Christopher J. Quinn, Sara B. Hoot, Teresa Terrazas, Mary C. Sheahan, y Mark W. Chase. 1996. «Sapindales: Molecular Delimitation and Infraordinal Groups». *American Journal of Botany* 83 (6): 802-11.
- Galli, Z., K. Penksza, E. Kiss, L. Sági, y L. E. Heszky. 2006. «Low variability of Internal Transcribed Spacer rDNA and TrnL (UAA) intron sequences of several taxa in the *Festuca ovina* aggregate (Poaceae)». *Acta Biologica Hungarica* 57 (1): 57-69. doi:10.1556/ABiol.57.2006.1.6.
- Gengler, K, y D. Crawford. 2000. «Genetic Diversities of Four Little-Known Species of *Malesherbia* (Malesherbiaceae) Endemic to the Arid Inter-Andean Valleys of Peru». *Brittonia* 52 (4): 303 - 310.
- Giner-Larza, Eva M., Salvador Máñez, Rosa M. Giner, M. Carmen Recio, José M. Prieto, Miguel Cerdá-Nicolás, y JoséLuis Ríos. 2002. «Anti-Inflammatory Triterpenes from *Pistacia terebinthus* Galls». *Planta Med* 68 (4): 311-15.
- Gitzendanner, M. A, y P. S Soltis. 2000. «Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners». *American Journal of Botany* 87: 777-86.
- Godt, Mary Jo W., Bart R. Johnson, y J.L. Hamrick. 1996. «Genetic Diversity and Population Size in Four Rare Southern Appalachian Plant Species». *Conservation Biology* 10 (3): 796-805.
- González, Antonio G., José Amaro, Braulio M. Fraga, y Javier G. Luis. 1983. «3-oxo-6 β -hydroxyolean-18-en-28-oic acid from *orthopterygium huancuy*». *Phytochemistry* 22 (8): 1828-30.
- González, Antonio G., José Amaro, Braulio M. Fraga, Javier G. Luis, José Fayos, Aurea Perales, y Mercedes P. Méndez. 1984. «Minor triterpenes from *Orthopterygium huancuy*». *Phytochemistry* 23 (9): 2079-80.
- Hall, T. A. 1999. «Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT». *Nucleic Acids Symposium Series*, n.º 41: 95-98.
- Hamrick, J., y M. Godt. 1990. «Allozyme diversity in plant species». En *Plant population genetics, breeding, and genetic resources*, editado por A. Brown, M. Clegg, A. Kahler, y B. Weir, 43-63.
- Hamrick, J., Y. Linhart, y J. Mitton. 1979. «Relationships Between Life History Characteristics and Electrophoretically Detectable Genetic Variation in Plants». *Annual Review of Ecology and Systematics* 10 (1): 173-200.
- Helenurm, Kaius, y SuzanneS. Hall. 2005. «Dissimilar Patterns of Genetic Variation in Two Insular Endemic Plants Sharing Species Characteristics, Distribution, Habitat, and Ecological History». *Conservation Genetics* 6 (3): 341-53.
- Hemsley, W. B. 1907. «*Orthopterygium huacui*». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*.
- . 1908. «On the Julianiaceae: A New Natural Order of Plants». *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 199 (Serie B): 169-97.

- Holder, Mark, y Paul O. Lewis. 2003. «Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches». *Nat Rev Genet* 4 (4): 275-84.
- Hollingsworth, Peter M. 2011. «Refining the DNA barcode for land plants». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (49): 19451-19452.
- Hoorn, C., F. P. Wesselingh, H. ter Steege, M. A. Bermudez, A. Mora, J. Sevink, I. Sanmartín, et al. 2010. «Amazonia Through Time: Andean Uplift, Climate Change, Landscape Evolution, and Biodiversity». *Science* 330 (6006): 927-931.
- Hopkinson, P., J. Travis, J. Evans, R. Gregory, M. Telfer, y P. Williams. 2001. «Flexibility and the Use of Indicator Taxa in the Selection of Sites for Nature Reserves». *Biodiversity & Conservation* 10 (2): 271-85.
- Huang, Xiaoqiu, y Anup Madan. 1999. «CAP3: A DNA Sequence Assembly Program». *Genome Research* 9 (9): 868-877.
- Huelsenbeck, John P., y Fredrik Ronquist. 2001. «MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees». *Bioinformatics* 17 (8): 754-55.
- Ito, Junko, Fang-Rong Chang, Hui-Kang Wang, Yong Kun Park, Masaharu Ikegaki, Nicole Kilgore, y Kuo-Hsiung Lee. 2001. «Anti-AIDS Agents. 48.1 Anti-HIV Activity of Moronic Acid Derivatives and the New Melliferone-Related Triterpenoid Isolated from Brazilian Propolis». *Journal of Natural Products* 64 (10): 1278-81.
- Iturralde-Vinent, Manuel, y R. D. E. MacPhee. 1999. «Paleogeography of the Caribbean region: implications for Cenozoic biogeography». *Bulletin of the American Museum of Natural History* 238: 1-195.
- Judd, W. S. 2008. *Plant systematics: a phylogenetic approach*. Sinauer Associates.
- Karron, J. 1991. «Patterns of genetic variation and breeding systems in rare plant species». En *Genetics and conservation of rare plants*, editado por B. Falk y K. Holsinger, 87-98. Oxford University Press.
- Keigwin, Lloyd D. 1978. «Pliocene closing of the Isthmus of Panama, based on biostratigraphic evidence from nearby Pacific Ocean and Caribbean Sea cores». *Geology* 6 (10): 630-34.
- . 1982. «Isotopic Paleoceanography of the Caribbean and East Pacific: Role of Panama Uplift in Late Neogene Time». *Science* 217 (4557): 350-53.
- Kenicer, Gregory J., Tadashi Kajita, R. Toby Pennington, y Jin Murata. 2005. «Systematics and biogeography of *Lathyrus* (Leguminosae) based on internal transcribed spacer and cpDNA sequence data». *American Journal of Botany* 92 (7): 1199-1209. doi:10.3732/ajb.92.7.1199.
- Knobloch, Ervín, y Dieter Hans Mai. 1986. *Monographie der Früchte und Samen in der Kreide von Mitteleuropa*. Vol. 47.
- Koch, Marcus A., Christoph Dobeš, y Thomas Mitchell-Olds. 2003. «Multiple Hybrid Formation in Natural Populations: Concerted Evolution of the Internal Transcribed Spacer of Nuclear Ribosomal DNA (ITS) in North American *Arabis divaricarpa* (Brassicaceae)». *Molecular Biology and Evolution* 20 (3): 338-350. doi:10.1093/molbev/msg046.
- Kolaczkowski, Bryan, y Joseph W. Thornton. 2004. «Performance of maximum parsimony and likelihood phylogenetics when evolution is heterogeneous». *Nature* 431 (7011): 980-84.

- Kubitzki, K. 2011. *Flowering Plants. Eudicots. Sapindales, Cucurbitales, Myrtaceae*. Vol. 10. The Families and Genera of Vascular Plants. Springer.
- Kurokawa, Masahiko, Purusotam Basnet, Mizue Ohsugi, Toyoharu Hozumi, Shigetoshi Kadota, Tsuneo Namba, Takashi Kawana, y Kimiyasu Shiraki. 1999. «Anti-Herpes Simplex Virus Activity of Moronic Acid Purified from *Rhus javanica* In Vitro and In Vivo». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 289 (1): 72 -78.
- Lavin, Matt, Brian Schrire, Gwilym Lewis, R. Toby Pennington, Alfonso Delgado-Salinas, Mats Thulin, Colin E. Hughes, Angela Beyra Matos, y Martin Wojciechowski. 2004. «Metacommunity Process Rather than Continental Tectonic History Better Explains Geographically Structured Phylogenies in Legumes». *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 359 (1450): 1509-22.
- Lee, Jung-Hyun, Dong-Hyuk Lee, y Byoung-Hee Choi. 2013. «Phylogeography and Genetic Diversity of East Asian Neolitsea Sericea (Lauraceae) Based on Variations in Chloroplast DNA Sequences». *Journal of Plant Research* 126 (2): 193-202. doi:10.1007/s10265-012-0519-1.
- León, B, J Roque, C Ulloa, P Nigel, P Jorgensen, y A Cano. 2007. «El libro rojo de las plantas endémicas del Perú». *Revista Peruana de Biología* 13.
- León, Blanca, Kenneth Young, Asunción Cano, Maria Isabel La Torre, Mónica Arakaki, y José Roque. 1997. «Botanical exploration and conservation in Peru: the plants of Cerro Blanco, Nazca». *BioLlania* 6: 431 - 448.
- Linares-Palomino, Reynaldo. 2002. «A Floristic and Phytogeographic Analysis of Peruvian Seasonally Dry Tropical Forests». Edinburgh, United Kingdom: University of Edinburgh.
- Linares-Palomino, Reynaldo, Lars Kvist, y Zhofre Aguirre-Mendoza. 2010. «Diversity and endemism of woody plant species in the Equatorial Pacific seasonally dry forests». *Biodiversity and Conservation* 19 (1): 169-85.
- Lindley, J. 1831. *An Introduction to the Natural System of Botany*. G. & C. & H. Carvill.
- Maki, Masayuki, Hiroko Morita, Syuji Oiki, y Hiroshi Takahashi. 1999. «The effect of geographic range and dichogamy on genetic variability and population genetic structure in *Tricyrtis* section *Flavae* (Liliaceae)». *American Journal of Botany* 86 (2): 287-92.
- Manchester, Steven. 1994. *Fruits and Seeds of the Middle Eocene Nut Beds Flora, Clarno Formation, Oregon*. Vol. 1. Palaeontographica Americana 58. Ithaca, N.Y.: Paleontological Research Institution.
- Markert, Jeffrey, Denise Champlin, Ruth Gutjahr-Gobell, Jason Grear, Anne Kuhn, Thomas McGreevy, Annette Roth, Mark Bagley, y Diane Nacci. 2010. «Population genetic diversity and fitness in multiple environments». *BMC Evolutionary Biology* 10 (1): 205.
- Martínez-Cabrera, Hugo I, y Sergio R.S Cevallos-Ferriz. 2004. «New species of *Tapirira* (Anacardiaceae) from Early Miocene sediments of the El Cien formation, Baja California Sur, Mexico». *IAWA Journal* 25 (1): 103-17.
- McCarthy, C. 1996. «Chromas: version 1.3.» *Griffith University, Brisbane, Australia*.
- Mehrotra, R. C, D. L Dilcher, y N Awasthi. 1998. «A Palaeocene *Mangifera*-like leaf fossil from India». *Phytomorphology* 48 (1): 91-100.

- Meunier, C., Tirard C., S. Hurtrez-Boussès, P. Durand, M. D. Bargues, S. Mas-Coma, J. P. Pointier, J. Jourdane, y F. Renaud. 2001. «Lack of molluscan host diversity and the transmission of an emerging parasitic disease in Bolivia». *Molecular Ecology* 10 (5): 1333-40. doi:10.1046/j.1365-294X.2001.01284.x.
- Miller, Allison J., David A. Young, y Jun Wen. 2001. «Phylogeny and Biogeography of Rhus (Anacardiaceae) Based on ITS Sequence Data». *International Journal of Plant Sciences* 162 (6): 1401-7.
- Mondini, Linda, Arshiya Noorani, y Mario Pagnotta. 2009. «Assessing Plant Genetic Diversity by Molecular Tools». *Diversity* 1: 19-35.
- Montes, Camilo, G. Bayona, A. Cardona, D. M. Buchs, C. A. Silva, S. Morón, N. Hoyos, D. A. Ramírez, C. A. Jaramillo, y V. Valencia. 2012a. «Arc-continent collision and orocline formation: Closing of the Central American seaway». *Journal of Geophysical Research: Solid Earth* 117 (B4): B04105.
- Montes, Camilo, A. Cardona, R. McFadden, S.E. Morón, C.A. Silva, S. Restrepo-Moreno, D.A. Ramírez, et al. 2012b. «Evidence for middle Eocene and younger land emergence in central Panama: Implications for Isthmus closure». *Geological Society of America Bulletin*.
- Mostacero, José. 2010. *Fanerógamas del Perú: Taxonomía, Utilidad y Ecogeografía*. Vol. 1. Lima, Perú: Asamblea Nacional de Rectores.
- Muller, Jean. 1984. «Significance of fossil pollen for angiosperm history». *Annals of the Missouri Botanical Garden* 71 (2): 419-43.
- Neel, Maile C., y Norman C. Ellstrand. 2001. «Patterns of allozyme diversity in the threatened plant *Erigeron parishii* (Asteraceae)». *American Journal of Botany* 88 (5): 810-18.
- Nie, Ze-Long, Hang Sun, Ying Meng, y Jun Wen. 2009. «Phylogenetic analysis of *Toxicodendron* (Anacardiaceae) and its biogeographic implications on the evolution of north temperate and tropical intercontinental disjunctions». *Journal of Systematics and Evolution* 47 (5): 416-30.
- Nybom, Hilde. 2004. «Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants». *Molecular Ecology* 13 (5): 1143-55.
- Oliveira, Luiz Orlando De, Ana Aparecida Bandini Rossi, Ernane Ronie Martins, Flávia Reis De Carvalho Batista, Y Roberta Santos Silva. 2010. «Molecular phylogeography of *Carapichea ipecacuanha*, an amphitropical shrub that occurs in the understory of both semideciduous and evergreen forests». *Molecular Ecology* 19 (7): 1410-22. doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04591.x.
- Oviedo-Chávez, I, T Ramírez-Apan, M Soto-Hernández, y M Martínez-Vázquez. 2004. «Principles of the bark of *Amphipterygium adstringens* (Julianaceae) with anti-inflammatory activity». *Phytomedicine* 11 (5): 436-45.
- Oxelman, B, M Lidén, y D Berglund. 1997. «Chloroplast Rps16 intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae)». *Plant Systematics and Evolution* 206 (1-4): 393-410.
- Parfitt, Dan E., y Maria L. Badenes. 1997. «Phylogeny of the genus *Pistacia* as determined from analysis of the chloroplast genome». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (15): 7987 -7992.

- Pell, Susan K., John D. Mitchell, Porter P. Lowry, Armand Randrianasolo, y Lowell E. Urbatsch. 2011. «Phylogenetic Split of Malagasy and African Taxa of *Protorhus* and *Rhus* (Anacardiaceae) Based on cpDNA *TrnL–TrnF* and nrDNA ETS and ITS Sequence Data». *Systematic Botany* 33 (2): 375-83.
- Pell, Susan Katherine. 2004. «Molecular Systematics of the Cashew Family (Anacardiaceae)». PhD dissertation, USA: Louisiana State University.
- Pennington, R. Toby, Matt Lavin, Tiina Särkinen, Gwilym P. Lewis, Bente B. Klitgaard, y Colin E. Hughes. 2010. «Contrasting plant diversification histories within the Andean biodiversity hotspot». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (31): 13783 -13787.
- Pisha, Emily, Heebyung Chai, Ik-Soo Lee, Tangai E. Chagwedera, Norman R. Farnsworth, Geoffrey A. Cordell, Christopher W.W. Beecher, et al. 1995. «Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis». *Nat Med* 1 (10): 1046-51.
- Posada, D., y K. A. Crandall. 1998. «Modeltest: testing the model of DNA substitution». *Bioinformatics* 14 (9): 817-18.
- Qian, Keduo, Reen-Yun Kuo, Chin-Ho Chen, Li Huang, Susan L. Morris-Natschke, y Kuo-Hsiung Lee. 2010. «Anti-AIDS Agents 81. Design, Synthesis, and Structure–Activity Relationship Study of Betulinic Acid and Moronic Acid Derivatives as Potent HIV Maturation Inhibitors». *J. Med. Chem.* 53 (8): 3133-41.
- Rambaut, Andrew, y Alexei Drummond. 2009. *Tracer v1.5* (versión 1.5). United Kingdom.
- Ramírez, José L., y Sergio R. S. Cevallos-Ferriz. 2002. «A diverse assemblage of Anacardiaceae from Oligocene sediments, Tepexi de Rodríguez, Puebla, Mexico». *American Journal of Botany* 89 (3): 535 -545.
- Raven, John, y John Allen. 2003. «Genomics and chloroplast evolution: what did cyanobacteria do for plants?» *Genome Biology* 4 (3): 2091-95.
- Reed, David H., y Richard Frankham. 2003. «Correlation between Fitness and Genetic Diversity». *Conservation Biology* 17 (1): 230-37.
- Rieseberg, Loren H., Stuart J.E. Baird, y Keith A. Gardner. 2000. «Hybridization, introgression, and linkage evolution». *Plant Molecular Biology* 42 (1): 205-24. doi:10.1023/A:1006340407546.
- Rosas-Acevedo, Hortensia, Teresa Terrazas, Ma. Eva González-Trujano, Yolanda Guzmán, y Marcos Soto-Hernández. 2011. «Anti-ulcer activity of *Cyrtocarpa procera* analogous to that of *Amphipterygium adstringens*, both assayed on the experimental gastric injury in rats». *Journal of Ethnopharmacology* 134 (1): 67-73.
- Sahley, Catherine. 1996. «Bat and Hummingbird Pollination of an Autotetraploid Columnar Cactus, *Weberbauerocereus weberbaueri* (Cactaceae)». *American Journal of Botany* 83 (10): 1329-36.
- Sang, T, D J Crawford, y T F Stuessy. 1995. «Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: implications for biogeography and concerted evolution». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92 (15): 6813 -6817.
- Särkinen, Tiina E., Mark F. Newman, Paul J.M. Maas, Hiltje Maas, Axel D. Poulsen, David J. Harris, James E. Richardson, Alexandra Clark, Michelle Hollingsworth, y R. Toby

- Pennington. 2007. «Recent oceanic long-distance dispersal and divergence in the amphi-Atlantic rain forest genus *Renealmia* L.f. (Zingiberaceae)». *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44 (3): 968-80.
- Saxena, G, A.R McCutcheon, S Farmer, y G.H. N Towers. 1994. «Antimicrobial constituents of *Rhus glabra*». *Ethnopharmacol* 42: 95-99.
- Schlechtendal, DFL. 1843a. «Additamentum ad plantas Mexicanas a G. Schiede aliisque collectas: Juliania». *Linnaea*, n.º 17: 745-46.
- . 1843b. «De plantis Mexicanis a G. Schiede, M. Dr. Car. Ehrenbergio aliisque, collectis nuntium adfert D. F. L. de Schlechtendal». *Linnaea*, n.º 17: 625-40.
- Shaw, Joey, Edgar B. Lickey, Edward E. Schilling, y Randall L. Small. 2007. «Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III». *American Journal of Botany* 94 (3): 275 -288.
- Simpson, B, y M Ogorzaly. 2000. *Economic Botany: Plants in our World*. 3.^a ed. McGraw-Hill Science.
- Smith, Stephen A., y Michael J. Donoghue. 2008. «Rates of Molecular Evolution Are Linked to Life History in Flowering Plants». *Science* 322 (86): 86-89.
- Smith, Stephen A., y Casey W. Dunn. 2008. «Phyutility: a phyloinformatics tool for trees, alignments and molecular data». *Bioinformatics* 24 (5): 715-16.
- Soltis, P. S, y M. A Gitzendanner. 1999. «Molecular systematics and the conservation of rare species». *Conservation Biology* 13: 471-83.
- Schlechtendal, DFL. 1843a. «Additamentum ad plantas Mexicanas a G. Schiede aliisque collectas: Juliania». *Linnaea*, n.º 17: 745-46.
- Soria-Hernanz, David F., John M. Braverman, y Matthew B. Hamilton. 2008. «Parallel Rate Heterogeneity in Chloroplast and Mitochondrial Genomes of Brazil Nut Trees (Lecythidaceae) Is Consistent with Lineage Effects». *Molecular Biology and Evolution* 25 (7): 1282 -1296. doi:10.1093/molbev/msn074.
- Stern, William. 1952. «The Comparative Anatomy of the Xylem and the Phylogeny of the Julianiaceae». *American Journal of Botany* 39 (3): 220-29.
- Suh, Youngbae, Kweon Heo, y Chong-Wook Park. 2000. «Phylogenetic Relationships of Maples (*Acer* L.; *Aceraceae*) Implied by Nuclear Ribosomal ITS Sequences». *Journal of Plant Research* 113: 193-202.
- Swofford, D. L. 2003. «PAUP*4.0. Phylogenetic Analysis Using Parsimony». Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Taberlet, P, L Gielly, G Pautou, y J Bouvet. 1991. «Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA.» *Plant Molecular Biology* 17 (5): 1105-9.
- Tamura, K, D Peterson, N Peterson, G Stecher, M Nei, y S Kumar. 2011. «MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods». *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-39.
- Tamura, K., J. Dudley, M. Nei, y S. Kumar. 2007. «MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0». *Mol Biol Evol* 24: 1596 - 1599.

- Terborgh, John, y Blair Winter. 1983. «A method for siting parks and reserves with special reference to Columbia and Ecuador». *Biological Conservation* 27 (1): 45-58.
- Terrazas, Teresa. 1994. *Wood anatomy of the Anacardiaceae: ecological and phylogenetic interpretation*. University of North Carolina at Chapel Hill. USA.
- Thompson, Julie D, Toby J Gibson, Frédéric Plewniak, François Jeanmougin, y Desmond G Higgins. 1997. «The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools». *Nucleic Acids Research* 25 (24): 4876-82.
- Tsuru Tatsuya, Ishimi Katsuhiko, Kusama Koh, Fujimoto Yasuo, y Ichinohe Yoshiyuki. 1996. «Hair Tonic».
- Van der Hammen, Thomas. 2000. «Aspectos de Historia y Ecología de la Biodiversidad Norandina y Amazónica». *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias* 24 (91): 231-45.
- Vandewoestijne, Sofie, Nicolas Schtickzelle, y Michel Baguette. 2008. «Positive correlation between genetic diversity and fitness in a large, well-connected metapopulation». *BMC Biology* 6 (1): 46.
- Wannan, B. S, y C. J Quinn. 1988. «Biflavonoids in the julianiaceae». *Phytochemistry* 27 (10): 3161-62.
- Wannan, B.S. 2006. «Analysis of Generic Relationships in Anacardiaceae». *Blumea - Journal of Plant Taxonomy and Plant Geography* 51 (1): 165-95.
- Weberbauer, Augusto. 1945. *El mundo vegetal de los Andes peruanos, estudio fitogeográfico*. Lima, Perú: Estación Experimental Agrícola de la Molina.
- White, T., T. Bruns, S. Lee, y J. Taylor. 1990. «Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics». *PCR protocols: A Guide for Methods and Applications*, 315-22.
- Williams, P., D. Gibbons, C. Margules, A. Rebelo, C. Humphries, y R. Pressey. 1996a. «A Comparison of Richness Hotspots, Rarity Hotspots, and Complementary Areas for Conserving Diversity of British Birds». *Conservation Biology* 10 (1): 155-74.
- Williams, P., G. Prance, C. Humphries, y K. Edwards. 1996b. «Promise and problems in applying quantitative complementary areas for representing the diversity of some Neotropical plants (families Dichapetalaceae, Lecythidaceae, Caryocaraceae, Chrysobalanaceae and Proteaceae)». *Biological Journal of the Linnean Society* 58 (2): 125-57.
- Wolfe, K H, W H Li, y P M Sharp. 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.
- Xia, X., y Z. Xie. 2001. «DAMBE: Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution». *Journal of Heredity* 92 (4): 371 -373.
- Yi, Tingshuang, Allison J. Miller, y Jun Wen. 2007. «Phylogeny of Rhus (Anacardiaceae) Based on Sequences of Nuclear Nia-i3 Intron and Chloroplast trnC-trnD». *Systematic Botany* 32 (2): 379-91.
- Yi, Tingshuang, Jun Wen, Avi Golan-Goldhirsh, y Dan E. Parfitt. 2008. «Phylogenetics and reticulate evolution in Pistacia (Anacardiaceae)». *American Journal of Botany* 95 (2): 241 -251.

- Yli-Kauhaluoma, Jari, Sami Alakurtti, y Jaana Minkkinen. 2010. «Betulin derived compounds useful as antiprotozoal agents». USA. Patente Número: US 2010/0190795 A1.
- Yonemori, K., C. Honsho, S. Kanzaki, W. Eiadthong, y A. Sugiura. 2002. «Phylogenetic relationships of Mangifera species revealed by ITS sequences of nuclear ribosomal DNA and a possibility of their hybrid origin». *Plant Systematics and Evolution* 231 (1): 59-75. doi:10.1007/s006060200011.
- Yuan, Qing-Jun, Zhi-Yong Zhang, Hua Peng, y Song Ge. 2008. «Chloroplast phylogeography of Dipentodon (Dipentodontaceae) in southwest China and northern Vietnam». *Molecular Ecology* 17 (4): 1054-65. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03628.x.
- Yue, Jia-Xing, Jinpeng Li, Dan Wang, Hitoshi Araki, Dacheng Tian, y Sihai Yang. 2010. «Genome-wide investigation reveals high evolutionary rates in annual model plants». *BMC Plant Biology* 10 (1): 242.
- Zhang, Y. J., y C. Yang. 2000. «Comparative analysis of genetic diversity in the endangered shrub *Tetraena mongolica* and its related congener *Zygophyllum xanthoxylon*». *Acta Phytocologica Sinica* 24: 425 - 429.

11. Anexo

ANEXO. Números de acceso de las secuencias descargadas de la base de datos *GenBank* y empleadas en este estudio para cada marcador

Especie	ITS	TrnL	Rps16
GRUPO INTERNO			
<i>Abrahamia nitida</i>	AY594368.1	AY594432.1	AY594582.1
<i>Amphipterygium adstringens</i>		AY594496.1	AY594583.1
<i>Antrocaryon amazonicum</i>		AY594441.1	AY594584.1
<i>Apterokarpos gardneri</i>		AY594498.1	AY594585.1
<i>Astronium fraxinifolium</i>		AY594542.1	AY594586.1
<i>Astronium urundeuva</i>	DQ787397.1	AY594560.1	AY594613.1
<i>Bonetiella anomala</i>		AY594543.1	AY594587.1
<i>Bouea macrophylla</i>	AB071691.1	AY594500.1	AY594589.1
<i>Cardenasiodendron brachypterum</i>	Este estudio	Este estudio	Este estudio
<i>Choerospondias axillaris</i>	GQ434625.1	AY594544.1	AY594591.1
<i>Cotinus obovatus</i>		AY594546.1	AY594593.1
<i>Cyrtocarpa procera</i>		AY594548.1	AY594596.1
<i>Faguetia falcata</i>	EF089141.1	EF089151.1	AY594598.1
<i>Fegimanra africana</i>		AY594515.1	AY594599.1
<i>Gluta wallichii</i>		AY594516.1	AY594600.1
<i>Harpephyllum caffrum</i>		AY594518.1	AY594601.1
<i>Heeria argentea</i>	AY594379.1	EF089152.1	AY594603.1
<i>Lannea schweinfurthii</i>		AY594552.1	AY594605.1
<i>Loxopterygium grisebachii</i>	Este estudio	Este estudio	Este estudio
<i>Loxopterygium huasango</i>	Este estudio	Este estudio	Este estudio
<i>Loxostylis alata</i>	AY531201.1	AY594522.1	AY594607.1
<i>Mangifera andamanica</i>	AB598046.1	AB598013.1	AB598024.1
<i>Mangifera camptosperma</i>	AB598043.1	AB598010.1	AB598021.1
<i>Mangifera griffithii</i>	AB598045.1	AB598012.1	AB598023.1
<i>Mangifera indica</i>	AJ890466.1	AY594523	AY594608.1
<i>Mangifera odorata</i>	AB598044.1	AB598011.1	AB598022.1
<i>Mangifera zeylanica</i>	AB598042.1	AB598009.1	AB598020.1
<i>Metopium brownei</i>		AY594557.1	AY594609.1
<i>Micronychia macrophylla</i>	AY594380.1	AY594443.1	AY594610.1
<i>Micronychia tsiramiramy</i>		AY594524.1	AY594611.1
<i>Mosquitoxylum jamaicense</i>		AY594558.1	AY594612.1
<i>Operculicarya decaryi</i>	EF089143.1	AY594525.1	AY594614.1
<i>Orthopterygium huacui 1</i>		AY594526.1	AY594615.1
<i>Orthopterygium huacui 2</i>	Este estudio	Este estudio	Este estudio
<i>Pachycormus discolor</i>		AY594562.1	AY594616.1

Especie	ITS	TrnL	Rps16
<i>Pistacia chinensis</i>	DQ390466.1	AY594527.1	AY594617.1
<i>Pistacia texana</i>	Este estudio	Este estudio	Este estudio
<i>Pleiogynium timoriense</i>		AY594529.1	AY594618.1
<i>Protorhus longifolia</i>	EF089146.1	EF089153.1	AY594620.1
<i>Rhus ambigua</i>	AY510156.1	AB237364.1	AB237363.1
<i>Rhus aromatica</i>	EF682844.1	EF682859.1	AY594621.1
<i>Rhus chinensis</i>	EF682845.1	EF682860.1	AY594622.1
<i>Rhus copallina</i>	AY641483.1	AY640437.1	AY594623.1
<i>Rhus erosa</i>	AY594384.1	AY594448.1	AY594624.1
<i>Rhus lanceolata</i>	EF682846.1	AY594449.1	AY594625.1
<i>Rhus perrieri</i>	AY594369.1	EF089154.1	AY594626.1
<i>Rhus taratana</i>	EF089149.1	AY594568.1	AY594627.1
<i>Rhus thouarsii</i>	EF089150.1	AY594452.1	AY594628.1
<i>Rhus trilobata</i>	AY641497.1	AY640449.1	AY315038.1
<i>Rhus typhina</i>	EF682848.1	AY594453.1	AY594629.1
<i>Rhus virens</i>	EF682849.1	EF682861.1	AY594631.1
<i>Schinus areira</i>	AY531202.1	AY594572.1	AY594633.1
<i>Schinus molle</i>	Este estudio	Este estudio	Este estudio
<i>Schinus molle</i>	AY641512.1	AY640463.1	AJ416488.1
<i>Schinus terebinthifolius</i>	AY864894.1	JF804927.1	Este estudio
<i>Searsia undulata</i>	AY594387.1	AY594454.1	AY594630.1
<i>Semecarpus anacardium</i>		AY594575.1	AY594635.1
<i>Smodingium argutum</i>		AY594576.1	AY594636.1
<i>Sorindeia madagascariensis</i>	AY594388.1	AY594455.1	AY594637.1
<i>Tapirira bethanniana</i>		AY594578.1	AY594638.1
<i>Tapirira obtusa</i>		AY594579.1	AY594639.1
<i>Toxicodendron radicans</i>	FJ945919.1	AY594540.1	Pell 545
<i>Toxicodendron vernicifluum</i>	FJ945939.1	AY594580.1	AY594643.1
GRUPO EXTERNO			
<i>Bursera microphylla</i>	AF080060.1	GU246093.1	AY309289.1
<i>Canarium album</i>	DQ517524.1	FJ466464.1	AY635355.1