

**ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y DELIMITACIÓN
TAXONÓMICA EN EL GÉNERO *Gymnopodium* ROLFE
(POLYGONACEAE): DETECCIÓN DE UNA NUEVA
ESPECIE**

TESIS

**PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL
GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS EN MANEJO DE RECURSOS
NATURALES TROPICALES**

POR

**Licenciado en Biología
Juan José Ancona Aragón**

Asesores

Dr. Juan Javier Ortiz Díaz

Dr. Juan Tun Garrido

Mérida, Yucatán, México, Febrero de 2017

DECLARATORIA DE ORIGINALIDAD

“El presente trabajo no ha sido aceptado o empleado para el otorgamiento de título o grado diferente o adicional al actual. La tesis es resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indican las fuentes de información consultadas. El autor otorga su consentimiento a la UADY para la reproducción del documento con el fin del intercambio bibliotecario siempre y cuando se indique la fuente”.

“Aunque esto es locura, hay cierto método en lo que dice”

W. Shakespeare. Hamlet.

A mis princesas Briseida y Ariana

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer instante al **Dr. Juan Javier Ortiz Díaz** y al **Dr. Juan Tun Garrido**, mis Maestros y Directores de Tesis por todo el apoyo económico, académico y sobre todo por brindarme su amistad y conocimientos en la Sistemática y la Biogeografía. A ellos les debo el gran amor y pasión que tengo sobre los estudios botánicos.

A la **Dra. Miriam Ferrer** por el apoyo económico para los análisis moleculares y por enseñarme lo interesante e importante que son los datos moleculares en los estudios de sistemática. Y como parte de mi comité tutorial y del sínodo por hacer comentarios a esta tesis para mejorarla.

A mi amigo, compañero y colega **M. en C. José Luis Cámara** por aventurarse conmigo en las salidas al campo y por la elaboración de mapas que se presentan en esta tesis.

A la **M. en C. Norka Fortuny** y al **Biol. Edgar Balam** por su gran apoyo y paciencia en el Laboratorio para enseñarme las técnicas de la biología molecular.

A la **Maestra Rocío Ruenes** jefa del Laboratorio de Ecofisiología y Biodiversidad por permitir que utilizara las instalaciones y herramientas del laboratorio.

Al **Maestro Roberto Barrientos** y al **Dr. Juan Pablo pinzón**, integrantes de mi comité tutorial y el sínodo por sus acertados comentarios y críticas para mejorar esta tesis.

Agradezco los comentarios y sugerencias del comité sinodal para mejor los resultados obtenidos en este estudio: **Dra. Ivonne Sánchez del Pino** (Presidenta), **William May** (Suplente), **Luis Abdala Roberts** (suplente).

A los curadores de los herbarios **HEM, CHIP, CICY, XAL, UJAT, MEXU, MO, BM** por el préstamo de ejemplares para realizar este trabajo de investigación.

Al **Biol. Francisco “Paco” Hernández Najarro** curador del herbario CHIP por su valioso tiempo para acompañarme en las salidas de campo para coleccionar ejemplares de *G. floribundum* en las localidades de Chiapas.

Al **Dr. Efraín de Luna**, del Laboratorio de Morfometría del INECOL por la estancia de investigación en la cual me enseñó las técnicas de análisis filogenéticos utilizando datos morfométricos.

Un agradecimiento especial al **CONACYT** por la beca otorgada para realizar este posgrado que hoy culmina con la presentación de esta tesis.

Y en muy especial quiero agradecer **A mi familia** por apoyarme siempre en todas mis decisiones, y están conmigo en las buenas y en las malas.

A todos ustedes muchas gracias. Si olvidé agradecer a alguien, para la próxima será.

Gracias

RESUMEN

Gymnopodium Rolfe es un género monotípico de la familia Polygonaceae cuya historia taxonómica ha merecido el reconocimiento de tres especies y dos variedades con base en los caracteres morfológicos de la hoja y la flor. Sin embargo, estudios recientes reconocen solo una especie altamente polimórfica. La distribución de *Gymnopodium* es disyunta entre las provincias Bióticas de Mesoamérica: Península de Yucatán y Costa del Pacífico, asociadas con las selvas estacionalmente secas. Considerando la variación morfológica y la distribución geográfica documentadas y la falta de una evaluación sistemática de la variación morfológica y molecular en este género; el objetivo de este trabajo fue delimitar los taxones que integran el género *Gymnopodium* con base en caracteres morfológicos y moleculares. La propuesta taxonómica de Standley y Steyermark (*G. floribundum* var. *floribundum* y *G. floribundum* var. *antigonoides*.) y la inclusión de una posible especie nueva se consideraron como hipótesis a probar. El análisis morfométrico se hizo en ejemplares de herbario, con mediciones de 31 caracteres cuantitativos, dos caracteres de forma considerando 31 y 32 semimarcas en hoja y perianto, respectivamente, y 21 caracteres cualitativos. El DNA genómico se obtuvo de tejido foliar de plantas de poblaciones naturales se amplificó y secuenció para dos genes nucleares (*ITS* 782pb y *LEAFY* 647pb) y la región intergénica del cloroplasto (*trnC-rpoB* 1040pb). Para la reconstrucción filogenética se construyeron tres matrices con datos: 1) morfológicos, empleando una aproximación de máxima parsimonia. 2) moleculares empleando una aproximación bayesiana, y 3) conjuntos empleando ambas aproximaciones. La reconstrucción filogenética con datos morfológicos sugiere que las accesiones de *Gymnopodium* están incluidas en un clado con *Podopterus mexicanus*, y únicamente *G. floribundum* var. *floribundum* (Belize) y *G. floribundum* var. *antigonoides* (Calakmul and Santa Rosa Xtampak) están incluidas en un clado soportado con valores de bootstrap (B) and jackknife (J) superiores a 80. La reconstrucción con marcadores moleculares y datos conjuntos sugieren que *Gymnopodium* es un grupo monofilético con dos linajes genéticos en su interior soportados por valores superiores a 0.96 probabilidad posterior bayesiana. Con base en estos resultados, *Gymnopodium* comprende una nueva especie para el sur de Belice (*Gymnopodium* sp.) y una segunda especie *G. floribundum* s.s. que tiene una gran variación morfológica que se asocia a la distribución de la especie según lo reconocido por Standley and Steyermark.

Palabras claves: morfometría, DNA, *ITS*, *LEAFY*, *trnC-rpoB*, filogenia infraespecífica, *Gymnopodium*, *G. floribundum* var. *floribundum* and *G. floribundum* var. *antigonoides*

Summary

Gymnopodium Rolfe is a monotypic genus belonging to the Polygonaceae family; in its taxonomic history three species and two varieties were recognized based on the morphological traits of the leaf and flower. However, in most recent studies only a high polymorphic species was included in the genus. *Gymnopodium* has a disjunct distribution between the Yucatan Peninsula and Pacific Coast Biotic Provinces and is associated to the dry forest. Considering the morphological variation, the documented geographic distribution, and the lack of a systematic study of morphological and molecular variation in this genus, the goal of this study was to delimit the taxa belonging to the genus *Gymnopodium* considering both morphological and molecular traits. The hypothesis of Standley and Steyermark recognizing one species and two varieties (*G. floribundum* var. *floribundum* and *G. floribundum* var. *antigonoides*) and the inclusion of a new species was tested. Herbarium specimens were used to analyze morphometric variation on 31 quantitative, 2 shape traits considering 31 and 32 semilandmarks in leaf and perianth respectively, and 21 qualitative traits. Foliar tissue from individuals in eight natural populations was used to obtain genomic DNA for amplification and sequencing of two nuclear genes (*ITS* 782pb and *LEAFY* 647pb) and intergenic region of chloroplast (*trnC-rpoB* 1040pb). Three matrices were used to reconstruct the phylogeny: 1) morphometric data, using a maximum parsimony approach; 2) molecular data using a Bayesian approach; and 3) joint data using both approaches. Phylogenetic reconstruction with morphological traits shows that *Gymnopodium* accessions are included in a clade with *Podopterus mexicanus*, and only *G. floribundum* var. *floribundum* (Belize) and *G. floribundum* var. *antigonoides* (Calakmul and Santa Rosa Xtampak) are included in a monophyletic clade supported with bootstrap (B) and jackknife (J) values higher than 80. Reconstruction from molecular markers and joint data suggests that *Gymnopodium* is a monophyletic group with two genetic lineages within it, supported by a Bayesian posterior probability higher than 96. Based on the latter result *Gymnopodium* comprises a new species from the South of Belize (*Gymnopodium* sp.) and a second species *G. floribundum* s.s. that has large morphological variation that is associated with the distribution of the species as recognized by Standley and Steyermark.

Key words: morfometrics, DNA, *ITS*, *LEAFY*, *trnC-rpoB*, infraspecific phylogeny, *Gymnopodium*, *G. floribundum* var. *floribundum* and *G. floribundum* var. *antigonoides*

INDICE GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL	1
REVISIÓN DE LITERATURA	3
Delimitación de especies.....	3
El concepto de especie.....	3
Técnicas y métodos en la delimitación de especies.....	4
Filogenia infraespecífica: árbol de poblaciones.....	5
Los marcadores moleculares en la sistemática de plantas.....	6
La familia Polygonaceae Juss.....	7
El género <i>Gymnopodium</i> : Historia taxonómica.....	9
<i>Gymnopodium floribundum</i> Rolfe: Importancia ecológica y cultural.....	10
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	13
LITERATURA CITADA	14

ARTÍCULO

Análisis filogenético y delimitación taxonómica en el género <i>Gymnopodium</i> Rolfe (Polygonaceae)	21
ABSTRACT	22
INTRODUCCIÓN	23
MATERIALES Y MÉTODOS	25
Selección de las unidades de muestreo.....	25
Obtención de datos morfológicos.....	25
Extracción y amplificación del DNA.....	26
Análisis filogenético.....	27
RESULTADOS	28
DISCUSIÓN	29
LITERATURA CITADA	32
Anexo 1. Ejemplares revisados e incluidos en el análisis molecular.....	45
Anexo 2. Codificación de caracteres morfológicos cualitativos.....	43
CONCLUSIONES GENERALES	51

INDICE FIGURAS

Marco Teórico

Figura 1. Distribución geográfica de *Gymnopodium floribundum*.....12

Artículo

Figura 1. Mapa de ubicación de los sitios de colecta representando todo el área de distribución de *G. floribundum*.....37

Figura 2. Mejor árbol derivado de los datos morfológicos.....38

Figura 3. Análisis filogenético del género *Gymnopodium* utilizando inferencia bayesiana con base a tres regiones de DNA.39

Figura 4. Análisis filogenético del género *Gymnopodium* utilizando inferencia bayesiana con base a tres regiones de DNA y datos morfológicos.40

ÍNDICE CUADROS

Artículo

Cuadro 1. Ejemplares de *G. floribundum* colectados utilizados en los análisis filogenéticos.....41

Cuadro 2. Caracteres morfométricos utilizados en la matriz filogenética.....42

Cuadro 3. Marcadores moleculares utilizados y descripción de los cebadores.....43

Cuadro 4. Resumen estadístico de las secuencias de DNA.....44

INTRODUCCIÓN GENERAL

Las especies que se distribuyen en amplios rangos geográficos normalmente presentan variaciones morfológicas y reproductivas en respuesta a la heterogeneidad de los ambientes donde habitan y a las diferentes presiones selectivas ejercidas por factores bióticos (Beebee y Rowe, 2008). Además de la selección natural, el flujo génico, la endogamia y la deriva genética son agentes microevolutivos moldeadores de caracteres fenotípicos a escala geográfica (Pigliucci *et al.*, 2006). Es por ello que es fundamental conocer los patrones de variación morfológica y molecular a lo largo de la distribución geográfica de una especie, para poder relacionar esta variación con los procesos evolutivos que han tenido lugar tanto a una escala temporal reciente como pasada. De esta manera al comparar las relaciones evolutivas de los linajes con su distribución geográfica, es posible plantear hipótesis sobre los factores que han influido en los procesos de especiación (Vázquez-Domínguez *et al.*, 2009).

En términos biológicos, hablar de la variación geográfica es hablar de las diferencias genotípicas y/o fenotípicas entre las poblaciones de una especie como respuesta a presiones selectivas con base a la distribución en el espacio (Futuyma, 2006; Beebee y Rowe, 2008). El estudio de la variación geográfica entre las poblaciones siempre ha sido de mucho interés para los taxónomos que trabajan principalmente a nivel infraespecífico, pues permite establecer y cuantificar el patrón y el grado de diferenciación morfológica y molecular entre las poblaciones (Futuyma, 2006) y discernir en la clasificación.

Gymnopodium Rolfe (del griego *Gymno*= desnudo y *Pedis*= pie, pie desnudo) es un género monotípico de la familia Polygonaceae. Los tratamientos taxonómicos en el género han reconocido tres especies y dos variedades, documento de esta manera la variación morfológica (Blake, 1921; Standley y Steyermark 1946). Sin embargo, en el tratamiento taxonómico más reciente del género, Ortiz-Díaz (1994) reconoce a *G. floribundum* Rolfe como única especie. Morfológicamente, los arbustos o árboles pequeños de *Gymnopodium* se caracterizan por tener la corteza fisurada, las hojas son alternas cortamente pediceladas originándose en ócreas deciduas al madurar; las inflorescencias son racimos; las flores son hermafroditas con seis segmentos del perianto, tres exteriores de mayor tamaño que los tres interiores; el fruto es un aquenio (Ortiz-Díaz, 1994). Es originario de Mesoamérica siendo un componente principal de las selvas secas de México (Campeche, Chiapas, Quintana Roo, Oaxaca, Tabasco y Yucatán), Belice y Guatemala, desde el nivel del mar hasta los 1100 msnm. Por su abundancia es una de las plantas más importantes para la apicultura en la península de Yucatán

pudiendo ser utilizada como un marcador geográfico para la miel de la región (Alfaro-Bates *et al.* 2010).

La revisión reciente de ejemplares de herbario para Flora Mesoamericana, Ortiz-Díaz (en prensa) aun reconoce a *G. floribundum* como única especie. Sin embargo, se observaron patrones geográficos en la variación del indumento en el envés de las hojas que corresponden a lo que Standley y Steyermark (1946) han descrito como *G. floribundum* var. *floriundum* y *G. floribundum* var. *antigonoides*. De igual manera para los ejemplares del sur de Belice, se observaron caracteres que se salen del patrón descrito para *G. floribundum* pareciendo ser una especie distinta. Considerando la variación morfológica y la distribución disyunta de *Gymnopodium* en regiones biogeográficas distintas de Mesoamérica, así como la ausencia de un estudio estadístico y filogenético, el objetivo de este estudio es evaluar la variación morfológica y molecular utilizando métodos filogenéticos para delimitar y discernir entre los taxones propuestos por Standley y Steyermark (1946) y una posible especie nueva del sur de Belice.

REVISIÓN DE LITERATURA

Delimitación de especies

La delimitación de las especies surge con la necesidad de esclarecer problemas cuando encontramos poblaciones de organismos con leves diferencias entre ellos, particularmente aquellas diferencias que se permanecen constantes en una zona geográfica pero no en otra. Estas variaciones pueden ser de origen genético o simplemente respuestas al medio en el que se desarrolla la población (Morrone, 2013). Este problema repercute en los taxónomos en el momento de decidir si las diferencias observadas en las poblaciones obedecen a linajes realmente distintos o son meramente fluctuaciones de sus individuos (Pigliucci *et al.*, 2006). Para algunos investigadores estas diferencias no son tan importantes y consideran a las poblaciones como subespecies, pero otros investigadores podrían considerar importantes estas diferencias y describir a las poblaciones como especies distintas (de Haro, 1999).

La delimitación de especies es muy importante desde el punto de vista de la conservación, ecología, sistemática, genética y el manejo de las especies (Mace, 2004). Actualmente se han desarrollado varias técnicas y métodos efectivos para la determinación y clasificación exacta de las especies (Sites y Marshall, 2003). Estos métodos están siempre en función del concepto de especie utilizado. El desacuerdo en los conceptos de especie acarrea consigo también una falta de acuerdo sobre los métodos para la delimitación de las especies (Davis y Goldman, 1993). Para continuar con el tema de la delimitación de las especies se da paso a definir que es una especie y cuál de todos estos conceptos es el que vamos a utilizar en este trabajo.

El concepto de especie

El concepto de especie ha sido discutido a lo largo de la historia de la biología. Es un concepto que en su definición lleva implícito una carga muy pesada de pensamiento filosófico y epistemológico (Coyne y Orr, 2004). En la revisión más reciente sobre los conceptos de especie, Coyne y Orr (2004) han recopilado un total de 25 conceptos distintos de especie y la discusión de este concepto nos llevaría a la redacción completa de un libro, pero este no es el objetivo.

Después de una amplia revisión de literatura publicada sobre el concepto de especie, de Queiroz (1998, 2005, 2007) observa que estos conceptos no tienen congruencia entre sí, percatándose también que todos estos conceptos de especies tienen un elemento en común: todos ellos, de manera

explícita o implícita, equiparan especies con linajes de metapoblaciones que evolucionan por separado, donde una metapoblación es una población inclusiva formada por un conjunto de subpoblaciones conectadas y un linaje es una población extendida a través del tiempo o una serie de descendientes ancestrales, o bien, poblaciones limitadas instantáneas. A pesar de esta uniformidad conceptual general, las diversas definiciones de especie incompatibles difieren en el tratamiento de diferentes propiedades adquiridas por los linajes de metapoblaciones durante su divergencia como propiedades necesarias de las especies, es decir, como propiedades que un linaje de metapoblación debe poseer para ser considerado una especie (de Queiroz, 2007).

Todas las otras propiedades que anteriormente se han considerado propiedades adicionales necesarias de las especies deben ser reinterpretadas como propiedades eventuales en vez de necesarias de las especies, es decir, como propiedades que una especie puede o no adquirir durante el curso de su existencia. Sin embargo, estas propiedades contingentes conservan su importancia de dos maneras principales. En primer lugar, sirven como líneas de evidencia para inferir los límites y el número de especies. En segundo lugar, sirven como propiedades definitorias de las subcategorías de la categoría de especies más general (por ejemplo, especies aisladas de forma reproductiva, especies ecológicamente diferenciadas, especies monofiléticas, especies diagnosticables, etc.) y así identificar las especies más relevantes para abordar cuestiones biológicas particulares. Esta propuesta concilia así conceptos y definiciones de especies incompatibles alternativas sin negar la importancia de las propiedades que subyacen a sus diferencias. El resultado es un concepto general y unificado de especies (de Queiroz, 1998, 2005, 2007).

Para este trabajo partimos de que las especies son linajes de metapoblaciones (de Queiroz, 1998, 2005, 2007) que se van caracterizan por poseer una historia natural y ancestro en común que pueden ser diagnosticables a través de monofilias y caracteres únicos (Davis y Nixon, 1992).

Técnicas y métodos en la delimitación de especies

Actualmente se han desarrollado varias técnicas y métodos efectivos para una determinación y clasificación más exacta de las especies y taxones infraespecíficos. Estos métodos están siempre en función del concepto de especie utilizado. Entre los métodos utilizados para la delimitación y diferenciación taxonómica de las especies se encuentran los métodos filogenéticos y métodos no filogenéticos (Sites y Marshall, 2003). Sin embargo, recientemente ambos enfoques se han realizado

de manera conjunta para obtener mayor certeza y precisión en la delimitación de las especies (Camargo y Sites, 2012).

Los métodos filogenéticos se basan en los principios de la sistemática filogenética infiriendo monofilia y concordancia geográfica (Sites y Marshall, 2003 y 2004). Bajo este enfoque la clasificación y el reconocimiento de los linajes consisten en el descubrimiento de grupos monofiléticos, donde las apomorfías se consideran como la evidencia empírica necesaria para el reconocimiento de las especies filogenéticas (Mishler y de Luna, 1997; Wiley y Mayden, 2000).

Los métodos no basados en árboles, delimitan las especies con métodos basados en inferencias indirectas de la presencia o ausencia de flujo génico (Sites y Marshall, 2003 y 2004) utilizando como herramientas los estadísticos multivariados (Morrone, 2013), algunos de los más utilizados son los análisis de componentes principales, análisis de coordenadas principales, análisis cluster, análisis discriminantes, análisis de correspondencia canónica, entre otros. Ambos métodos utilizan una variedad de datos como los morfológicos y los moleculares. A diferencia de estos métodos no basados en árboles no permiten hipotetizar procesos evolutivos como lo sugieren con los métodos filogenéticos.

Filogenia infraespecífica: árbol de poblaciones

Los análisis filogenético por debajo del nivel de especies han sido ampliamente utilizados en los últimos años usando como terminales variedades o subespecies reconocidas taxonómicamente (ej.: Kaessmann, Wiebe y Paabo, 1999; Won y Hey, 2003). Sin embargo su interpretación en la mayoría de los casos es errónea desde el punto de vista filogenético (Velasco, 2013). A principios de la década de 1990, Vrana y Wheeler (1992) propusieron utilizar como terminales en los análisis filogenéticos individuos o poblaciones con variación morfológica limitada a regiones geográficas o biogeográficas, aunque esta propuesta no fue aceptada en la práctica empírica. Sin embargo, Velasco (20013) reconoce que los análisis filogenéticos por debajo del nivel de especies sí son posibles, pues permite conocer la historia evolutiva de la especie sin inferir relaciones filogenéticas. De igual forma, aun cuando Templeton (2002, 2005, 2007, 2007a) ha argumentado contra varios árboles de la población de los seres humanos, él no discute que estos árboles de poblaciones son sin sentido; más bien, considera que sí son significativos y tienen implicaciones genealógicas, implicaciones que han sido repetidamente probadas con otras técnicas (filogeografía y estructura poblacional).

Algo importante de recalcar cuando se realizan análisis filogenéticos de poblaciones o infraespecies es que no se puede hablar de poblaciones monofiléticas, y otros conceptos adaptados a la filogenia como sinapomofía, homología, convergencia, etc. En todo caso si los individuos representantes de poblaciones y taxones infraespecíficos forman grupos monofiléticos, con estados sinapomórficos y/o apomórficos estaríamos hablando entonces de linajes y deberían ser reconocidos como especies distintas, considerando el concepto filogenético de especie (Davis y Nixon, 1992) y posteriormente interpretar su relaciones filogenéticas. Puesto que los individuos de una población son exclusivos y naturales, es decir, los individuos de la población A estarán más relacionados con otros individuos de la misma población A que con los individuos de la población B (Velasco, 2012 y 2013).

Por lo tanto al analizar la variación infraespecífica se representa la historia evolutiva de las poblaciones (tociogenia) (Henning, 1966), pues las variedades, subespecies o poblaciones siguen siendo parte de una especie que reticula (en la mayoría de los casos). La divergencia de los linajes a través del tiempo es un proceso continuo sin umbrales evidentes. En el fondo tenemos *demes* locales con poca o ninguna estructura de acoplamiento, moviéndose a poblaciones más grandes, especialmente aquellas con patrones geográficos, obteniendo una estructura de apareamiento dentro de las poblaciones. Cuando esta estructura persiste a través del tiempo, los patrones filogenéticos comienzan a emerger. Las poblaciones se dividen y, con el tiempo, el flujo genético se reduce y los patrones se refuerzan; las diferencias significativas evolucionan en una población pero no en otra y algunos sistemáticos reconocerían una nueva especie (Velasco 2012, 2013).

Los marcadores moleculares en la sistemática de plantas

Un marcador, como su nombre lo indica es una marca o carácter morfológico, genético, bioquímico o cualquier otro rasgo particular que posee un organismo, población o especie que lo distingue de otros. Un marcador molecular es una sección del genoma el cual es tratado como un solo locus (Beebe y Rowe, 2008). En la biología evolutiva y en la taxonomía los marcadores moleculares son herramientas de gran importancia en conjunto con los datos morfológicos para la reconstrucción filogenética y la delimitación de especies, tradicionalmente se han utilizado las secuencias de los genes del DNA ribosomal y del DNA de cloroplastos (Chase *et al.*, 2005; Zimmer y Wen, 2012) así como también datos obtenidos con otras técnicas como los RAPD, AFLP, ISSR entre otros (Poczai *et al.*, 2013).

Reciente mente el usos de las regiones espaciadores no codificantes del cloroplasto (Shaw *et al.*, 20005 y 2007) así como las regiones de genes codificantes de proteínas como el *rbcL* y el *matK* (Chase *et al.*, 2007) han sido utilizados con mayor frecuencia. Las regiones no codificantes del genoma del cloroplasto es un recurso de datos primarios para la sistemática molecular, filogeografía y genética de poblaciones de plantas. Los genes de cloroplastos tienen la propiedad que casi siempre son de herencia uniparental y en su mayoría de los casos, por la vía materna (Nybom, Weising & Rotter, 2014). Tienen un rango de tamaño de 120 a 170 kilobase (kb) y existe un grado relativamente alto de conservación en el tamaño, estructura y contenido del gen. Los genes de cloroplastos se dividen en tres categorías de acuerdo a sus funciones: 1) genes codificantes de proteínas, 2) intrones y 3) espaciadores intergénicos. Estos dos últimos no codifican proteínas y son llamados regiones no codificantes (Shaw *et al.*, 2007). En las dos revisiones de Shaw y colaboradores (2005, 2007) se han detectado un total de 21 regiones de DNA de cloroplastos utilizados con mayor frecuencia en los estudios de taxonomía en los linajes de las angiospermas.

Los estudios filogenómicos en plantas para la identificación de cientos de genes nucleares han transformado las investigaciones de la biología evolutiva y la sistemática molecular (Zimmer y Wen, 2012). El genoma nuclear contiene información importante y de alta variación dentro y entre especies de plantas. A finales de los años noventa los genes nucleares únicos y de bajas copias han propiciado significativamente una mayor cantidad de caracteres informativos para las filogenias. En la actualidad las secuencias nucleares son complementados con datos secuenciados del genoma del DNA ribosomal y del DNA de cloroplasto (Zimmer y Wen, 2012).

La familia Polygonaceae Juss.

La familia Polygonaceae fue reconocida por primera vez como un grupo natural por Jussieu (1789). Su reconocimiento se basó en caracteres morfológicos como la presencia de ócreas, óvulo basal, perianto compuesto de cinco a seis tépalos y la presencia del fruto aquenio. Esta familia tiene distribución cosmopolita, es particularmente diversa en regiones de clima templado, aunque también se encuentra bien representada en los trópicos y subtropicos. Comprende aproximadamente de 40 a 50 géneros y entre 800 y 1100 especies de árboles, arbustos, lianas y herbáceas (Brandbyge, 1993; Freeman y Reveal, 2005).

Las formas de crecimiento dentro de la familia varían de herbáceas anuales o perennes, rara vez trepadoras, ocasionalmente arbustos o árboles. Los tallos a menudo engrosados en los nudos,

entrenados sólidos o huecos; hojas generalmente alternas y dispuestas en espiral o dísticas, en ocasiones opuestas, verticiladas o todas basales. Las flores por lo general pequeñas, generalmente hermafroditas, aunque algunos pueden presentar flores imperfectas, perianto de 4 a 6 tépalos, solitarias o agrupadas en fascículos, llevando en la base una especie de involucre membranáceo (ocréola), estos conjuntos son axilares o dispuestos en inflorescencias determinadas, axilares o terminales, en forma de espigas, racimos o panículas. Los frutos son aquenios, frecuentemente encerrado por el verticilo externo acrescente del perianto (Freeman y Reveal, 2005, Ortiz-Díaz, 1994, Lamb-Frye y Kron, 2003).

Los datos morfológicos y moleculares han permitido clasificar a Polygonaceae en el orden Caryophyllales (Simpson, 2006) y en el suborden Polygonineae, formando un grupo monofilético con Plumbaginaceae Juss., Droseraceae Salisb. y Nepenthaceae Dumort. (Soltis *et al.*, 2000; Judd *et al.*, 2008). El clado Polygonaceae es hermano de Plumbaginaceae con quien comparte caracteres moleculares y morfológicos como el óvulo basal y los frutos indehiscentes (Lledo *et al.*, 1998; Soltis *et al.*, 2000).

En Polygonaceae se han aceptado tradicionalmente dos subfamilias con base a la evidencia morfológica: Eriogonoideae Arn. y Polygonoideae Eaton. Eriogonoideae se distingue de Polygonoideae por la presencia de involucros que rodean a las flores, ausencia de ócreas y por los nudos no engrosados (Brandbyge, 1993; Freeman y Reveal, 2005). Sin embargo, utilizando datos morfológicos y gen *rbcL* de cloroplasto, Lamb-Frye y Kron (2003) demostraron que no existe suficiente evidencia para conservar la delimitación de estas dos subfamilias. El estudio de Sanchez y Kron (2008) coincide con el de Lamb-Frye y Kron (2003), identificando dos grandes clados dentro de la familia pero sus integrantes no corresponden a los aceptados en las dos subfamilias previamente aceptadas. Con el incremento del número de muestras y de datos moleculares y morfológicos permitió el reconocimiento de tres subfamilias: Eriogonoideae, Polygonoideae y Symmerioideae Prodr. (Burke *et al.*, 2010; Burke y Sánchez, 2011). Incluyendo la transferencia de varios géneros que se consideraban parte de Polygonoideae a Eriogonoideae, principalmente los géneros leñosos de zonas tropicales de la tribu Triplarideae C. A. Mey y Coccolobeae Dumort. como lo habían sugerido estudios anteriores.

Otros estudios han confirmado el clado Eriogonoideae como un grupo monofilético y el clado Polygonoideae como grupo parafilético (Russell, 2003; Sanchez y Kron, 2008; Sanchez, Schuster

y Kron, 2009; Burke *et al.*, 2010). Y aun cuando varios clados dentro de la familia han perdido ciertos rasgos característicos, por ejemplo las ócreas en el género *Eriogonum*, Polygonaceae es una familia monofilética (Chase *et al.*, 1993; Lledo *et al.*, 1998; Lamb-Frye y Kron, 2003; Burke y Sanchez, 2011). Sin embargo, la relación de los clados dentro del grupo varía de acuerdo con los caracteres morfológicos y moleculares utilizados en los análisis, lo que hace confuso esclarecer los grupos basales y como éstos han evolucionado.

Biogeográficamente la familia está integrada por tres grandes clados (Burke y Sanchez, 2011): 1) Eriogonoideae con géneros que en su mayoría son leñosos (árboles, arbustos y lianas) de las regiones tropicales del nuevo mundo, 2) Polygonoideae con géneros herbáceos de las regiones de climas templados y 3) Symmerioideae un solo género que se distribuye en la amazonia brasileña y el oeste africano.

El género *Gymnopodium*: historia taxonómica

El género *Gymnopodium* fue descrito por Rolfe (1901) con la especie *G. floribundum*. Esta descripción corresponde a un espécimen colectado en Manatee, Pine Ridge, British Honduras (Belize) por E. J. F. Campbell. En esta descripción Rolfe menciona que *Gymnopodium* es muy parecido al género *Podopterus* Bonpl. y ambos pertenecen a la tribu Triplariaceae. En los análisis filogenéticos más recientes empleando datos moleculares y morfológicos definen la monofilia de *Gymnopodium* clasificándolo como grupo hermano de la Tribu Eriogoneae Dumort. y el único representante de la tribu Gymnopodieae Jan. M. Burke & Adr. Sanchez (Burke *et al.*, 2010; Burke y Sanchez, 2011).

En el año de 1905, el botánico y micólogo estadounidense Benjamin L. Robinson durante la revisión de la familia Polygonaceae describe a *Millspaughia* B. L. Rob. como un género nuevo con dos especies: *M. antigonoides* B. L. Rob. y *M. ovatifolia* B. L. Rob. Ambas especies fueron descritas de ejemplares colectados en el puerto de Progreso, Yucatán por C. F. Millspaugh el 5 de marzo de 1899. Los ejemplares tipo se encuentran depositados en Museo de Historia Natural de Chicago (F). Con base a las características florales Robinson enfatiza que *Millspaughia* es muy similar *Antigonum* Rchb.

El nombre del género fue dedicado al profesor Charles Frederick Millspaugh, quien es colector de los ejemplares tipos y por su destacada labor en el estudio de la vegetación y la flora de la península de Yucatán. El epíteto específico de *M. antigonoides* hace referencia al parecido que observó

Robinson entre *Millspaughia* y *Antigonum*, principalmente en la estructura floral. En *M. ovatifolia* el nombre específico se refiere a la forma ovada de la lámina foliar. Es importante recalcar que de esta especie solo se conoce el ejemplar tipo. Sin embargo, en la monografía de Blake (1921) sobre la descripción de *Neomillspaughia* S. F. Blake como género nuevo y su relación con otros géneros de Polygonaceae, transfiere las especies *M. antigonoides* y *M. ovatifolia* al género *Gymnopodium*, proporcionado la siguiente clave para su identificación:

Hojas glabras _____ *G. floribundum*

Hojas pubescentes al menos cuando jóvenes

Hojas obovadas u ovals, obtusas o redondeadas, base del perianto exterior cordado _____ *G. antigonoides*

Hojas obovadas u ovals, aguda, base del perianto exterior no cordado _____ *G. ovatifolium*

Dos décadas después, durante la revisión de la familia Polygonaceae en la Flora de Guatemala Standley y Steyermark (1946) observaron la existencia de variación en la forma y en el indumento de las hojas de *G. floribundum* y consideran que *G. antigonoides* (B. L. Rob.) S. F. Blake es una variedad de *G. floribundum* y *G. ovatifolium* (B. L. Rob.) S. F. Blake no es más que una forma de *G. floribundum*. De esta manera ellos reconocieron para Guatemala una especie con dos variedades: *G. floribundum* var. *floribundum* y *G. floribundum* var. *antigonoides* (B. L. Rob.) Standl. & Steyermark. Y en el más reciente tratamiento taxonómico de la familia Polygonaceae que incluye una revisión del género *Gymnopodium* es el de Ortiz-Díaz (1994) para la flora de la península de Yucatán. Esta revisión es la más completa, pues incluye la revisión de varios ejemplares de la península de Yucatán, incluyendo de Belice y Guatemala. Ortiz-Díaz coincide con Standley y Steyermark (1946) en que los caracteres utilizados por Blake (1921) para diferenciar las especies son muy variables entre y dentro de las poblaciones, reconociendo como única especie altamente polimórfica a *G. floribundum*.

***Gymnopodium floribundum*: importancia ecológica y cultural**

Actualmente *G. floribundum* es la única especie reconocida en el género, nativa de la región mesoamericana (Figura 1), se distribuye desde el nivel del mar hasta los 1010 m. En la península de Yucatán es conocida con el nombre maya de ts'its'ilche (árbol que se pela varias veces o árbol que tira su corteza).

El ts'its'ilche es una de las especies que se encuentra con mayor distribución y abundancia en las selvas secas primarias y secundarias de la península de Yucatán formando poblaciones puras. Esta especie tiene la capacidad de retoñar y crecer rápidamente después de perturbaciones antropogénicas (González-Iturbe *et al.*, 2002; Cecom *et al.*, 2002), lo que sugiere que presenta estrategias que le confieren cierta resistencia al fuego (Levy-Tacher *et al.*, 1995). Martínez *et al.* (2001) reportaron la especie *G. floribundum* como dominante en un tipo de vegetación denominado matorral tropical sabanero en la región de Calakmul. En la región del Petén guatemalteco las poblaciones se encuentran distribuidas en selvas secas, mientras que en Belice esta especie se distribuye con mayor frecuencia en las sabanas estacionales y en menor grado se reportan para las selvas secas (Goodwin *et al.*, 2013).

En el área maya de la península de Yucatán, Guatemala y Belice se ha observado al ts'its'ilche como un árbol hospedero de muchas plantas epífitas principalmente especies de Orchidaceae y Bromeliaceae. También es una de las especies más importantes para a la apicultura por la alta producción de néctar y polen (Ortiz-Díaz, 1994). Aun cuando presenta muchos beneficios ecológicos su madera es cortada para ser utilizado como combustible (Quiroz-Carranza y Orellana, 2010), una de las principales amenazas que provoca la disminución de sus poblaciones.

En las selvas bajas caducifolias de la región central de Chiapas, los árboles de *G. floribundum* son conocidos como nangañas o nangaños y colectivamente la asociación vegetal con dominancia de esta especie es llamada nangañal (Bandala *et al.*, 2014), lo cual es equivalente al aguanal o aguanacatonal como lo describe Miranda (1952).

En esta región de Chiapas los nangañas presentan una estrecha relación ecológica con *Tremelloscypha gelatinosa*, un hongo comestible. En el sotobosque de estos nangañales se propicia la presencia de esporomas, razón por la que los habitantes del lugar asocian a estos hongos con esta asociación vegetal. La marcada presencia de *T. gelatinosa* bajo los árboles de *G. floribundum* quizá sea un indicador de que formen algún tipo de micorriza. Además de este hongo, el nangañal alberga también una comunidad de hongos ectomicorrizógenos de los géneros *Amanita*, *Cantharellus*, *Inocybe*, *Lactarius* y *Russula*, lo que podría considerarse como un buen indicador del valor ecológico del sistema de redes de micorrizas bajo los árboles de *G. floribundum* y de la importancia de esta especie arbórea que domina en la región formando asociaciones que cubren extensiones relativamente amplias aunque actualmente fragmentadas (Bandala *et al.*, 2014). Es importante mencionar que en el

área de la península de Yucatán, Belice y Guatemala este tipo de asociación entre *G. floribundum* con alguna especie de hongo ectomicorrizógeno na ha sido reportado.



Figura 1. Distribución geográfica de *Gymnopodium floribundum*.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

La variación morfológica, los datos moleculares y la distribución en regiones biogeográficas distintas de las poblaciones del género *Gymnopodium* son evidencia filogenética suficiente para reconocer a *G. floribundum* var. *floribundum*, *G. floribundum* var. *antigonoides* y las poblaciones del sur de Belice como distintos linajes (especies).

Objetivo general.

- Identificar los linajes filogenéticos que integran el género *Gymnopodium*.

Objetivos específicos.

- Analizar los caracteres morfológicos y moleculares en el género *Gymnopodium* utilizando métodos filogenéticos.
- Interpretar las relaciones filogenéticas entre los linajes resultantes.

LITERATURA CITADA

1. Alfaro Bates RG, González Acereto JA, Ortiz-Díaz JJ, Viera Castro FA, Burgos Pérez AI, Martínez Hernández E, Ramírez Arriaga E. 2010. Caracterización palinológica de las mieles de la península de Yucatán. UADY-CONABIO. Mérida, Yucatán.
2. Bandala VM, Montoya L, Villegas R, Cabrera TG, Gutiérrez MJ, Acero T. 2014. "Nangañaña" (*Tremelloscypha gelatinosa*, Sebacinaceae), hongo silvestre comestible del bosque tropical deciduo en la Depresión Central de Chiapas, México. *Acta Botánica Mexicana* 106: 149-159.
3. Beebe TJC, Rowe G. 2008. *An introduction to molecular ecology*. New York: Oxford University Press. Second Edition.
4. Blake SF. 1921. *Neomillspaughia*, a new genus of Polygonaceae, with remarks on related genera. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 48 (3): 77-88.
5. Brandbyge J. 1993. Polygonaceae. In: Kubitzki K, ed. *The families and genera of vascular plant*. Berlin: Springer, 531-541.
6. Burke MJ, Sánchez A. 2011. Revised subfamily for Polygonaceae, with a tribal classification for Eriogonoideae. *Brittonia* 63 (4): 510-520.
7. Burke JM, Sánchez A, Kron KA, Luckow M. 2010. Placing the woody tropical genera of Polygonaceae: A hypothesis of character evolution and phylogeny. *American Journal of Botany* 97: 1377-1390.
8. Camargo A, Sites JJr. 2013. Species delimitation: a decade after the renaissance. In: Pavlinov IY, ed. *The species problem-ongoing issues*. Croatia: Intech, 225-247.
9. Carstens BC, Pelletier TA, Reid NM, Satler JD. 2013. How to fail at species delimitation. *Molecular Ecology* 22: 4369-4383.
10. Ceccon E, Olmsted I, Vázquez-Yanes C, Campo-Alves J. 2002. Vegetation and soil properties in two tropical dry forest of differing regeneration status in Yucatán. *Agrociencia* 36: 621-631.
11. Chase MW, Soltis DE, Olmstead RG, Morgan D, Les DH, Mishler BD, Duvall MR, Price RA, Hills HG, Qui YL, Kron KA, Rettig HJ, Conti E, Palmer JD, Manhart JR, Systma KJ, Michaels HJ, Kress WJ, Karol KG, Clark WD, Heden M, Gaut BS, Jansen RK, Kim KJ, Wimpee KJ, Smith JF, Furnier GR, Strass SH, Xiang QY, Plunkett GM, Soltis PS, Swenson SM, Williams SE, Gadek PA, Quinn CJ, Eguiarte JE, Golenberg E, Learn GHJR, Graham SW, Barrett SCH,

- Dayanandan S, Albert VA. 1993. Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcL*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80: 528–580.
12. Chase MW, Salamin N, Wilkinson M, Dunwell JM, Kesanakurthi RP, Haidar N, Savolainen V. 2005. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360: 1889-1895.
 13. Coyne JA, Orr HA. 2004. Speciation. Sunderland, Massachusetts: Sinauer associates Inc.
 14. Davis JI, Nixon KC. 1992. Populations, genetic variation, and the delimitation of phylogenetic species. *Systematic Biology* 41(4): 421-435.
 15. Davis JI, Goldman DH. 1993. Isozyme variation and species delimitation among diploid populations of the *Puccinellia nuttalliana* complex (Poaceae): character fixation and the discovery of phylogenetic species. *Taxon* 43(3): 585-599.
 16. de Haro JJ. 1999. ¿Qué es una especie? *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa* 26: 105-112.
 17. de Queiroz K. 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: A conceptual unification and terminological recommendations. In: Howard D J, Berlocher SH, Eds. *Endless forms: Species and speciation*. New York: Oxford University Press.
 18. de Queiroz K. 2005. A unified concept of species and its consequences for the future of taxonomy. *Proceedings of the California Academy Sciences* 56: 196–215.
 19. de Queiroz K. 2007. Species Concepts and Species Delimitation. *Systematic Biology* 56(6): 879–886.
 20. Freeman CC, Reveal JL. 2005. Polygonaceae. In: Flora of North America Editorial Committee Ed. *Flora of North America* Vol. 14. New York: Oxford University Press, 216-601.
 21. Futuyma DJ. 2006. *Evolution*. Sunderland, Massachusetts, Sinauer Associates, INC Publishers.
 22. González-Iturbe JA, Olmsted I, Tun-Dzul F. 2002. Tropical dry forest recovery after long term Henequen (sisal, *Agave fourcroydes* Lem.) plantation in northern Yucatán, Mexico. *Forest Ecology y Management* 167:67-82.
 23. Henning W. 1966. *Phylogenetics Systematics*. University of Illinois Press. Urbana.
 24. Kaessmann H, Wiebe V, Paabo S. 1999. Extensive nuclear DNA sequence diversity among
 25. chimpanzees. *Science* 286: 1159–1162.

26. Judd WS, Campbell ChS, Kellogg EA, Stevens PF, Donoghue MJ. 2008. *Plant systematics: A phylogenetic approach*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Third edition.
27. Lamb-Frye AS, Kron KA. 2003. rbcL Phylogeny and character evolution in Polygonaceae. *Systematic Botany* 28: 326-332.
28. Levy-Tacher S, Hernández-Xolocotzi E, García-Moya E, Castillo-Morales A. 1995. Estudio de la sucesión secundaria bajo roza-tumba-quema en Yucatán. En: Hernández-Xolocotzi E, Bello E, Levy-Tacher S, Eds. *La milpa en Yucatán: un sistema agrícola tradicional*. Mexico, D.F.: Colegio de Postgraduados, 149-169.
29. Lledo DM, Crespo MB, Cameron KM, Fay MF, Chase MW. 1998. Systematics of Plumbaginaceae based upon cladistic analysis of rbcL sequence data. *Systematic Botany* 23: 21–29.
30. Mace GM. 2004. The role of taxonomy in species conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B, Biological Sciences* 359: 711–719.
31. Martínez E, Sousa M, Ramos-Álvarez CH. 2001. *Listados florísticos de México XXII. Región de Calakmul, Campeche*. Mexico, D. F.: Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México.
32. Miranda F. 1952. *La vegetación de Chiapas*. México: Ediciones del Gobierno de Chiapas.
33. Mishler BD, de Luna E. 1997. Sistemática filogenética y el concepto de especie. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60:45-57.
34. Morrone JJ. 2013. *Sistemática fundamentos, métodos, aplicaciones*. México, D. F.: UNAM.
35. Nybom H, Weising K, Rotter B. 2014. DNA fingerprinting in botany: past, present, future. *Investigative Genetics* 5:1-35.
36. Ortiz-Díaz JJ. 1994. Polygonaceae. *Etnoflora Yucatanense* 10. Mérida: Universidad Autónoma de Yucatán.
37. Pigliucci M, Courtney JM, Schlichting CD. 2006. Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *The Journal of Experimental Biology* 209: 2362-2367.
38. Poczai P, Varga I, Laos M, Cseh A, Bell N, Valkonen JP, Hyvönen J. 2013. Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. *Plant Methods* 9: 1-32.
39. Quiroz-Carranza J, Orellana R. 2010. Uso y manejo de leña combustible en viviendas de seis localidades de Yucatán, México. *Madera y bosques* 16(2), 47-67.

40. Robinson B L. 1905. Polygonaceae. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 36: 13-15.
41. Rolfe RA. 1901. *Gymnopodium floribundum*. *Hooker's Icones Plantarum* 27:2699.
42. Russell AD. 2003. *Phylogenetic analysis and morphological study of the subfamily Eriogonoideae (Polygonaceae) with an emphasis on the genus Chorizanthe*. Unpublished D. Phil. Thesis, San Diego, California: San Diego State University.
43. Sánchez A, Kron KA. 2008. Phylogenetics of Polygonaceae with an emphasis on the evolution of Eriogonoideae. *Systematic Botany* 33(1): 87-96.
44. Shaw, J., E. Lickey, J. T. Beck, S. B. Farmer, W. Liu, J. Miller, K. C. Siripun, C. T. Winder, E. E. Schilling, And R. L. Small. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92: 142–166.
45. Shaw, J., Lickey, E.B., Schilling, E.E., Small, R.L., 2007. Comparison of whole chloroplast sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94, 275–288.
46. Sites JW, Marshall JC. 2003. Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology & Evolution* 18: 462–70.
47. Sites JW, Marshall JC. 2004. Operational criteria for delimiting species. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 35: 199-227.
48. Standley PC, Steyermark JA. 1946. *Flora de Guatemala*. Fieldiana: Botany. Vol. 24. Parte IV. Chicago Natural History Museum. USA.
49. Templeton AR. 2002. Out of Africa again and again. *Nature* 416: 45–51.
50. Templeton, AR. 2007. Haplotype trees and modern human origins. *Yearbook of Physical Anthropology* 48:33-59.
51. Templeton A.R. 2007a. Genetics and recent human evolution. *Evolution* 61: 1507–19.
52. Vázquez-Domínguez E, Castañeda-Rico S, Garrido-Garduño T, Gutiérrez-García TA. 2009. Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Revista Chilena de Historia Natural* 82: 277-297.
53. Vrana P, Wheeler W. 1992. Individuals as terminal entities: laying the species problema to rest. *Cladistics* 8: 67-72.

54. Velasco, J.D. 2012. The future of systematics: tree thinking without the tree. *Philosophy of Science* 79: 624–636.
55. Velasco, J.D. 2013. Phylogeny as population history. *Philos Theor Biol* 5:e402
56. Wiley EO, Mayden, R. 2000. The evolutionary species concept. In Wheeler, Q.D. and Meier, R., eds. *Species Concepts and Phylogenetic Theory: A Debate*. pp. 70–89, Columbia University Press.
57. Won YJ, Hey J. 2005. Divergence population genetics of chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 22: 297–307.
58. Zimmer EA, Wen J. 2012. Using nuclear gene data for plant phylogenetics: Progress and prospects. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 65: 774–785.

ARTÍCULO:

**Análisis filogenético y delimitación taxonómica en el género
Gymnopodium Rolfe (Polygonaceae): detección de una nueva especie**

Elaborado bajo las norma editoriales del Botanical Journal of the Linnean Society

Análisis filogenético y delimitación taxonómica en el género *Gymnopodium* Rolfe

(Polygonaceae): detección de una nueva especie

Juan José Ancona*¹, Juan Javier Ortiz Díaz¹, Efraín de Luna², Miriam Monserrat Ferrer Ortega³ y

Juan Tun Garrido¹

1 Departamento de Botánica, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán.

2 Departamento de Sistemática y Biodiversidad, Instituto de Ecología A.C.

3 Departamento de Manejo y Conservación de Recursos Naturales Tropicales, Campus de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Universidad Autónoma de Yucatán.

Análisis filogenético en *Gymnopodium*

Abstract

Gymnopodium Rolfe is a monotypic genus belonging Polygonaceae family; three species and two varieties have been recognized based on the morphological traits of the leaf and flower. The goal of this study was to delimit the taxa belonging to the genus *Gymnopodium* considering both morphological and molecular traits. Herbarium specimens were used to analyze morphometric variation on 31 quantitative, 2 geometric shape traits, and 21 qualitative traits. Genomic DNA was obtained for amplification and sequencing of two nuclear genes (*ITS* 782pb and *LEAFY* 647pb) and intergenic region of chloroplast (*trnC-rpoB* 1040pb). Three matrixes were used to reconstruct the phylogeny: 1) morphological data, using a maximum parsimony approach; 2) molecular data using a Bayesian approach; and 3) joint data using both approaches. Phylogenetic reconstruction with morphological traits shows that *Gymnopodium* accessions are included in a clade with *Podopterus mexicanus*, and only *G. floribundum* var. *floribundum* (Belize) and *G. floribundum* var. *antigonoides* (Calakmul and Santa Rosa Xtampak) are included in a clade supported with bootstrap (B) and jackknife (J) values higher than 80. Reconstruction from molecular markers (and joint data) suggests that *Gymnopodium* is a monophyletic group with two genetic lineages within it supported by a Bayesian posterior probability higher than 96. Based on the latter result *Gymnopodium* comprises a new species from the South of Belize (*Gymnopodium* sp.) and a second species *G. floribundum* s.s. that has large morphological variation that is associated with the distribution of the species as recognized by Standley and Steyermark: *G. floribundum* var. *floribundum* and *G. floribundum* var. *antigonoides*.

Key words: Morphometrics, DNA, *ITS*, *LEAFY*, *trnC-rpoB*, phylogeny infraspecific, *G. floribundum* var. *floribundum* and *G. floribundum* var. *antigonoides*.

INTRODUCCIÓN

En los estudios taxonómicos-florísticos del género *Gymnopodium* Rolfe se han reconocido tres especies y dos variedades: *G. floribundum* Rolfe var. *floribundum*, *G. floribundum* var. *antigonoides* (B. L. Rob.) Standl. & Steyererm., *G. antigonoides* (B. L. Rob.) S. F. Blake y *G. ovatifolium* (B. L. Rob.) S. F. Blake (Blake, 1921; Standley y Steyermark, 1946). Sin embargo, en los trabajos más recientes del género, Ortiz-Díaz (1994, 2016) reconoce únicamente a *G. floribundum* como especie altamente polimórfica.

Morfológicamente, los arbustos o árboles pequeños de *Gymnopodium* se caracterizan por tener la corteza fisurada, las hojas son alternas cortamente pecioladas originándose en ócreas deciduas al madurar; las inflorescencias son racimos; las flores son hermafroditas con seis segmentos del perianto, tres exteriores de mayor tamaño que los tres interiores; el fruto es un aquenio (Ortiz-Díaz, 1994; en prensa). Su distribución se restringe a Mesoamérica, principalmente a las selvas secas de México (Península de Yucatán, Chiapas, Oaxaca, Tabasco), Belice y Guatemala, desde el nivel del mar hasta los 1010 msnm (Ortiz-Díaz, en prensa).

Los árboles y arbustos en *Gymnopodium* son de gran importancia ecológica, tiene la capacidad de retoñar y crecer rápidamente después de perturbaciones antropogénicas (González-Iturbe, Olmsted y Tun-Dzul., 2002; Cecom *et al.*, 2002), lo que sugiere que presenta estrategias que le confieren cierta resistencia al fuego (Levy-Tacher *et al.*, 1995). En la depresión central de Chiapas presentan una estrecha relación ecológica con *Tremelloscypha gelatinosa*, un hongo comestible (Bandala *et al.*, 2014) y una posible relación ectomicorrízica con otros hongos y sus raíces (Bandala y Montoya, 2015), también se han reportado como excelentes hospederos de muchas plantas epífitas principalmente especies de Orchidaceae y Bromeliaceae. Siendo una de las especies más importantes

para a la apicultura en la península yucateca por la alta producción de néctar y polen (Alfaro-Bates *et al.*, 2010).

Los trabajos taxonómicos en *Gymnopodium* han sido regionales, y la variación no ha sido evaluada en términos estadísticos ni filogenéticos. Es posible que esta variación corresponda a patrones geográficos definidos y no ha condiciones ambientales como mencionan Burke y Sanchez (2011): la incidencia de indumento en el envés de la lámina en zonas abiertas y su ausencia zonas sombreadas. Este indumento en el envés de las hojas ha sido un carácter diagnóstico para delimitar taxones en *Gymnopodium* (Blake, 1921; Standley y Steyermark, 1946).

Durante la revisión de ejemplares para Flora Mesoamericana, Ortiz-Díaz (en prensa) aun reconoce a *G. floribundum* como única especie. Sin embargo, se observaron patrones geográficos en la variación del indumento en el envés de las hojas que corresponden a lo que Standley y Steyermark (1946) han descrito como *G. floribundum* var. *floriundum* y *G. floribundum* var. *antigonoides*. De igual manera para los ejemplares del sur de Belice, se observaron caracteres que salen del patrón descrito para *G. floribundum* pareciendo ser una especie distinta. Por lo tanto, el presente estudio tiene como objetivo evaluar con métodos filogenéticos la variación morfológica y molecular del género *Gymnopodium* y discernir en la delimitación de los taxones previamente descritos y explicar las relaciones filogenéticas. La idea fundamental es reconocer grupos monofiléticos y caracteres únicos que indiquen si las variedades descritas y la población del sur de Belice corresponden a especies distintas o a una sola especie con tres variedades. Para esto se considera que las especies son linajes de metapoblaciones y como evidencia secundaria (de Queiroz, 1998, 2005, 2007) se van caracterizan por poseer una historia natural y ancestro en común que serán diagnosticables a través de monofilias y caracteres únicos (Davis y Nixon, 1992).

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de las unidades de muestreo. Para discernir la clasificación de los taxones que integran el género *Gymnopodium* se realizó un análisis filogenético a partir de la propuesta taxonómica de Standley y Steyermark (1946): *G. floribundum* var. *floribundum* and *G. floribundum* var. *antigonoides* y una posible especie nueva (cuadro 1). Para las especies del grupo externo se seleccionaron y colectaron tres especies de tres géneros cercanamente emparentadas a *Gymnopodium*: *Eriogonum jamesii* Benth. representante de la tribu Eriogoneae, y *Podopterus mexicanus* Bonpl. y *Coccoloba uvifera* (L.) L. representantes de la tribu Coccolobeae. De acuerdo con Burke *et al.* (2010), Burke y Sanchez (2011) y Kempton (2012) el Clado Eriogoneae es el grupo hermano de *Gymnopodium* (Gymnopodieae).

Obtención de datos morfológicos. Los caracteres morfológicos incluyen la mayoría de los evaluados por Burke *et al.* (2010) para Polygonaceae, más otros caracteres que son variables dentro de *Gymnopodium*, incluyendo datos cuantitativos y geométricos. En total se midieron 31 caracteres cuantitativos directamente de los ejemplares, nueve corresponden a mediciones de estructuras vegetativas y 22 a estructuras reproductivas (cuadro 2). Para los datos de morfometría geométrica se escogieron las hojas y el perianto exterior acrescente en el fruto. Utilizando el programas MakeFan8 de la serie IMP (Sheets, 2014) se empleó un peine de 12 rayos para analizar la forma de las hojas tomando como puntos de referencia la inserción del peciolo con la lámina y el ápice, en esta configuración se digitalizaron 32 puntos: dos marcas y 30 semimarcas. Para los periantos exteriores, la plantilla consistió de un círculo con 30 rayos tomando como puntos de referencia el ápice y el punto de unión de la vena media con las venas primarias, teniendo un total de 31 puntos: dos marcas y 29 semimarcas. Las coordenadas cartesianas de cada punto se registraron utilizando el programa tpsDig2 Versión 2.18 (Rolf, 2015). Las configuraciones obtenidas se superpusieron con el modelo

Procrustes en el programa CoordGen y utilizando la herramienta Semiland se alinearon las semimarcas (Shsets, 2014a). Por último, de la observación de ejemplares de herbario y de la literatura (Ortiz-Díaz, 1994; Freeman y Reveal, 2005; Castillejo-Cruz y Solano, 2008) se obtuvieron 21 caracteres de estructuras vegetativas y reproductivas los cuales fueron codificados como binarios o multiestado (Anexo 2).

Extracción y amplificación del DNA. Para la extracción del DNA se colectó tejido foliar de un individuo para tener representada cada localidad excepto para las localidades de Belice, el tejido de estas localidades se obtuvo de materia de herbario (tabla 1, figura 1, anexo 1). En el caso de los taxones del grupo externo se colectó tejido vegetal de *C. uvifera* y *P. mexicanus*, y se obtuvieron de GenBank las secuencias de *E. jamensii* (accesiones JQ352533 Y EF438089). La extracción del DNA realizó utilizando el método Miniprep CTAB modificado de Doyle y Doyle (1987) por Falcón y Valera (2007) y con el Kit DNeasy Plant mini (QIAGEN) cuando el tejido fue obtenido de ejemplares de herbario.

La PCR se llevó a cabo con el protocolo estandarizado de Sanchez y Kron (2009) en una reacción de 10µl y visualizados en geles de agarosa al 0.8%. Las regiones amplificadas y secuenciadas fueron *ITS*, el segundo intrón de *LEAFY* y la región intergénica del cloroplasto *trnC-rpoB* con los cebadores descritos en el cuadro 3. La purificación del DNA se realizó con el protocolo de Pure Link ® Quick Gel PCR Purification Combo Kit Purifying DNA From Gels Using A Centrifuge.

Análisis filogenético

Se realizaron tres análisis filogenéticos con tres matrices de datos: datos morfológicos, datos moleculares y datos combinados. Para reducir la dimensión de la matriz morfológica y evitar las correlaciones alométricas se utilizó el programa estadístico PAST para realizar análisis de

componentes principales y utilizar los componentes que agruparan más del 90% de la variación total entre las distancias de lámina foliar (PC1= 82.74% y PC2= 14.97%), perianto exterior (PC1= 80.92% y PC2= 14.20%) y la inflorescencia (PC1= 94.2%) los cuales fueron estandarizados utilizando el script *mkstand.run* (cortesía de P. Goloboff, 2016). De esta manera la matriz quedó construida de 13 terminales y 41 caracteres morfológicos, dividida en tres bloques: 1) 18 caracteres continuos, 2) dos caracteres de forma, que consisten en las configuraciones de Coordenadas Procrustes de la forma de la hoja y el perianto exterior; y 3) 21 caracteres cualitativos derivados de la observación de los ejemplares de herbario y literatura publicada.

La matriz morfométrica se analizó utilizando el método de parsimonia (MP) y el programa TNT (Goloboff, Farris y Nixon, 2008) el cual permite la incorporación de datos cuantitativos continuos (Goloboff, Mattoni y Quinteros, 2006) y las coordenadas x , y de las formas geométricas (Catalano, Goloboff & Giannini, 2010; Goloboff & Catalano, 2011). Todos los caracteres fueron tratados como no ordenados y se les otorgo el mismo peso. La estrategia de búsqueda incluyó la combinación de los métodos de búsqueda sectorial (SS), fusión de árboles (Goloboff, 1999) y Ratchet (Nixon, 1999). Se realizaron 2 réplicas de 1000 con el cual el árbol llegó a su longitud mínima. El soporte y la robustez de los clados se evaluaron con los análisis de Bootstrap y Jackknife, con 1000 réplicas cada una.

Para los datos moleculares, las secuencias de DNA de cada región se alinearon utilizando el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) del software MEGA6 (Tamura *et al.*, 2013) y se analizaron bajo el enfoque bayesiano (MB) utilizando el programa MrBayes v. 3.2 (Ronquist, Huelsenbeck y Teslenko, 2011). Para correr el análisis bayesiano, los parámetros del modelo se optimizaron por separado (particionado) para cada *loci* individual. Los análisis se realizaron por duplicado ($nruns = 2$) para un millón de generaciones con cada ejecución que consiste en cuatro

cadena MCMC, un burnin del 25%, y los árboles óptimos fueron obtenidos cada 10000 generaciones; el modelo evolutivo utilizado fue GTR + Γ + I. Finalmente ambas matrices se conjuntaron, pues las evidencias empíricas sugieren que al analizar los datos combinados se producen topologías con mayor soporte y robustez, maximizando el poder explicativo de dichos datos que si se analizaron por si solos (Kluge y Wolf, 1993; Schuh, 2000). Este análisis se realizó bajo los dos enfoques antes descritos y los mismos métodos de búsqueda. Para la discretización de los datos cuantitativos en MB se realizaron análisis de varianza para cada carácter y las localidades estadísticamente significativas se agruparon y codificaron como pertenecientes a un mismo grupo (Baum, 1988; Gift y Stevens, 1997). Mientras que, los caracteres de coordenadas x,y de la forma de la hoja y el perianto se sustituyeron por sus formas cualitativas de acuerdo al glosario botánico de Moreno (1984). La convergencia de los árboles en el método bayesiano se evaluó considerando los valores propuestos por Ronquist *et al.* (2011).

RESULTADOS

Se obtuvo un solo árbol más parsimonioso a partir del análisis de MP de los caracteres morfológicos con una longitud de 153.252, IC= 0.809 e IR= 0.641. *Gymnopodium* forma un grupo monofilético hermano de *P. mexicanus*. Dentro de *Gymnopodium* se observan valores de Bootstrap y Jackknife superiores a 80 para el clado formado por Belice, Santa Rosa Xtampak y Calakmul e inferiores a 52 para el resto de los grupos (figura 2).

En el cuadro 4 se presenta la longitud total de cada gen después del alineamiento, sitios conservados, sitios variables y sitios parsimoniosamente informativos. *LFY* es el gen con menor longitud pero presenta los mayores porcentajes de sitios variables y sitios parsimoniosamente informativos; por el contrario, *trnC-rpoB* fue el marcador molecular con mayor longitud pero también es el que presenta los menores porcentajes de sitios variables y sitios parsimoniosamente

informativos. En el análisis filogenético del marcador intergénico del cloroplasto y de los nucleares apoyan la monofilia del género *Gymnopodium* con una probabilidad posterior bayesiana de 0.96, colocando a *E. jamesii* como grupo hermano. Al interior de *Gymnopodium* el árbol filogenético muestra claramente a la localidad de Toledo como linaje aislado de las demás localidades cuyos valores de probabilidad posterior bayesiana en su interior son bajos (figura 3).

La reconstrucción filogenética de los conjuntos de datos morfológicos y moleculares bajo el método MP y MB presenta una topología idéntica, en la MP se recuperó un único árbol con una longitud total de 2720.98, IC= 0.867 y un IR= 0.681. En MB ambas corridas (datos moleculares y datos conjuntos) alcanzaron la convergencia con un valor de 0.01 en la desviación estándar promedio de las frecuencias separadas. El árbol filogenético de los datos conjuntos obtenido con MP y MB colocan a *Gymnopodium* como un grupo monofilético y hermano de *E. jamesii* con altos valores de Jackknife, Bootstrap y Probabilidad posterior bayesiana. Al interior del género se observan dos linajes: el primer linaje integrado por la localidad de Toledo y el segundo integrado por el resto de las localidades (figura 4). En el segundo linaje se observan dos sub-linajes bien soportados con altos valores de probabilidad posterior bayesiana: el sub-linaje más derivado incluye las localidades de Dzemul, Huhi y Vigía Chico con un valor de probabilidad posterior bayesiana de 98; y un sub-linaje que incluye estas localidades derivadas más localidad de Oaxaca y Ocozocoautla con valor de probabilidad posterior bayesiana de 99 (figura 4).

DISCUSIÓN

Los árboles filogenéticos bajo diferentes métodos de análisis y conjuntos de datos han comprobado la monofilia del género *Gymnopodium* con altos valores de Jackknife, Bootstrap y probabilidad posterior bayesiana. En estudios filogenéticos de la subfamilia Eriogonoideae utilizando datos moleculares se ha propuesto que el grupo hermano de *Gymnopodium* es el clado formado por la

tribu Eriogoneae (Burke *et al*, 2010; Burke y Sanchez, 2011). Sin embargo, los datos morfológicos sugieren que el grupo hermano de *Gymnopodium* está representado por especies de la tribu Triplariaceae (Burke *et al.*, 2010). En el presente estudio los datos morfológicos por sí solos y con bajos valores de soporte colocan a *P. mexicanus*, representante de la tribu Coccolobeae como el grupo hermano de *Gymnopodium*. La forma de crecimiento arbustiva, la presencia de ocreas, hojas fasciculadas y/o solitarias son los atributos morfológicos que comparten en común. Por otra parte, los análisis de datos moleculares y combinados apoyan la propuesta de considerar como grupo hermano de *Gymnopodium* a *E. jamesii*, representante de la tribu Eriogoneae, siendo los caracteres florales los atributos que comparten en común.

Kluge y Wolf (1993) y Schuh, (2000) han demostrado que los análisis de datos combinados generan árboles con altos valores de soporte y robustez en las topologías que si se analizaron por separado. En el género *Gymnopodium*, los datos combinados analizados con MP y MB producen una topología idéntica con valores altos de Bootstrap y Jackknife y PP comparado con los árboles obtenidos con matrices separadas. Al interior del género, los datos morfológicos y combinados analizados con MP presentan clados con valores bajos de soporte y robustez. Por el contrario, el MB aporta los mayores valores de soporte en el interior de género. Por esta razón, la discusión se continuará basándose en el árbol filogenético de datos conjuntos.

La reconstrucción filogenética de datos combinados sugiere la presencia de dos linajes en el género *Gymnopodium*, los cuales pueden ser tratados como especies distintas. Esta tendencia también se aprecia en el análisis de datos moleculares y datos morfológicos pero no tan evidente. El linaje aquí definido como *Gymnopodium* sp. corresponde a la localidad de Toledo y grupo hermano del resto de los especímenes de *Gymnopodium*, siendo molecular y morfológicamente distinto a éstos. La presencia de venación prominente en el envés de la hoja, tricomas glandulares basales en el eje del

racimo y en los pedicelos florales son caracteres novedosos no registrados en las otras poblaciones. Por la ubicación que ocupa en el cladograma y su distribución geográfica al sur de Belice, en la región biogeográfica Este de América Central sugiere que la colonización del género se inició en Centroamérica hacia el territorio mexicano, pasando por Chiapas y la costa del Pacífico hasta el norte de la provincia biótica Península de Yucatán donde alcanzan su máxima diversificación morfológica.

La evidencia morfológica y molecular en el segundo linaje, aquí definido como *G. floribundum s. s.* no son suficientes para reconocer a *G. floribundum var. antigonooides* como una especie tal como lo ha sugerido Blake (1921), más bien se trataría de poblaciones que están en un continuo cambio evolutivo rumbo a la especiación. De esta manera se reconoce que las localidades muestreadas corresponden a una sola especie, pero la variación geográfica presenta un patrón que permite reconocer y aceptar las variedades propuesta por Standley y Steyermark (1946).

Los sub-linajes (Lavin, Mathews y Hughes, 1991) hallados en *G. floribundum s. s.* no representan linajes de organismos evolutivamente distintos, más bien presentan un patrón morfológico y molecular del sur de la provincia biótica Península de Yucatán (Belice, Calakmul, Santa Rosa Xtampak) pasando por la costa del Pacífico (El Chorreadero, Ocozocoautla y Oaxaca) hasta llegar y colonizar el norte de la península de Yucatán (Dzemul, Huhi y Vigía Chico) donde alcanza su máxima diversificación. El árbol filogenético de los datos conjuntos en *G. floribundum s. s.* sugiere que Dzemul, Huhi y Vigía Chico están más relacionadas con las localidades de Chiapas y Oaxaca que con Calakmul, Santa Rosa Xtampak y Belice a pesar de la cercanía geográfica.

En términos morfológicos, las características más importantes que se han utilizado para delimitar las especies en el complejo *G. floribundum s.s.* son la forma de los periantos exteriores y el indumento en el envés de la hoja. En el análisis de datos combinados la ausencia de indumento en el

envés de las hojas y en la ócrea y la textura papirácea de la ócrea son caracteres que presenta la localidad de Belice y Standley y Steyermark (1946) lo han descrito originalmente para *G. floribundum* var. *floribundum*, estos caracteres se van perdiendo en los sub-linajes más derivados. Por el contrario, el indumento en el envés de la lámina y en la ocrea al menos cuando son jóvenes (Calakmul y Santa Rosa Xtampak), así como la textura crasa de la ocrea son caracteres descritos para *G. floribundum* var. *antigonoides* (Standley y Steyermark, 1946).

LITERATURA CITADA

Alfaro Bates RG, González Acereto JA, Ortiz-Díaz JJ, Viera Castro FA, Burgos Pérez AI, Martínez Hernández E, Ramírez Arriaga E. 2010. *Caracterización palinológica de las mieles de la península de Yucatán*. UADY-CONABIO. Mérida, Yucatán.

Bandala VM, Montoya L, Villegas R, Cabrera TG, Gutiérrez MJ, Acero T. 2014. "Nangañaña" (*Tremelloscypha gelatinosa*, Sebacinaceae), hongo silvestre comestible del bosque tropical deciduo en la Depresión Central de Chiapas, México. *Acta Botánica Mexicana* 106: 149-159.

Bandala VM, Montoya L. 2015. *Gymnopodium floribundum* trees (Polygonaceae) harbour a diverse ectomycorrhizal fungal community in the tropical deciduous forest of Southeastern Mexico. *Research & Reviews: Journal of Botanical Sciences* 4:73-75.

Baum BR. 1988. A Simple Procedure for Establishing Discrete Characters from Measurement Data, Applicable to Cladistics. *Taxon* 37: 63-70.

Blake SF. 1921. *Neomillspaughia*, a new genus of Polygonaceae, with remarks on related genera. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 48: 77-88.

- Burke MJ, Sanchez A. 2011. Revised subfamily for Polygonaceae, with a tribal classification for Eriogonoideae. *Brittonia* 63: 510-520.
- Burke JM, Sánchez A, Kron KA, Luckow M. 2010. Placing the woody tropical genera of Polygonaceae: A hypothesis of character evolution and phylogeny. *American Journal of Botany* 97: 1377-1390.
- Castillejo-Cruz C, Solano E. 2008. Polygonaceae. *Flora del Bajío y de regiones adyacentes* 153. Pátzcuaro, Michoacan: Instituto de Ecología, A.C., Centro Regional del Bajío.
- Catalano S, Goloboff P, Giannini NP. 2010. Phylogenetic morphometrics (I): the use of landmark data in a phylogenetic framework. *Cladistics* 26: 539–549.
- Ceccon E, Olmsted I, Vázquez-Yanes C, Campo-Alves J. 2002. Vegetation and soil properties in two tropical dry forest of differing regeneration status in Yucatán. *Agrociencia* 36: 621-631.
- Davis JJ, Nixon KC. 1992. Populations, genetic variation, and the delimitation of phylogenetic species. *Systematic Biology* 41(4): 421-435.
- De Queiroz K. 2005. A unified concept of species and its consequences for the future of taxonomy. *Proceedings of the California Academy Sciences* 56: 196–215.
- de Queiroz K. 2005. A unified concept of species and its consequences for the future of taxonomy. *Proceedings of the California Academy Sciences* 56: 196–215.
- de Queiroz K. 2007. Species Concepts and Species Delimitation. *Systematic Biology* 56(6): 879–886.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11–15.

- Freeman CC, Reveal JL. 2005. Polygonaceae. In: Flora of North America Editorial Committee Ed. Flora of North America Vol. 14. New York: Oxford University Press, 216-601.
- Gift N, Stevens PF. 1997. Vagaries in the delimitation of character states in quantitative variation an experimental study. *Systematic Biology* 46: 112-125.
- Goloboff P. 1999. Analyzing large data sets in reasonable times: solutions for composite optima. *Cladistics* 15: 415-428.
- Goloboff P, Mattoni CI, Quinteros AS. 2006. Continuous characters analyzed as such. *Cladistics* 22: 589-601.
- Goloboff P, Farris JS, Nixon KC. 2008. TNT, a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24: 774-786.
- Goloboff P, Catalano SA. 2011 Phylogenetics morphometrics (II): algorithms for landmark optimization. *Cladistics* 27: 42-51.
- González-Iturbe JA, Olmsted I, Tun-Dzul F. 2002. Tropical dry forest recovery after long term Henequen (sisal, *Agave fourcroydes* Lem.) plantation in northern Yucatán, Mexico. *Forest Ecology and Management* 167:67-82.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Kempton E. 2012. Systematic of Eriogonoideae s. s. (Polygonaceae). *Systematic Botany* 37: 723-737.
- Kluge AG, Wolf AJ. Cladistic: what's in a Word? *Cladistics* 9: 183-199.

- Lavin M, Mathews S, Hughes C. 1991. Chloroplast DNA variation in *Gliricidia sepium* (Leguminosae): intraespecific Phylogeny and Tokogeny. *American Journal of Botany* 78: 1576-1585.
- Levy-Tacher S, Hernández-Xolocotzi E, García-Moya E, Castillo-Morales A. 1995. Estudio de la sucesión secundaria bajo roza-tumba-quema en Yucatán. En: Hernández-Xolocotzi E, Bello E, Levy-Tacher S, Eds. *La milpa en Yucatán: un sistema agrícola tradicional*. Mexico, D.F.: Colegio de Postgraduados, 149-169.
- Moreno N. 1984. *Glosario botánico ilustrado*. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. Xalapa, Veracruz. 300 p.
- Morrone JJ. 2001. Biogeografía de América Latina y el Caribe. *Manuales y Tesis de la Sociedad Entomológica Argentina* 3. Zaragoza: SEA.
- Nixon KC. 1999. The parsimony Ratchet, a new method for rapid parsimony analysis. *Cladistics* 15: 407-414.
- Ortiz-Díaz JJ. 1994. Polygonaceae. *Etnoflora Yucatanense* 10. Mérida: Universidad Autónoma de Yucatán.
- Ortiz-Díaz JJ. (en prensa). *Gymnopodium*. En: Davidse G, M Sousa Sánchez, S Knapp, F Chiang Cabrera. *Flora Mesoamericana* 2 (1): Cycadaceae a Connaraceae. Missouri Botanical Garden, St. Louis.
- Rohlf FJ. 2015. *tpsDig2 version 2.18*. Ecology and Evolution, SUNY at Stony Brook.
- Rolfe RA. 1901. *Gymnopodium floribundum*. Hooker's *Icones Plantarum* 27:2699.

Robinson BL. 1905. Polygonaceae. *Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie* 36: 13-15.

Sanchez A, KA Kron. 2009. Phylogenetic relationships of *Afrobrunnichia* Hutch. & Dalziel (Polygonaceae) based on three chloroplast genes and ITS. *Taxon* 58: 781-792.

Sanchez A, KA Kron. 2011. Phylogenetic relationships of *Triplaris* and *Ruchprectia*: Redelimitation of the recognized genera and two new genera for tribe Trplarideae (Polygonaceae). *Systematic Botany* 36: 702-710.

Shaw J, Lickey EB, Schilling EE, Small RL. 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: 275-288.

Sheets HD. 2014. *CoordGen8*. New York: Department of Physics, Canisius, College, Buffalo. Available at: <http://www.canisius.edu/~sheets/morphsoft.html>

Sheets HD. 2014a. *MakeFan 8*. New York: Department of Physics, Canisius, College, Buffalo. Available at: <http://www.canisius.edu/~sheets/morphsoft.html>.

Standley PC, Steyermark JA. 1946. *Flora de Guatemala*. Fieldiana: Botany. Vol. 24. Parte IV. Chicago Natural History Museum. USA.

Schuh RT. 2000. *Biological systematic: principles and applications*, Cornell University Press. Ithaca. EUA. 236pp.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.

Ronquist F, Huelsenbeck J, Teslenko M. 2011 MrBayes version 3.2 Manual: Tutorials and Model Summaries.

White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. 1990 Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. , San Diego, CA: Academic Press, 315–322.

Figuras

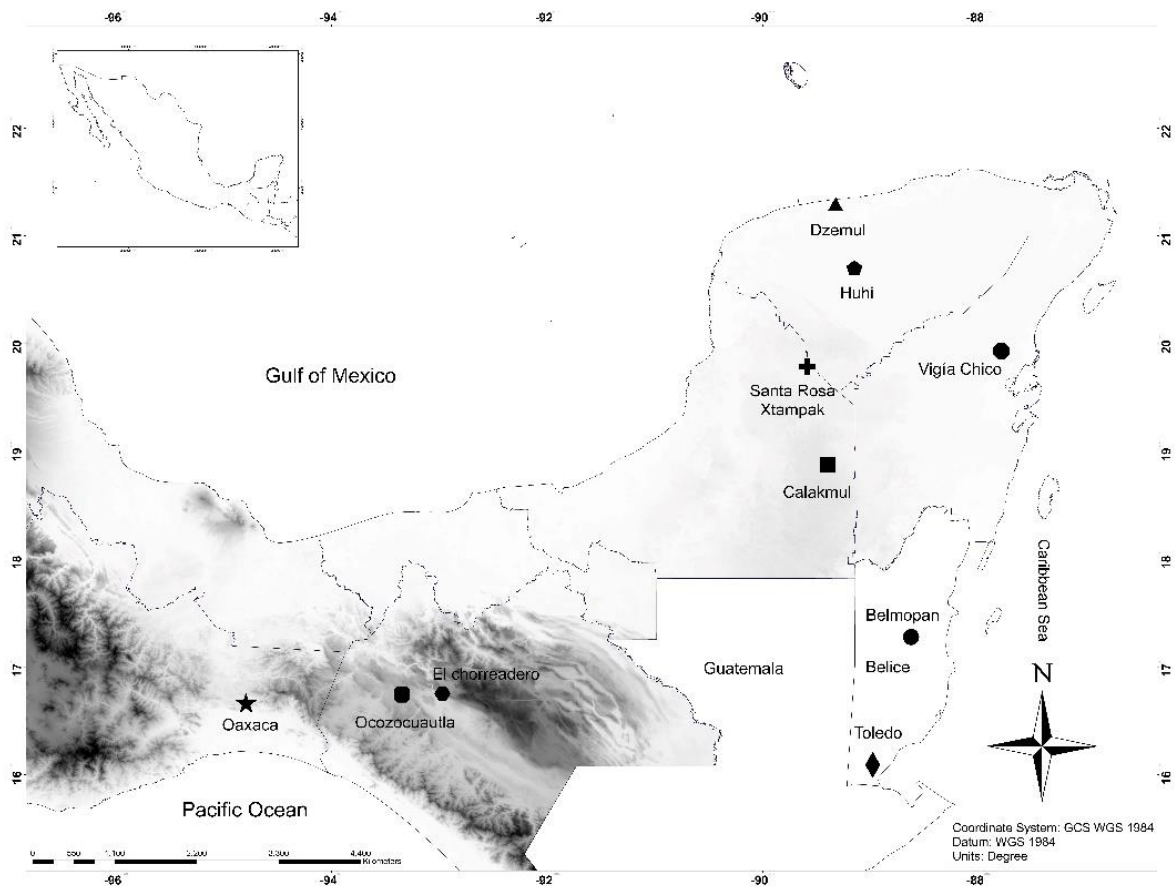


Figura 1. Mapa de ubicación de las localidades evaluadas del género *Gymnopodium*.

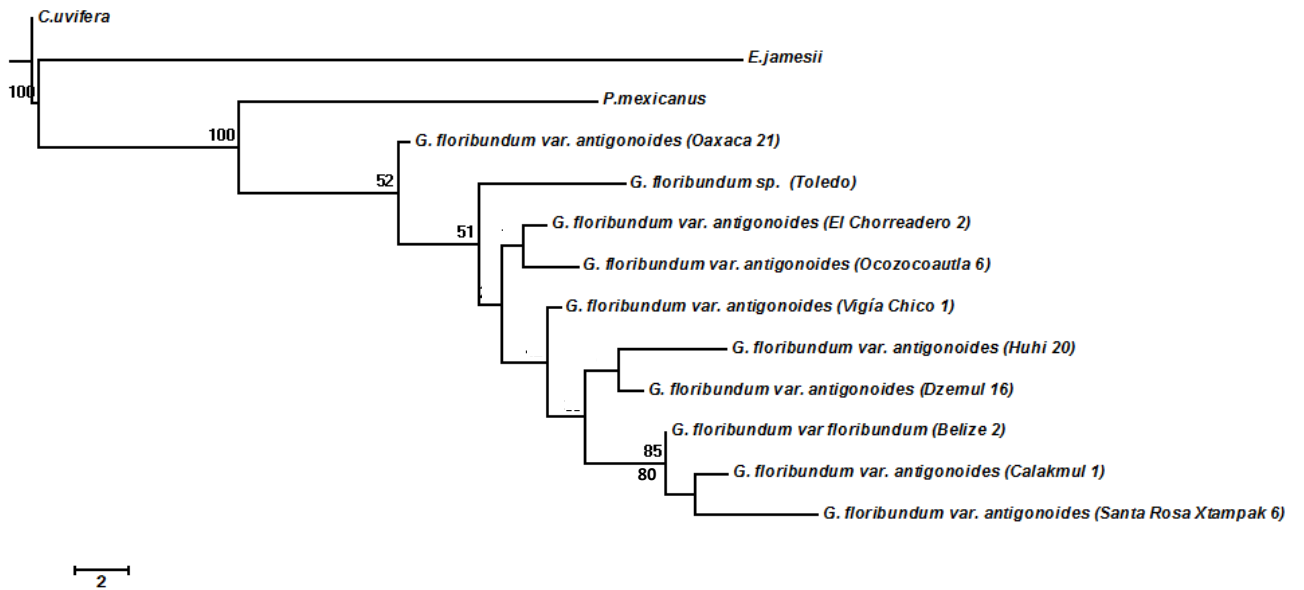


Figura 2. Árbol más parsimonioso derivado del análisis de MP de los datos morfológicos (L= 153.252, IC= 0.809 e IR= 0.641). Sobre la rama se presentan los valores de Bootstraps mayores a 50 y de bajo los valores de Jackknife mayores a 50.

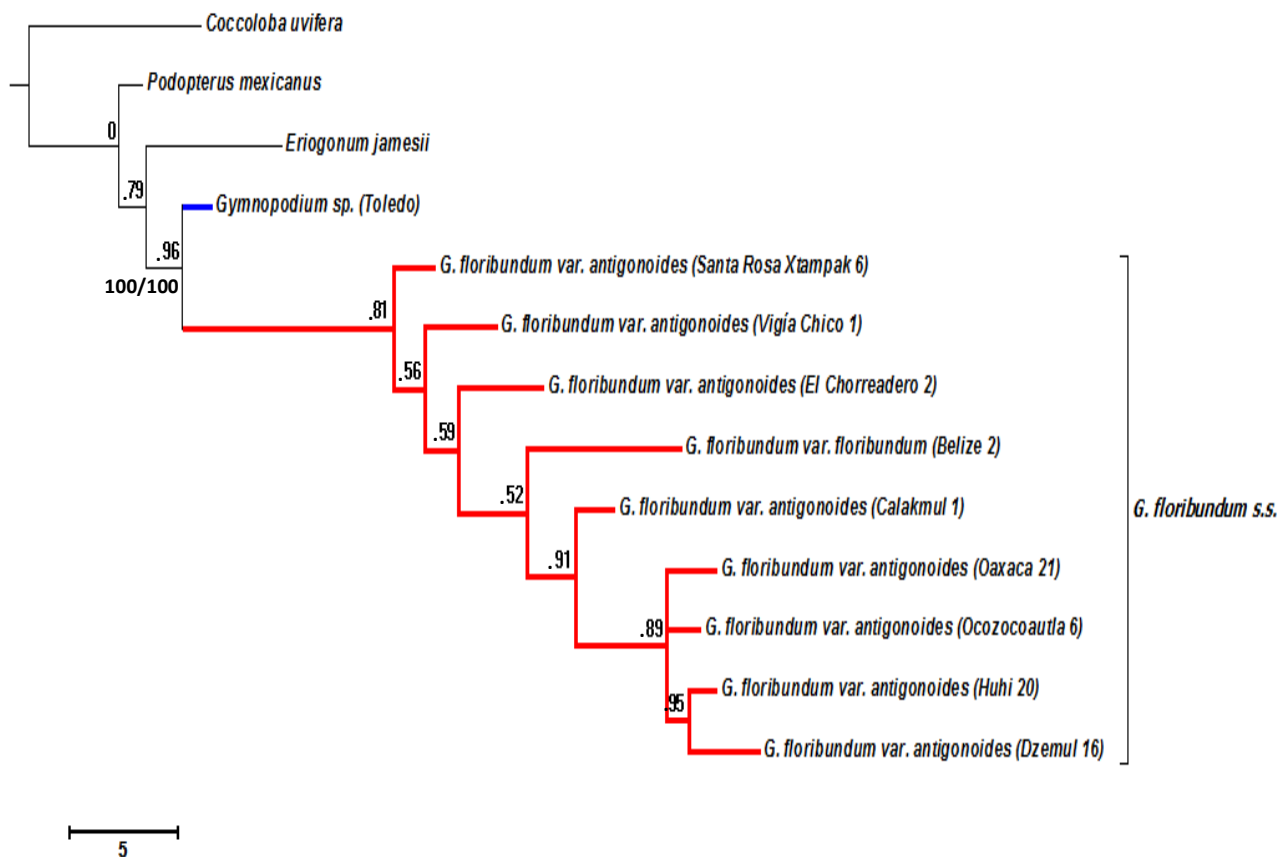


Figura 3. Árbol de consenso de la mayoría derivado del Análisis filogenético del género *Gymnopodium* utilizando inferencia bayesiana con base en tres regiones de DNA. Sobre las ramas valores de probabilidad posterior bayesiana, se consideran robustos aquellos nodos con valores mayores a 0.95. Debajo de la rama valores de Jackknife/Bootstrap mayores al 50%.

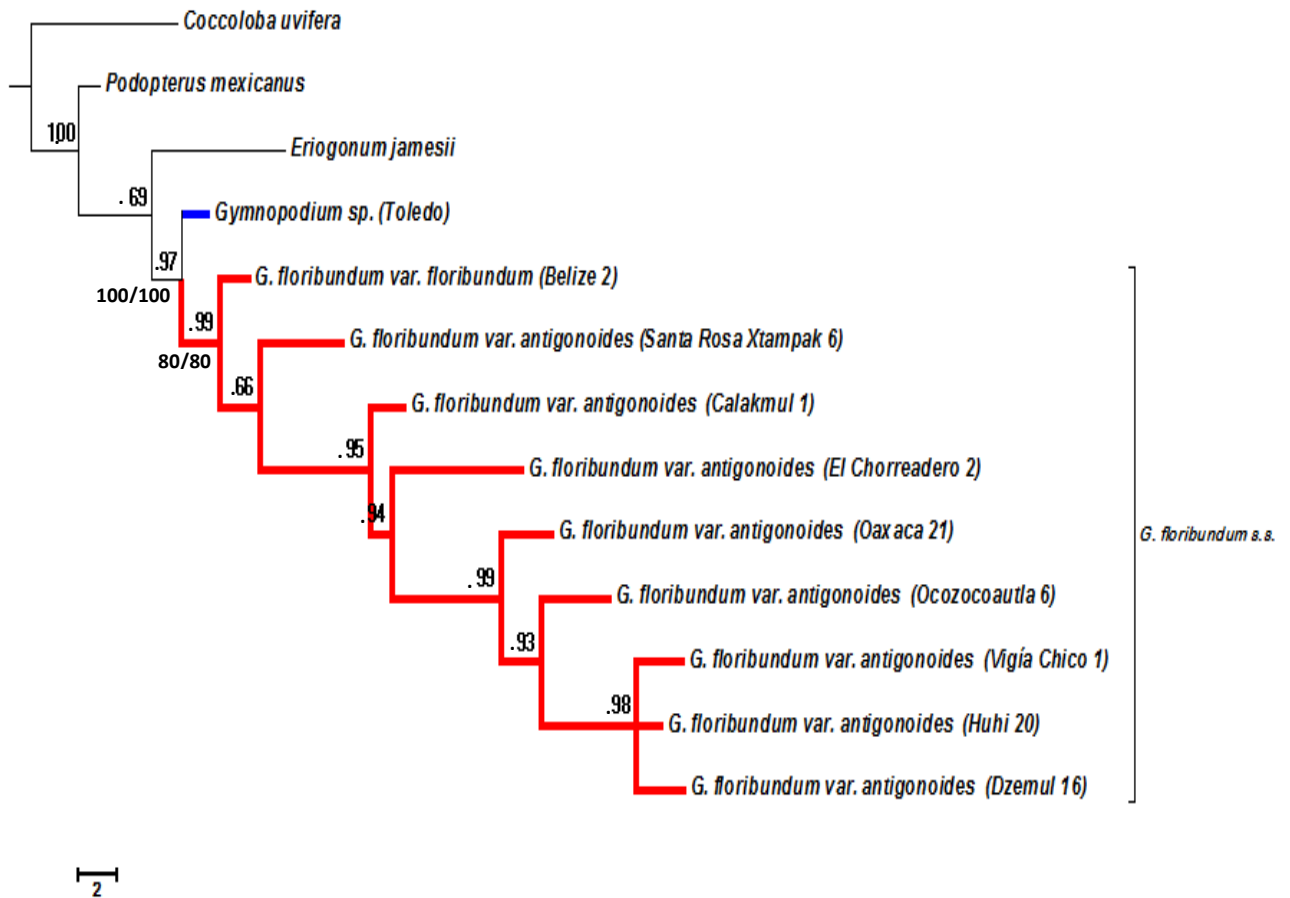


Figura 4. Árbol de consenso de la mayoría derivado del Análisis filogenético del género *Gymnopus* utilizando inferencia bayesiana con base en tres regiones de DNA y la morfología. Sobre las ramas valores de probabilidad posterior bayesiana, se consideran robustos aquellos nodos con valores mayores a 0.95. Debajo de la rama valores de Jackknife/Bootstrap mayores al 50%.

Cuadros

Cuadro 1. Taxa incluidos en el grupo interno para los análisis filogenéticos. Localidades geográficas, altitud y regiones biogeográficas. *= ejemplares colectados en el presente trabajo y están depositados en los herbarios UADY, CICY, CHIP, MEXU Y XAL; Alt= Altitud; 1= regiones biogeográficas de acuerdo con Morrone, 2001; 2= ejemplares de Herbario.

Taxa	Terminal	Localidad	Alt	Coordenadas	Region Biogeográfica ¹	Voucher
<i>G. floribundum</i> <i>var. antigonoides</i>	Dzemul 16*	Carretera Dzemul-Zona arqueológica de Xcambo, municipio de Dzemul, Yucatán, México.	8	21°17'53.9" N, 89°19'25.5" O	Provincia Biótica Península de Yucatán (PBPY)	J. J. Ancona y J. J. Ortiz 158
	Huhi 20*	Carretera Huhi-Tixcacal, Municipio de Huhi, Yucatán, México, Yucatán,	12	20°42'11.8" N, 89°08'54.8" O		J. J. Ancona y J. J. Ortiz 281
	Vigía Chico 1*	Carretera Vigía Chico-Punta Alem, Municipio de Felipe Carrillo Puerto, Quintana Roo, México,	20	19°55'54.89"N, 87°47'3.60"O		J. J. Ancona y J. L. Cámara 352
	Calakmul 1*	Camino hacia dos Lagunas, Municipio Calakmul, Campeche, México.	216	18°52'31.59"N, 89°23'42.61"O		J. J. Ancona y J. J. Ortiz 322
	Xtampac 6*	Sitio arqueológico Santa Rosa Xtampac, Municipio de Hopelchén, Campeche, México.	120	19°47'26.22"N, 89°35'9.16"O		J. J. Ancona y J. L. Cámara 297
	El Chorreadero 2*	El Chorreadero, Municipio de Tuxtla Gutierrez Chiapas, Chiapas, México.	650	16°45'4.57"N, 92°58'12.62"O	Provincia Biótica de Chiapas (PBCh)	J. J. Ancona y J. J. Ortiz 204
	Ocozocuautila 6*	Entronque aeropuerto-Ocozocuautila carretera 190, Municipio de Ocozocuautila, Chiapas, México.	1010	16°44'33.9"N, 93°20'49.3"O	J. J. Ancona y F. Hernández 178	
	Oaxaca 21*	Las Anonas, Municipio de Juchitan de Zaragoza, Oaxaca, México.	60	16°39'50.08"N, 94°47'27.47"O	Provincia Biótica Costa del Pacífico (PBCP)	J. J. Ancona y J. J. Ortiz 253
<i>G. floribundum</i> <i>var. floribundum</i>	Belice 2 ²	Autopista oeste Belmopan Cd. Belice, Distrito EL Cayo, Belice.	12	17°16'35.34"N, 88°37'20.87"O	Provincia Biótica Península de Yucatán (PBPY)	R. R. Innes 220
<i>Gymnopodium</i> sp.	Toledo ²	Distrito de Toledo, carretera Big Creek-Sierra Gorda	20	16° 5'25.84"N 88°58'43.18"O	Provincia Biótica Este de América Central (PBEMC)	T. Hawkins 1681

Cuadro 2. Carácteres y estados de carácter morfométricos utilizados en la matriz filogenética.

Tipo de estructura	Medidas registradas en mm
Vegetativos	
Braquiblastos de las ramas.	1.- Longitud del braquiblasto
Pecíolo.	2.- Longitud del Pecíolo
Lamina foliar	3.- Longitud de la lámina
	4.- Ancho de la lámina
	5.- Distancia en el ápice y la parte más ancha
	6.- Distancia entre la base y la parte más ancha
	7.- Ancho de la Base
	8.- Ancho del ápice
	9.- Distancia entre la vena media y el margen
Reproductivos	
Inflorescencia	10.- Longitud del racimo
	11.- Longitud del pedúnculo
	12.- Distancia entre el primer fascículo y el segundo fascículo
	13.- Distancia entre el segundo fascículo y el tercer fascículo
	14.- Distancia entre el tercer fascículo y el cuarto fascículo
	15.- Promedio de las distancias entre fascículos
Pedicelo de la flor	16.- Longitud de la base del pedicelo hacia la articulación
	17.- Longitud de la articulación hacia la base de los periantos
	18.- Longitud total del pedicelo
Perianto exterior	19.- Longitud del perianto
	20.- Ancho del perianto
	21.- Ancho de la Base
	22.- Ancho del ápice
	23.- Distancia del ápice-Lóbulo derecho
Perianto interior	24.- Longitud del perianto
	25.- Ancho del perianto
Ovario	26.- Longitud del ovario
	27.- Ancho del ovario
	28.- longitud del estigma
Fruto	29.- Longitud del fruto
	30.- Ancho del fruto
	31.- Longitud del estigma persistente en el fruto

Cuadro 3. Marcadores moleculares utilizados y descripción de los cebadores.

Regiones nucleares			
ITS 5-4	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	White <i>et al.</i> , (1990)
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	
LEAFY	lfy2i1	CCTGCCGACATANTGGCGCATCTTGGGCTT	Sanchez y Kron (2011)
	lfy23	TGCAAGGGGTAAGAAGAACGGCCTTGA	
Regiones de Cloroplastos			
trnC-rpoB	trnC ^{GCA}	CAC CCR GAT TYG AAC TGG GG	Shaw <i>et al.</i> , (2005)
	rpoB	CKA CAA AAY CCY TCR AAT TG	

Cuadro 4. Resumen estadístico de las secuencias de DNA. Long= longitud de la alineación, C= sitios conservados, V= sitios variables, PI= sitios parsimoniosamente informativos, S= sitios no informativos.

Región	Long	C (%)	V (%)	PI (%)	S (%)
ITS	782	187 (23.91)	590 (75.44)	163 (20.8)	422 (53.96)
trnC	1040	445 (42.78)	564 (54.23)	25 (2.4)	536 (51.53)
LFY	647	85 (13.13)	523 (80.83)	283 (43.74)	228 (35.23)
LFY+ITS+trnC	2469	717 (29.04)	1677 (67.92)	471 (19.07)	1186 (48.03)

Anexo 1. Ejemplares revisados e incluidos en el análisis molecular.

BELICE. R. R. Innes 220 (MO). Distrito de Belice, 15 millas al oeste de la autopista. C.

Whitefoord 2527 (BM).

BELICE, Distrito de Toledo, Las sierritas, 20 km al oeste del establecimiento de Arroyo Grande.

Sabana. 213 msnm. T. Hawkins 1681. (MO, MB).

Anexo 2. Codificación de caracteres morfológicos cualitativos.

1.- Forma de crecimiento: 0= herbácea 1= Arbusto 2= Árbol

Las formas de crecimiento dentro de la familia varían de herbáceas anuales o perennes (*Eriogonum*), rara vez trepadoras, ocasionalmente arbustos (*P. mexicanus*) o árboles (*Coccoloba* y *Gymnopodium*).

2.- Presencia de las ocreas: 0= ausentes, 1= presentes

La ócrea es la estructura más importante en la Familia Polygonaceae, aunque muchas especies han perdido esta estructura (*Eriogonum*), muchas otras aun la conservan (*Podopterus*, *Coccoloba* y *Gymnopodium*)

3.- Persistencia de las ocreas. 0= caducas, 1= perennes

La ocrea es una estructura caduca en la mayoría de los ejemplares revisados de *G. floribundum* excepto para los ejemplares colectados en la localidad de Oaxaca.

4.- Indumento en las ócreas: 0= ausentes, 1= presentes

De igual manera, en los ejemplares de *G. floribundum* se detectó un patrón de variación en el indumento de la ocrea: ejemplares colectados en Belice son totalmente glabros, en los ejemplares de Calakmul y Santa Rosa Xtampac existen ocreas glabras y ocreas con indumento; en el resto de las localidades los ejemplares presentaron indumento.

5.- Textura de las ócreas: 1= papirácea-membranaceas, 2= Crasa

Algunos ejemplares de *G. floribundum* como de las localidades de Belice, Calakmul y Santa Rosa Xtampac presentan ocrea con textura papirácea y los ejemplares de las localidades restantes poseen una ocrea de textura crasa. En las especies de *Coccoloba* y *Podopterus* aquí anlizados presentan ocrea papirácea.

6.- Indumento en el peciolo: 0= ausentes, 1= presentes

El peciolo es totalmente glabro en los ejemplares de Belice, Calakmul y Santa Rosa Xtampak, pero en el resto de las localidades los ejemplares presentan un peciolo con indumento.

7.- Estipula persistente rodeando el peciolo: 0= ausentes, 1= presentes

Algunos ejemplares de *G. floribundum* colectados en las localidades de Belice, Calakmul y Santa Rosa Xtampak pueden o no presentar una estipula membranosa que rodean el peciolo de las hojas, pero no se observa en ninguno otro ejemplar analizado.

8.- Indumento en la vena primaria: 0= ausentes, 1= presentes

Este carácter se decidió para diferenciar la presencia de indumento del haz, por ejemplo algunos ejemplares de Belice y Calakmul presentan haz glabro pero con la vena media ligeramente pubescente.

9.- Indumento en el envés de la lámina: 0= ausentes, 1= presentes

El indumento en el envés de la lámina ha sido un carácter para identificar las especies descritas en tratamientos taxonómicos. El envés con indumento es un carácter que se ha utilizado para identificar a *G. antigonoides* diferenciándose de *G. floribundum* por la ausencia de indumento.

10.- Tipo de inflorescencia: 0= racimos, 1= umbela, 2= fasciculados

La inflorescencia entre los géneros analizados son de tres tipos: Racimos en *Gymnopodium* y *Coccoloba*; Umbelas en *Eriogonum*; y Flores fasciculadas en *Podopterus*.

11.- Tipo de racimos: 0= solitario, 1= solos, pares y bifurcados

Aun cuando *Gymnopodium* presenta una inflorescencia en racimo, esta estructura se presenta en diversas presentaciones. Así, podemos encontrar individuos con racimos solitarios, individuos con racimos pares y bifurcados simulando una panícula; individuos con racimos solitarios y pares; individuos con racimos solitarios y bifurcados. En general es una estructura muy variable, sin embargo ejemplares de Oaxaca presentan un patrón único de racimos solitarios.

12.- Base de la inflorescencia: 0= sésiles, 1= sésiles y pedunculados, 2= solo pedunculados

La presencia de racimos sésiles y pedunculados son observados en los ejemplares de *G. floribundum*. En Oaxaca, por ejemplo, se observan únicamente racimos sésiles, pero en el resto de las localidades los racimos se presentan sésiles y pedunculados y en otros con racimos pedunculados.

13.- Indumento del pedicelo del fruto: 0= glabro, 1=pubescentes-estrigosos, 2= escabrosos-glabros

El indumento en los pedicelos de las flores básicamente son de dos tipos: ejemplares con indumento pubescente a estrigosos como los colectados en el noreste de la península de Yucatán y los colectados en Chiapas y Oaxaca; ejemplares colectados en el Suroestes de la península de Yucatán (Belice, Calakmul y Santa Rosa Xtampak) presnetan un pedicelo escabroso a casi glabro.

14.- Tricomas en el pedicelo con base glandular: 0= ausentes, 1= presentes.

Este carácter solo fue observado para el único ejemplar colectado en la región, donde la base de los tricomas es engrosado.

15.- Pedicelo articulado: 0= ausentes, 1= presentes.

Solo se encuentra en los géneros *Gymnopodium* y *Podopterus*, y ausente en *Coccoloba* y *Eriogonum*.

16.- Pedicelo alado: 0= ausentes, 1= presentes.

Presente únicamente en *Podopterus*.

17.- Número de periantos: 0= 5 Perianto, 1= 6 perianto.

El número de periantos es variable entre géneros, en *Coccoloba* por ejemplo, se presentan cinco periantos y en *Gymnopodium*, *Podopterus* y *Eriogonum* el número de perianto es seis.

18.- Parte acrescente en el fruto: 0= hipantio, 1= periantos

En varios géneros de Polygonaceae el hipantio y los periantos son acrescentes en el fruto cuando son maduros: en *Coccoloba* el hipantio es la estructura acrescente y en *Podopterus* y *Gymnopodium* es el perianto la estructura acrescente. En *Eriogonum jamesi* no se observó perianto y ni el hipantio acrescente en el fruto.

19.- Forma del Perianto acrescente: 0= Quillado y alado: 1= Abierto

En cuanto al perianto acrescente, podemos observar dos formas: Perianto quillado y alado en el caso de *Podopterus* y Periantos abiertos como en *Gymnopodium*.

20.- Forma del Aquenio: 0= globoso, 1= opiriforme-ovoide, 2= piramidal

El aquenio, fruto característico en Polygonaceae, en las Coccolobas se presentan aquenios globosos (*C. acapulcensis*) y aquenios Opiriformes (*C. uvifera*), en *Gymnopodium*, *Podopterus* y *Eriogonum* el aquenio es trígono.

21.- Indumento ovario: 0= glabro, 1= completo, 2= presentes por encima de la mitad

El indumento en los ovarios es importante dentro del *Gymnopodium*, algunos ejemplares por ejemplo los de Belice, Calakmul y Santa Rosa Xtampak presentan indumento por encima de la mitad del ovario. En las poblaciones del norte de Yucatán, Chiapas y Oaxaca el ovario presenta indumento desde la base del ovario. En *Coccoloba*, *podopterus* y *Eriogonum* es totalmente glabro.

CONCLUSIONES GENERALES

1. *Gymnopodium* está integrado por dos especies y dos variedades: *G. floribundum* var. *floribundum* con distribución en la parte norte de Belice, *G. floribundum* var. *antigonoides* con distribución en la Península de Yucatán, Chiapas, Oaxaca, Tabasco y Guatemala y una especie no descrita para el sur de las montañas mayas de Belice, en la Provincia Biótica Este de América Central.
2. Los sub-linajes de *Gymnopodium floribundum* s. s. muestran un patrón evolutivo de Belice (localidades ancestrales), pasando por las localidades del sur de México y las poblaciones más derivadas en el norte de la península de Yucatán.
3. El sub-linaje integrado por las localidades del norte de la península de Yucatán están más emparentados con las localidades del pacífico que con las localidades del sur de la península de Yucatán a pesar de la cercanía geográfica.