



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C

Posgrado en Ciencias Biológicas

**“FILOGEOGRAFÍA DE *Brosimum alicastrum* Sw. EN
MÉXICO”**

Tesis que presenta

ROGER ANTONIO SULUB TUN

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Recursos Naturales)

Mérida, Yucatán, México.

2021

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Roger Antonio Sulub Tun** titulado “**Filogeografía de *Brosimum alicastrum Sw. en México*”** fue realizado en el laboratorio de Marcadores Moleculares de la unidad de Recursos Naturales y el laboratorio de Biología Molecular de GeMBio, en las líneas de Servicios Ambientales de la Biodiversidad y Sistemática y florística del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Alfonso Larqué Saavedra y la Dra. Ivonne Sánchez del Pino, pertenecientes al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas dentro de la opción Recursos Naturales de este Centro.

Atentamente.



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 29 de marzo de 2021

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____



Roger Antonio Sulub Tun

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, bajo la dirección del Dr. Alfonso Larqué Saavedra y la Dra. Ivonne Sánchez del Pino.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca 720693, sin la cual no hubiera sido posible el desarrollo del presente trabajo.

Al CICY por las instalaciones y equipos utilizados en la realización de esta tesis.

Al Dr. Alfonso Larqué Saavedra por aceptarme en su grupo de trabajo y todo el apoyo que me ha brindado en estos últimos años.

A la Dra. Ivonne Sánchez del Pino por todo su apoyo y paciencia durante el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Daisy Pérez Brito por ser parte del comité tutorial y aportar comentarios muy valiosos para darle sentido al presente trabajo, además le agradezco por haberme permitido desarrollar gran parte de los experimentos en su laboratorio.

Al Dr. Ken Oyama por su tiempo y sus valiosos comentarios como revisor de este trabajo.

A la M. en C. Ariadna Ibarra por sus consejos y apoyo en el desarrollo de los experimentos.

Al IQI. Alberto Cortés por todo su apoyo en la realización de los experimentos.

A la M. en C. Gabriela López por la donación de las muestras utilizadas en el presente trabajo.

A la Lic. Silvia Vergara por todo su apoyo.

A la Ing. Martha Moya por su apoyo en las extracciones de ADN.

DEDICATORIAS

A mis papás Rosenda y Armin, mi hermanita Cecy, mis sobrinos Jaztiby, Armin y Victoria y a Mercy, mi querida hermanita, que aunque no esté con nosotros físicamente siempre me apoyó y sé que lo sigue haciendo al igual que toda mi familia. Les dedico este logro, muchas gracias por su apoyo y su confianza.

ÍNDICE	
LISTA DE TABLAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	3
1.1. ANTECEDENTES.....	3
1.1.1. Importancia de la biodiversidad.....	3
1.1.2. México, un país megadiverso.....	4
1.1.3. La complejidad geográfica de México y su relación con la biodiversidad.	4
1.1.4. Regionalización biogeográfica de México.....	6
1.1.5. Genética de árboles tropicales.....	9
1.1.6. Familia Moraceae.....	10
1.1.7. Género <i>Brosimum</i>	12
1.1.8. <i>Brosimum alicastrum</i> Sw.	13
Descripción botánica.....	14
Distribución.....	15
Usos e importancia.....	16
1.1.9. Filogeografía.....	17
1.1.10. Marcadores moleculares.....	18
ADN de cloroplasto.....	18
1.1.11. Secuencias de ADN de <i>Brosimum alicastrum</i> en Genbank.....	19
1.1.12. Estudios genéticos en <i>Brosimum alicastrum</i> en América Latina.....	21
1.1.13. Estudios genéticos en <i>Brosimum alicastrum</i> en México.....	22
1.2. JUSTIFICACIÓN.....	23
1.3. HIPÓTESIS.....	24
1.4. OBJETIVOS	24
1.4.1. General	24
1.4.2. Específicos	24
1.5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	25
CAPÍTULO II	27

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	27
2.2.1. Material de estudio.....	27
2.2.2. Extracción y amplificación del material genético.....	29
2.2.3. Edición y alineamiento de las secuencias.....	31
2.2.4. Diversidad genética y haplotípica.....	31
2.2.5 Estructura filogeográfica.....	32
2.2.6 Análisis filogenético.....	34
CAPÍTULO III	35
3.1 RESULTADOS.....	35
3.3.1 Diversidad genética y haplotípica.....	35
3.3.2 Estructura filogeográfica.....	41
3.4.5 Análisis filogenético.....	48
CAPÍTULO IV	51
2.4. DISCUSIÓN	51
CAPÍTULO V	57
5.1 CONCLUSIONES	57
5.2 PERSPECTIVAS	58
BIBLIOGRAFÍA.....	59
ANEXOS	70

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.1. Trabajos que reportan secuencias de ADN de <i>Brosimum alicastrum</i> en genbank.....	20
Tabla 2.1. Material vegetal (hojas) fresco de poblaciones de <i>Brosimum alicastrum</i> obtenido del trabajo de López-Barrera (2019).....	27
Tabla 2.2. Poblaciones de <i>Brosimum alicastrum</i> muestreadas en México por Lander y Monro (2015).....	28
Tabla 2.3. Regiones del genoma plastídico seleccionadas para la realización del estudio filogeográfico.	30
Tabla 2.4. Variables bioclimáticas de WorldClim	33
Tabla 2.5. Especies utilizadas como grupos externos.	34
Tabla 3.1. Estadísticos de las secuencias del genoma de cloroplastos incluidos en el estudio.....	35
Tabla 3.2. Identificador de poblaciones, estados donde se encuentran las poblaciones, coordenadas geográficas, número de individuos (N), haplotipos que contiene y provincia biogeográfica a la que pertenecen las poblaciones.....	36
Tabla 3.3. Análisis de varianza molecular de las poblaciones de <i>Brosimum alicastrum</i> agrupadas con base en los resultados de BAPS y las provincias biogeográficas de México.....	42
Tabla 3.4. Valores pareados del índice de fijación F_{st} entre las poblaciones de <i>Brosimum alicastrum</i> agrupadas de acuerdo a los clusters genéticos identificados en BAPS (1: Golfo y sur de México, 2: península de Yucatán y 3: Pacífico) y las provincias biogeográficas.....	44
Tabla 3.5. Desviación estándar, proporción de varianza y varianza acumulada de los primeros cuatro componentes.....	45
Tabla 3.6. Variables climáticas asociadas a cada componente principal. Los valores en negritas son las variables que aportan más en cada componente principal.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Estructuras neotectónicas de México: estructuras y provincias (líneas delgadas); límites de placas (líneas gruesas); pliegues del Golfo de México (trazas axiales); litosfera oceánica (diagonales amplias); grabenes (achurado) de Tepic (T), Colima (CO), Chapala (PC); Golfo de Tehuantepec (GT); fallas de Salina Cruz (SC), Polochic (P), Motagua (M) y Jocotán-Chameleón (J-C); Macizo de Chiapas (CM) y Depresión del Caimán (CT) [Fuente: Ortega <i>et al.</i> (2000), modificado por Espinosa <i>et al.</i> (2008)].	5
Figura 1.2. Provincias biogeográficas de México descritas por la CONABIO (1997) (Fuente: Espinosa <i>et al.</i> , 2008).	8
Figura 1.3. Distribución de la Familia Moraceae en el mundo (Fuente: Stevens, 2001).	11
Figura 1.4. Distribución de las especies del género <i>Brosimum</i> (Fuente: www.discoverlife.org)	13
Figura 1.5. Morfología de <i>Brosimum alicastrum</i> : árbol (A), tronco (B), corteza (C), látex (D), hojas (E), flor masculina (F), flor femenina (G), frutos (H), semillas (I).	15
Figura 1.6. Distribución de <i>Brosimum alicastrum</i> en México (Fuente: Pennington y Sarukhán, 2005).	16
Figura 2. 1. Mapa de distribución de poblaciones de <i>Brosimum alicastrum</i> en México incluidas en el presente estudio	29
Figura 3.1. Red de haplotipos de los individuos de <i>B. alicastrum</i> estudiados. Las barras indican pasos mutacionales entre haplotipos.	38
Figura 3.2. Distribución geográfica de los de haplotipos de <i>Brosimum alicastrum</i> en México.	39
Figura 3.3. Topología Neighbor-Joining de los individuos de <i>Brosimum alicastrum</i> incluidas en el estudio. Los individuos de color azul pertenecen a poblaciones del Golfo de México, las de color negro a poblaciones de la península de Yucatán y de color rojo a las poblaciones de la costa del Pacífico.	40
Figura 3.4. Grupos genéticos identificados en BAPS.	41
Figura 3.5. Mapa con las barreras genéticas identificadas.	43
Figura 3.6. Gráfica de varianzas de los primeros 10 componentes.	45
Figura 3.7. Gráfica del análisis de componentes principales.	48
Figura 3.8. Árbol filogenético de los haplotipos obtenido mediante análisis bayesiano.	49

RESUMEN

México es uno de los países con mayor biodiversidad en el mundo debido a su complejidad geológica y climática. Desafortunadamente esta diversidad biológica se ha visto amenazada principalmente por la actividad humana, la cual es la principal causa del decremento de la diversidad genética de las especies, poniendo a prueba su supervivencia a largo plazo. Una de las especies dominantes que se encuentran en los bosques tropicales de México es *Brosimum alicastrum* mejor conocido como “ramón”, “capomo” u “ojite”. Se trata de un árbol de gran importancia tanto desde el punto de vista biológico como del económico. Es considerado un sumidero de carbono, formador de suelo y gran aliado contra el cambio climático, por lo que es una excelente opción para los programas de reforestación. El Ramón es originario de América tropical y se distribuye desde México hasta Brasil. Hay escasos estudios genéticos realizados en esta especie y de los pocos que existen se ha reportado una alta variabilidad genética en las poblaciones a lo largo de su distribución; en México, se han encontrado tres grupos genéticos mediante el uso de microsatélites de núcleo. En el presente estudio filogeográfico de poblaciones de *B. alicastrum* en México, se analizaron dos regiones del genoma del cloroplasto de 82 individuos pertenecientes a 23 poblaciones. Se encontraron 30 haplotipos únicos con una diversidad haplotípica alta ($h=0.8323$) y resueltos en tres haplogrupos: 1) Golfo y sur de México, 2) península de Yucatán y 3) costa del Pacífico. La presencia de tres haplogrupos fue apoyada por una topología Neighbor-Joining y un análisis bayesiano de estructura poblacional. Se encontró una fuerte estructura genética con un valor del índice F_{st} de 0.35614. El valor calculado del índice N_{st} fue de 0.85262 y el G_{st} de 0.43081, al ser mayor el valor de N_{st} indica la existencia de estructura filogeográfica en las poblaciones de *B. alicastrum*. Además, se determinó mediante un análisis de componentes principales que las variables bioclimáticas influyen en la distribución de esta especie. Los resultados encontrados en el presente trabajo apoyan la existencia de tres grupos genéticos de *B. alicastrum* identificados en un trabajo previo en México realizado con datos del genoma nuclear.

ABSTRACT

Mexico is one of the places that harbor a great biodiversity in the world, based on geological and climatic complexity. Unfortunately, this biological diversity has been threatened for different reasons, mainly by human activity, which is the main fact that decreases the genetic species diversity, testing their long-term survival. One of the dominant species found in the tropical forests of Mexico is *Brosimum alicastrum* or better known as “ramon”, “capomo”, or “ojite”. It is a very important tree for both biological and economic approaches. It is considered a carbon sink, soil builder and a great option against climate change, making it an excellent option for reforestation programs. The ramon is native from tropical America and it is distributed from Mexico to Brazil. There are few genetic studies carried out in this species in which, a high genetic diversity in populations within its range of distribution has been reported; in Mexico, three genetic groups have been found based on microsatellites data. This phylogeographic study focused on Mexican populations of *B. alicastrum* and analyzed two regions of the chloroplast genome of 82 individuals from 23 populations. We found 30 unique haplotypes with high haplotype diversity ($h=0.8323$) and resolved in three haplogroups: 1) Gulf and southern Mexico, 2) Yucatán Peninsula and 3) Pacific coast. Our results were supported by a Neighbor-Joining topology and a Bayesian analysis of population structure. A strong phylogeographic structure was identified with *Fst* index of 0.35614. The calculated value of the *Nst* index was 0.85262 and the *Gst* 0.43081. Higher *Nst* value indicates the existence of a phylogeographic structure within populations of *B. alicastrum*. It was also determined that the bioclimatic variables, through a principal component analysis, influenced on this species distribution. Our results support the existence of three genetic groups of *B. alicastrum* in Mexico in concordance with findings of previous studies that used nuclear data.

INTRODUCCIÓN

Brosimum alicastrum Sw. (ramón) es un árbol que pertenece a la familia Moraceae y que se distribuye ampliamente en las zonas tropicales de América, desde México hasta el norte de Brasil. En México se encuentra ampliamente distribuido en las costas del Pacífico, Golfo de México y la península de Yucatán. Es un árbol perenne, generalmente dioico, que puede alcanzar hasta 45 m de altura y más de un metro de diámetro del tronco, presenta contrafuertes bien formados, corteza lisa parda grisácea con tonos amarillos con descamaciones en árboles adultos, látex blanco o amarillento y pegajoso, su fruto es una drupa amarilla rojiza de 2 a 3 cm conteniendo generalmente una semilla esférica aplanada por ambos extremos (Larqué-Saavedra, 2014a; Niembro, 2010; Berg, 1972). La importancia de esta especie se puede clasificar en dos grandes aspectos: 1) desde el punto de vista antropocéntrico, se pueden aprovechar prácticamente todas sus partes, ya sea como leña, alimentación humana y pecuaria, construcción, artesanías, medicinal, materia prima, etc., y 2) desde el punto de vista ecológico, funge como refugio y fuente de alimento para la vida silvestre de las selvas donde habita, es considerado como un sumidero de carbono, formador de suelo, entre otros aspectos que lo convierten en un excelente candidato para los programas de reforestación (Larqué-Saavedra, 2014a; Niembro, 2010; Berg, 1972).

Debido a su amplia distribución en México, así como la diversidad de usos y valor nutritivo de esta especie forestal, es que se ha propuesto como una alternativa alimenticia para reducir la importación de granos que se consumen, tales como el maíz y el trigo (Larqué-Saavedra, 2013, 2011). Como parte de la incorporación de esta especie en la cruzada contra el hambre se han realizado diversos estudios para estimar su productividad de hojas y semillas (Hernández-González *et al.*, 2014a), su capacidad fotosintética (Hernández-González *et al.*, 2019) y sus primeras etapas de crecimiento en campo (Hernández-González *et al.*, 2015), entre otros.

Desde el punto de vista de la genética, se han realizado algunos estudios en *B. alicastrum*. Se ha estudiado la filogeografía de esta especie presente en El Salvador, Nicaragua, Costa Rica y Panamá haciendo uso de la región intergénica *trnG* y el espaciador intergénico *trnH-psbA* del cloroplasto (Poelchau y Hamrick, 2013). También,

se han empleado inter-secuencias simples repetidas (ISSR) y amplificación directa de minisatélites (DAMD) para determinar la huella genética de la especie en algunas localidades de la península de Yucatán en México (Izamal, Sacalum, Abalá, Mérida Hopelchén y Campeche) (Larqué-Saavedra, 2014b). La filogeografía de *B. alicastrum* ha sido estudiada también en todo su rango de distribución (desde México hasta el norte de Brasil y Ecuador, incluyendo las islas caribeñas) utilizando las regiones *rpS16x1/trnQ^(UUG)*, *ndhF/rpL32-R* y *rpL32-F/trnL^(UAG)* del genoma plastídico y el marcador ribosomal ITSAB101F/ITS-AB102R del genoma nuclear (Lander y Monro, 2015). Recientemente, se realizó un estudio de diversidad y estructura genética en poblaciones naturales de *B. alicastrum* en México, utilizando marcadores de microsatélites nucleares con 33 poblaciones naturales en los estados de Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz, Tabasco, Campeche, Yucatán, Quintana Roo, Chiapas, Oaxaca, Michoacán, Jalisco, Nayarit y Sinaloa en México (López-Barrera, 2019).

Debido a la falta de estudios filogeográficos de *B. alicastrum* en México, el análisis de su estructura filogeográfica en el país, brindará información novedosa sobre los factores geográficos o climáticos que influyen en su distribución. Además, se determinarán zonas de alta variabilidad genética, haplotipos únicos y posibles zonas de conservación, siendo el presente trabajo el primer estudio filogeográfico que se realiza en México para la especie.

CAPÍTULO I

1.1. ANTECEDENTES

1.1.1. Importancia de la biodiversidad

La biodiversidad se define como “la variabilidad de organismos vivos de cualquier fuente, incluidos, entre otras cosas, los ecosistemas terrestres y marinos y otros ecosistemas acuáticos y los complejos ecológicos de los que forman parte; comprende la diversidad dentro de cada especie, entre las especies y de los ecosistemas” (ONU, 1992).

Los biólogos conservacionistas se han enfrentado a la pregunta “¿para qué sirve la biodiversidad?”. En un intento por responder a dicha pregunta, se han clasificado las contribuciones de la biodiversidad en dos categorías: 1) los bienes materiales (alimentación, medicina, materia prima, bioenergía) y 2) servicios ambientales (clima, ciclos biogeoquímicos, funciones hidrológicas, protección del suelo, etc.) (Myers, 1996).

La destrucción de grandes masas forestales, principalmente en las zonas tropicales, pueden traer como consecuencia extinciones en masa de las especies que habitan en estos ecosistemas (Gómez-Pompa *et al.*, 1972). La destrucción de la biodiversidad ha sucedido desde tiempos prehistóricos. Sin embargo, esto ocurría por causas naturales, pero desde hace más de un siglo, el hombre es el principal inductor de esta destrucción, debido principalmente a su expansión exponencial numérica y, por consiguiente, constante aumento de demanda de recursos. Algunas estimaciones indican que la tasa de extinción reciente es entre 100 a 1000 veces mayor que antes de la época del hombre (Pimm *et al.*, 1995).

La supervivencia de las especies depende en gran medida de la variabilidad que se presente dentro de la especie, una alta variabilidad genética en una especie puede proporcionarle ventajas para adaptarse a las condiciones cambiantes de los ecosistemas, mientras que las especies con menor variabilidad son más susceptibles a dichos cambios (Monroy-Vilchis, 2003). La variabilidad genética determina la capacidad de respuesta de las poblaciones a los cambios ambientales y contribuye a determinar su grado de vulnerabilidad a la extinción (CONABIO, 2006).

1.1.2. México, un país megadiverso

Se estima que más de 10 millones de especies de plantas, hongos y animales habitan la Tierra, de las cuales se conocen actualmente sólo alrededor de 1.8 millones (CONABIO, 2006).

México es uno de los cuatro países con mayor diversidad de especies animales y vegetales en todo el mundo (Sarukhán *et al.*, 2009), el cual alberga en aproximadamente 1% de la superficie terrestre, cerca del 60-70% de la diversidad biológica conocida del planeta. La diversidad conjunta de especies en México es cerca del 10-12% de la diversidad biológica total del planeta (CONABIO, 2006; Sarukhán *et al.*, 2012), conteniendo casi todos los tipos de vegetación que existen en el mundo (CONABIO, 2006) y un alto número de especies endémicas. Muchas de las especies que se encuentran en México presentan alta variabilidad genética entre sus subespecies y poblaciones (SEMARNAT, 2013).

México está entre los cinco países con mayor número de especies de plantas vasculares con poco más de 25 mil especies descritas (la mayoría angiospermas: 23 791 especies), lo que equivale aproximadamente al 9.1% de las especies descritas en el mundo (SEMARNAT, 2013).

1.1.3. La complejidad geográfica de México y su relación con la biodiversidad

En el país convergen cinco placas tectónicas (del Pacífico, de Cocos, Rivera, norteamericana y del Caribe), las cuales han originado cordilleras por plegamiento o vulcanismo, con mesetas y depresiones confinadas entre ellas (Figura 1.1). Esta complejidad geológica ha propiciado que el norte del territorio mexicano tenga una amplitud de casi 2000 km (desde Baja California hasta Tamaulipas), mientras que el Istmo de Tehuantepec, en el sureste, apenas rebasa los 200 km de amplitud en su parte más estrecha. Algo muy interesante que tiene lugar entre las planicies y llanuras es que, aún dentro de ellas se encuentran sistemas montañosos aislados, generando climas diferenciados, lo que ha propiciado el incremento de la biodiversidad y los endemismos (Espinosa *et al.*, 2008).

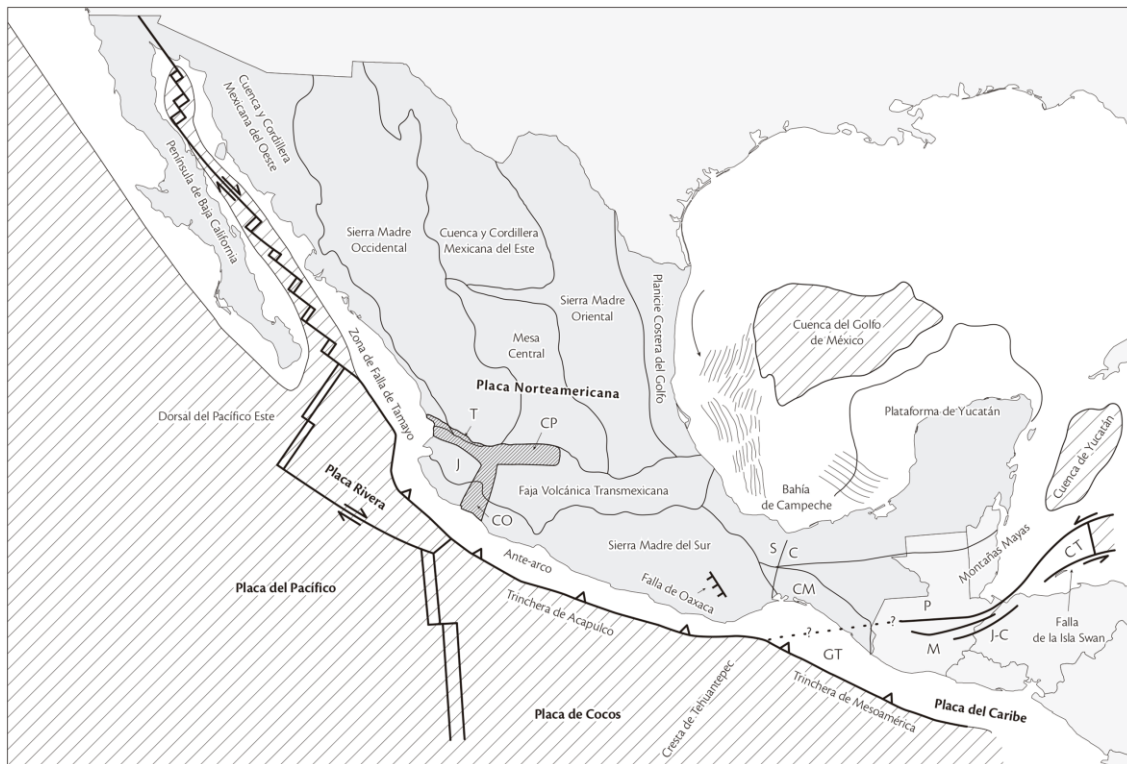


Figura 1.1. Estructuras neotectónicas de México: estructuras y provincias (líneas delgadas); límites de placas (líneas gruesas); pliegues del Golfo de México (trazas axiales); litosfera oceánica (diagonales amplias); grabenes (achurado) de Tepic (T), Colima (CO), Chapala (PC); Golfo de Tehuantepec (GT); fallas de Salina Cruz (SC), Polochic (P), Motagua (M) y Jocotán-Chameleón (J-C); Macizo de Chiapas (CM) y Depresión del Caimán (CT) [Fuente: Ortega *et al.* (2000), modificado por Espinosa *et al.* (2008)].

La complejidad geográfica del país, la acción de los vientos alisios y la oscilación estacional del cinturón subtropical de alta presión, hacen que en México se encuentren prácticamente todos los climas del mundo, lo que a su vez ha propiciado que la diversidad biológica, especialmente de los endemismos, sea muy alta (Espinosa *et al.*, 2008; Vidal-Zepeda, 2005; García, 2004).

En cuanto a la manera en que se originaron las especies en el país, existen dos teorías: la primera indica que hubieron invasiones o expansiones de grupos de plantas y

animales en diferentes épocas geológicas desde el norte y el sur, estos convergieron en diferentes áreas del país, incrementando el número de especies. La segunda teoría añade la participación de eventos geológicos y paleoclimáticos que fragmentaron la distribución de las especies en el pasado y que derivó en la formación o diversificación de muchas especies nuevas que evolucionaron *in situ* (Espinosa *et al.*, 2008).

1.1.4. Regionalización biogeográfica de México

El patrón geográfico de la riqueza de la biodiversidad en México muestra mayor concentración en zonas de mayor complejidad geológica y ecológica, razón por la cual, las cordilleras y áreas cercanas contienen la mayor densidad de especies. Los eventos geológicos que dieron lugar al surgimiento de estas cordilleras han sido asociados a la evolución de los tres diferentes componentes bióticos que se encuentran en el país:

- La región Neártica que abarca todo América del Norte y el archipiélago de las costas de California. En esta región predominan los matorrales y bosques templados.
- La región Neotropical que abarca desde el norte de la Patagonia hasta el Caribe y Mesoamérica. En esta región se distinguen dos áreas: 1) el neotrópico árido del norte comprendido por tierras áridas y subtropicales de México y suroeste de Estados Unidos, donde la vegetación predominante son variantes del matorral xerófilo, pastizales y selvas espinosas y 2) el neotrópico subhúmedo y húmedo de Mesoamérica que abarca llanuras costeras de las vertientes del Golfo de México y del Pacífico
- La Zona de Transición Mexicana de Montaña es el límite entre la región Neártica y Neotropical, comprende básicamente las zonas montañosas del país. En esta zona comprendida por el conjunto de cordilleras intercontinentales de México se encuentran grupos con relación Neártica y Neotropical, siendo una de las zonas con mayor riqueza de especies y endemismos (Morrone, 2005; Espinosa *et al.*, 2008; Koleff *et al.*, 2008).

Gracias a la distribución geográfica de los seres vivos es posible reconocer conjuntos de taxa que comparten una historia espacio-temporal común, los cuales

caracterizan las diferentes áreas geográficas. De tal forma que se han generado diferentes propuestas para el establecimiento de una clasificación de la regionalización de la biodiversidad en México con base en diferentes criterios. Estas clasificaciones se sustentan en que la distribución geográfica de la biodiversidad no ocurre al azar, sino que está determinada por la adaptación de las especies al medio y a su historia evolutiva, presentando límites que se repiten para diferentes taxa (Espinosa *et al.*, 2008).

Con el objetivo de realizar un consenso de las propuestas por diferentes autores acerca de los límites y criterios para definir las provincias biogeográficas de México, Arriaga *et al.* (1997) incorporaron los límites, dimensiones y subdivisiones de cada una de los modelos propuestos por diversos autores, obteniendo una propuesta de las provincias biogeográficas que se observan en la Figura 1.2. Al consensar diferentes trabajos, este modelo resulta práctico pues las provincias propuestas se encuentran bien sustentadas, aunque algunas provincias deberían ser consideradas como distritos (Morrone, 2005; Morrone *et al.*, 2002).



Figura 1.2. Provincias biogeográficas de México descritas por la CONABIO (1997) (Fuente: Espinosa *et al.*, 2008).

1.1.5. Genética de árboles tropicales

Los bosques tropicales son los ecosistemas terrestres que mayor riqueza biológica albergan. La extensión de bosques tropicales más importante y con mayor riqueza biológica y ecológica se encuentra en Colombia, Brasil, Perú, Costa Rica, Ecuador y México (Reading et al., 1995; Gentry, 1998).

Las características de historia de vida y ecológicas de la especie, tales como la longevidad, la tasa de fecundidad, la manera de dispersión del polen y semillas, la fertilización y la distribución ayudan a explicar gran parte de la variación genética de las plantas (López-Barrera, 2019; Hamrick *et al.*, 1992; Hamrick *et al.*, 1979). Existen diversos estudios de los procesos genéticos en árboles, no obstante, la mayoría se enfoca en especies de bosques templados y boreales, tales como los pinos y los robles (Dick, 2010); por otro lado, en especies de árboles tropicales este tipo de estudios es escaso (Finkeldey y Hattemer, 2007).

Dos factores que contribuyen enormemente a la diversidad genética son la dispersión del polen y la dispersión de semillas (Finkeldey y Hattemer, 2007). En la mayoría de los casos, el polen alcanza a moverse en distancias mayores que las semillas. En los bosques tropicales, animales como los monos, aves, murciélagos y roedores son vectores importantes para la dispersión de semillas, no obstante, solo son capaces de transportar dichas semillas por poco más de una docena de kilómetros como máximo (Shilton *et al.*, 1999). Las especies que dispersan sus semillas con la ayuda de animales (zoocoria) tienen una persistencia genética local por la reducida migración, propiciando mayor diferenciación genética, caso contrario con las especies que dispersan sus semillas a largas distancias (Nason, 2002), es decir, el patrón de distribución de las semillas es el factor más importante que determina la estructura genética espacial de los árboles tropicales (Degen *et al.*, 2014). De tal manera que, el estudio genético de la dispersión de semillas es fundamental, ya que juega un papel esencial para el establecimiento y la supervivencia de las especies (Degen *et al.*, 2014). Otro factor que influye en la estructura genética de los árboles tropicales es su distribución (Dutech *et al.* 2002; Degen *et al.*, 2001; Caron *et al.*, 2000). Las especies arbóreas tropicales se encuentran generalmente en parches, habiendo grandes distancias entre estos parches. El intercambio de polen

entre los parches de árboles es posible en muchas ocasiones, sin embargo, las semillas permanecen generalmente dentro del mismo segregado (Degen *et al.*, 2014).

Los factores antes mencionados afectan la diversidad genética de los árboles tropicales de diferentes maneras, por ejemplo *Dendropanax arboreus* (L.) Decne. & Planch (Figueroa-Esquivel *et al.*, 2010), *Castanopsis sclerophylla* (Lindley & Paxton) Schottky (Wang *et al.*, 2011) y *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake (Payn *et al.*, 2008) mostraron altos niveles de variación genética y baja estructura genética, debido principalmente al alto flujo de génico entre sus poblaciones y mecanismo muy eficientes de dispersión de semillas. En otras especies tropicales como *Caesalpinia echinata* Lam. (Cardoso *et al.*, 2005) y *Saraca asoca* (Roxb.) Willd. (Senapati *et al.*, 2012) se ha encontrado baja variabilidad genética con alta estructura genética, esto es debido en gran medida a mecanismos de dispersión de polen y semillas poco eficientes, además de tener tamaños poblacionales reducidos confinados solo a ciertas áreas geográficas. Además, en especies como *Handroanthus chrysotrichus* (Mart. ex A. DC.) Mattos, *H. impetiginosus* (Mart. ex A. DC.) Mattos, *Tabebuia roseoalba* (Ridl.) Sandwith y *H. serratifolius* (Vahl) S.O.Grose, se encontraron altos niveles de polimorfismos y alta variabilidad genética. Sin embargo, sus patrones de distribución en sus diferentes etapas de vida son bajos o no son claros, debido principalmente a la fragmentación del hábitat y disturbios afectando las poblaciones (Collevatti *et al.*, 2014); en las poblaciones de *Euterpe edulis* Mart. (Cardoso *et al.*, 2000) y *Swietenia macrophylla* King (Novick *et al.*, 2003), se encontraron valores bajos de diversidad genética, lo cual fue atribuido principalmente a factores antropocéntricos.

1.1.6. Familia Moraceae

Familia compuesta por 37 géneros y 1100 especies que se distribuyen ampliamente en zonas tropicales de todo el mundo (Figura 1.3). En México se encuentran 10 géneros y de 54 a 58 especies (Carvajal, 2017).

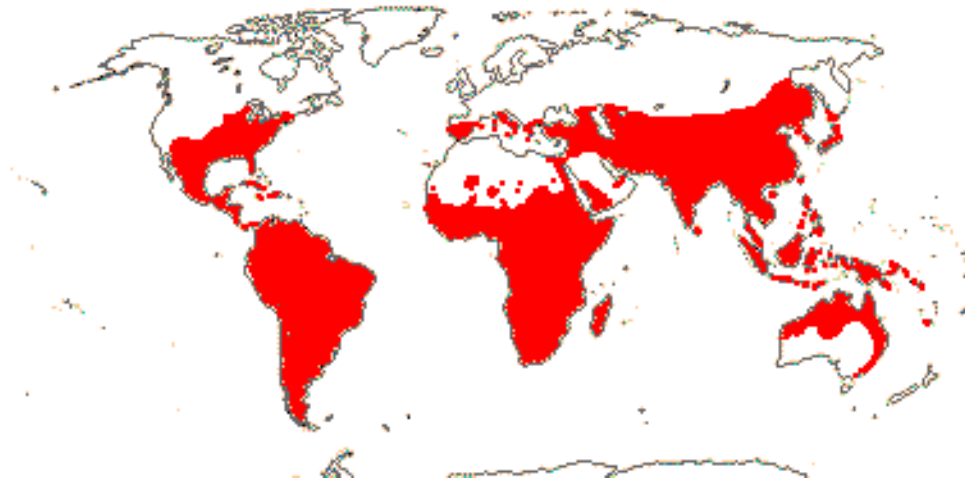


Figura 1.3. Distribución de la Familia Moraceae en el mundo (Fuente: Stevens, 2001).

Se ha propuesto que el origen de esta familia se dio en el supercontinente Gondwana (Corner, 1967). Sin embargo, la teoría más aceptada es el origen eurásico (Zerega *et al.*, 2005), la cual se encuentra sustentada por el registro fósil más antiguo encontrado en Europa, fechado para el Eoceno (Dupéron-Laudoueneix, 1980). Además, se ha estimado la diversificación de la familia Moraceae por vicarianza después de la ruptura de Gondwana hace aproximadamente 73-110 millones de años, posteriormente, las especies de esta familia colonizaron el continente americano empezado desde Sudamérica, este proceso ocurrió cuando se dieron colisiones entre África e India con Eurasia hace alrededor de 50 millones de años y 43-50 millones de años, estas colisiones crearon nuevas conexiones y al estar las tierras americanas cerca, se propiciaron los eventos de migración de la familia Moraceae (Zerega *et al.*, 2005).

En la familia Moraceae se encuentran plantas con alta diversidad de estructuras vegetativas y reproductivas. Son en su mayoría árboles y arbustos pequeños y medianos, aunque algunas especies del género *Brosimum* pueden alcanzar hasta 45 m de altura. Algunas especies también son trepadoras y muy raramente herbáceas (10%). Algunas pueden ser terrestres o hemiepífitas (plantas que germinan y empiezan su desarrollo sobre un árbol pero que eventualmente sus raíces llegan al suelo y absorben sus

nutrientes directamente de él), dioicas o monoicas, generalmente con presencia de látex y en algunos casos con espinas (Carvajal, 2017; Berg, 2001).

Esta familia ha sido importante desde tiempos ancestrales, algunas especies se han utilizado con fines artísticos (*Broussonetia papyrifera* (L.) Vent), para alimentación humana y comercio (*Artocarpus altilis* (Parkinson) Fosberg, *Morus alba* L., *Ficus carica* L., etc.), y para la elaboración del caucho (*Castilla elastica* Sessé), entre muchos otros usos (Carvajal, 2017).

1.1.7. Género *Brosimum*

El nombre de *Brosimum* proviene del vocablo griego *brosimos*, que significa comestible (Meiners *et al.*, 2009). Descrito por Swartz en 1788, es un género de árboles, que en algunas especies puede alcanzar alturas considerables (hasta 45 m) pudiendo formar contrafuertes (Berg, 1972). Pueden ser monoicos o dioicos, sin espinas, con látex blanco o amarillento (Carvajal, 2017; Berg, 1972). El género incluye una diversidad de 13 especies de distribución exclusiva en el Neotrópico, desde México y las Grandes Antillas, Cuba y Jamaica hasta el sur de Brasil (Figura 1.4). En México es posible encontrar a *B. lactescens* (S. Moore) C.C. Berg, *B. guianensis* (Aubl.) Huber y *B. alicastrum* Sw. (Carvajal, 2017).



Figura 1.4. Distribución de las especies del género *Brosimum* (Fuente: www.discoverlife.org)

La madera de algunas especies como *B. guianense* y *B. rubescens* es utilizada como leña. Las semillas y hojas de algunas especies es usado para alimentación humana y animal, también, el látex de algunas especies es inocuo y tiene uso medicinal para aliviar enfermedades del pulmón y para estimular la lactación, sin embargo, el látex de *B. acutifolium* Huber es venenoso (Berg, 1972).

1.1.8. *Brosimum alicastrum* Sw.

A lo largo de las regiones en las que se distribuye esta especie se le han asignado más de 50 nombres, algunos de los más comunes son "ojite", "ojoche", "capono" y "ramón" (Meiners *et al.*, 2009; Ayala y Sandoval, 1995; Pardo-Tejeda y Sánchez, 1980; Berg, 1972). El término ramón proviene del verbo ramonear, que hace referencia a que el ganado vacuno y otros animales se alimentan de sus semillas, plántulas y hojas (Meiners *et al.*, 2009).

Descripción botánica

Árbol perenne, generalmente dioico, puede llegar a medir hasta 35-40 m de altura (Figura 1.5A), siendo una de las principales especies del dosel, y más de 1 m de diámetro del tronco (Meiners *et al.*, 2009; Peters y Pardo-Tejeda, 1982; Berg, 1972). Posee raíces superficiales que generan contrafuertes grandes y bien formados, redondeados a ligeramente tubulares o aplanados (Figura 1.5B). Ramas ascendentes y luego colgantes. Corteza externa lisa, parda grisácea con tonos amarillos (Figura 1.5C), corteza interna de color crema amarillento, fibrosa a granulada con abundante látex blanco o amarillento, pegajoso y dulce (Figura 1.5D) (Carvajal, 2017; Berg, 1972).

Copa densa o abierta y piramidal. Hojas alternas, ovado-lanceoladas a ovadas o elípticas, de 4 a 18 cm de largo y de 2 a 7 cm de ancho, margen entero o aserrado, de color verde brillante en el haz y verde grisácea en el envés (Figura 1.5E). Flores unisexuales, solitarias y axilares. Las masculinas están reunidas en amentos globosos, compuestos de escamas peltadas, carecen de corola (Figura 1.5F). Flores femeninas en cabezuelas oblongas, ovales, con escamas más pequeñas (Figura 1.5G) (Carvajal, 2017; Berg, 1972).

El fruto es una drupa de 2 a 3 cm de diámetro con pericarpio carnoso de color amarillo rojizo, con sabor y olor dulce cuando está madura (Figura 1.5H), conteniendo generalmente una semilla esférica aplanada por ambos extremos (Figura 1.5I). La semilla mide de 9 a 13 mm de largo por 16 a 20 mm de ancho, cubiertas de una testa papirácea de color moreno claro, con los cotiledones montados uno sobre el otro, verdes, gruesos y feculentos. La semilla fresca tiene de 45 a 55 % de humedad (Carvajal, 2017; Berg, 1972).

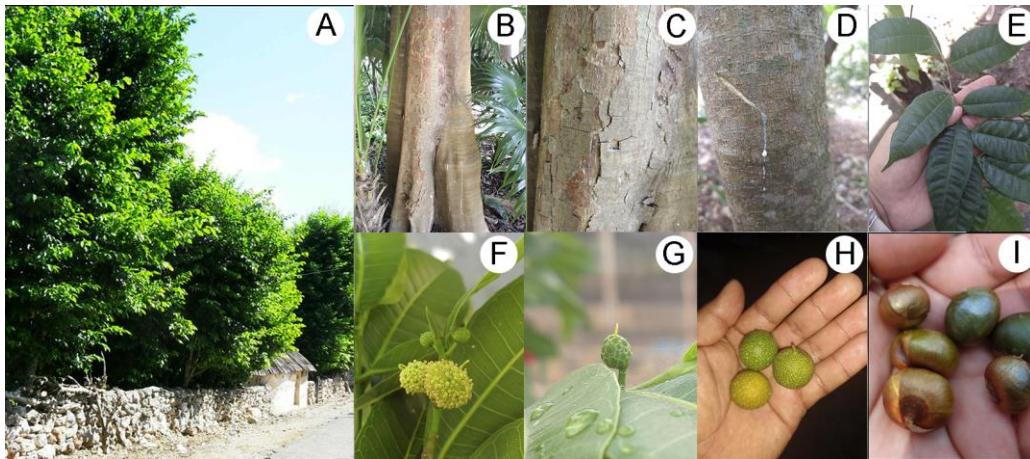


Figura 1.5. Morfología de *Brosimum alicastrum*: árbol (A), tronco (B), corteza (C), látex (D), hojas (E), flor masculina (F), flor femenina (G), frutos (H), semillas (I).

Distribución

Brosimum alicastrum es originario de los bosques húmedos de América tropical (Berg, 1972). Se distribuye en las zonas tropicales de América, desde México hasta el norte de Brasil, incluyendo las Islas del Caribe (Meiners *et al.*, 2009). En México es uno de los árboles dominantes de las zonas tropicales y se encuentra distribuido en altitudes de 50-800 metros sobre el nivel del mar, desde Sinaloa hasta Chiapas del lado del Pacífico, de Tamaulipas a Yucatán del lado del Golfo y el Caribe, y en la cuenca del río Balsas, desde Michoacán hasta Morelos (Berg, 1972; Figura 1.6).



Figura 1.6. Distribución de *Brosimum alicastrum* en México (Fuente: Pennington y Sarukhán, 2005).

Usos e importancia

Brosimum alicastrum es un árbol de uso múltiple y de enorme importancia agroforestal (Niembro, 2010), es considerado un sumidero de carbono que durante el día a altas temperaturas realiza fotosíntesis con alta eficiencia en el uso de agua, pudiendo adaptarse a diversas condiciones ambientales (Hernández-González *et al.*, 2019); es común y dominante cerca de las ruinas de sitios antiguos (Berg, 1972), una fuente de alimento muy importante para el desarrollo de la cultura maya (Meiners *et al.*, 2009). Actualmente es muy fácil encontrarlo en huertos familiares, atrios de iglesias, avenidas, parques y jardines, dónde es utilizado también como planta de sombra y ornato (Niembro, 2010).

Su madera se emplea como leña, postes, mangos de herramientas, construcción, fabricación de muebles, artesanías, como pulpa para papel, etc. El látex que produce es comestible, además se utiliza en el tratamiento de enfermedades como el asma, diabetes, tuberculosis y bronquitis (Niembro, 2010).

Las semillas contienen aceites esenciales, grasas, azúcares y diversas cantidades de aminoácidos como el triptófano. En algunos lugares se venden en los mercados y se acostumbra comerlas hervidas debido a que tienen un sabor parecido al de las castañas. Las semillas tostadas y molidas se mezclan con la harina de maíz para enriquecer el valor nutritivo de las tortillas (Niembro, 2010). Actualmente existen programas que capacitan a las mujeres sobre la producción, consumo y venta de semilla de *B. alicastrum*, pudiendo ser esta especie una excelente opción para el desarrollo rural sostenible y la conservación de las selvas tropicales (Meiners *et al.*, 2009), contribuyendo así a la recuperación de terrenos abandonados y a la captación de carbono (Larqué-Saavedra, 2014a, 2013, 2011), con lo que se pretende mitigar el cambio climático, concepto planteado en la Reunión Nacional sobre *B. alicastrum* “El sector forestal en apoyo a la cruzada contra el hambre y el cambio climático” (Foro Consultivo Científico y Tecnológico, AC, 2015), basado en el Decreto por el que se establece el Sistema Nacional para la Cruzada contra el Hambre (DOF, 2013). Recientemente se ha reportado que la harina producida con las semillas de *B. alicastrum* tienen hasta 75% de carbohidratos, razón por el cual resultó ser excelente para la producción de bioetanol (Olguin-Maciel *et al.*, 2017).

Debido a la relevancia que ha tomado la especie en tiempos recientes, el 16 de octubre de 2019 se realizó el “Primer festival del Ramón” en el Centro de Investigación de Yucatán. En este festival participaron representantes de diferentes instituciones del país, algunos de los cuales conforman el Centro para la conservación y aprovechamiento del Ramón (CENCAR), así como también empresas privadas y público en general. En dicho evento se presentaron diferentes conferencias sobre la importancia de esta especie, también se realizó la demostración de diferentes productos derivados principalmente de las frutas, semillas y hojas de este árbol (<https://www.cicy.mx/noticias-y-eventos/boletin-62-se-realizo-primer-festival-del-ramon-en-el-cicy>)

1.1.9. Filogeografía

La filogeografía es una disciplina relativamente nueva que ha crecido rápidamente en las últimas décadas (Awise, 2009), el término fue acuñado por primera vez en 1987 por Awise y colaboradores (Zink, 2002). Se define como la disciplina que estudia los principios y

procesos que gobiernan la distribución geográfica de los linajes genealógicos (Domínguez y Vázquez, 2009; Avise, 2000; Avise *et al.*, 1987). La filogeografía, al igual que la genética de poblaciones, ofrece las herramientas para inferir los procesos microevolutivos, los factores ecológicos e históricos que propiciaron el origen y la distribución de la diversidad genética, así como la especiación (Beheregaray 2008; Avise 2000).

La filogeografía es considerada como una subdisciplina de la biogeografía histórica, la cual integra conceptos y técnicas de biología molecular, genética de poblaciones, demografía, sistemática filogenética, etiología y paleontología, también es considerada como parte de la biología evolutiva, siendo un puente entre la microevolución y la macroevolución. Hay dos ámbitos en los que se utilizan aproximaciones filogeográficas cada vez con mayor frecuencia, en taxonomía para el reconocimiento y establecimiento de límites entre especies y en la biología de la conservación (Domínguez y Vázquez, 2009).

1.1.10. Marcadores moleculares

Un requisito muy importante en los trabajos de filogeografía es el uso de marcadores moleculares no recombinantes, esto se debe a que la recombinación puede llegar a desvirtuar profundamente las verdaderas relaciones genealógicas de las secuencias, por tal motivo, en la mayoría de los trabajos filogeográficos, se utilizan marcadores de núcleo donde exista poca o ninguna recombinación o marcadores de herencia citoplasmática no mendeliana como el ADN de cloroplastos (ADNcp) y de mitocondrias (ADNmt) (Lanteri y Confalonieri, 2003). El ADNmt de las plantas se ha utilizado en escasos estudios filogeográficos debido a que su estructura (tamaño del genoma, configuración y orden de los genes) cambia extremadamente rápido (Palmer, 1992).

ADN de cloroplasto

El ADNcp es una molécula bastante conservada (Palmer, 1991), tanto en el orden de los genes como en la secuencia del genoma entre las diferentes especies de plantas en

comparación con los otros dos genomas (Haider, 2001). Se trata de ADN circular de una extensión de entre 107 a 218 kilobases (kb), conteniendo de 120-130 genes (Daniell *et al.*, 2016), los cuales pueden ser divididos en tres grandes grupos, para la fotosíntesis, de proteínas ribosomales y otras funciones (Ohyama *et al.*, 1986).

El ADNcp de las plantas terrestres ha demostrado una tasa de mutación entre tres y cuatro veces más rápida que el ADNmt, por tal motivo, ha sido muy útil para estimar las relaciones filogenéticas en las plantas (Avice, 2009), además, es conocido por estar geográficamente estructurado en diversas especies de plantas (Avice, 2000).

Los genes del cloroplasto han sido ampliamente utilizados como marcadores para estudios sistemáticos y de evolución de especies y ecotipos, proporcionando información sobre la dispersión de la información genética a través de las semillas debido a su herencia maternal. Debido a que el orden y el contenido de los genes generalmente se conservan, es posible hacer alineaciones sintéticas de los genomas de los plástidos y reconstruir las inserciones, supresiones e inversiones que han ocurrido con el tiempo (Xu *et al.*, 2015).

1.1.11. Secuencias de ADN de *Brosimum alicastrum* en Genbank.

En el Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) existen 443 secuencias de distintas regiones del genoma de *B. alicastrum*, especialmente de regiones del ADNcp, secuencias que pertenecen a seis trabajos publicados y dos no publicados (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Trabajos que reportan secuencias de ADN de *Brosimum alicastrum* en genbank.

Accesiones	Objetivo del trabajo	Regiones	Referencia
3	Analizar la variación de secuencias de las familias Cannabaceae, Cecropiaceae, Celtidaceae, Moraceae, Ulmaceae, Urticaceae y varios grupos externos de las Rósidas	<i>rbcL</i> , <i>trnL-F</i> , y <i>ndhF</i>	Sytsma <i>et al.</i> , 2002
1	Examinar relaciones filogenéticas de la familia Moraceae, la reproducción de caracteres evolutivos y el origen de la polinización mutualista del higo	<i>ndhF</i>	Datwyler y Weiblen, 2004
1	Investigar la historia biogeográfica de la familia Moraceae mediante inferencias filogenéticas. Datación molecular con calibraciones de fósiles y pruebas geológicas	<i>ndhF</i>	Zerega <i>et al.</i> , 2005
3	Generar una biblioteca de códigos de barras multilocus para 296 especies de plantas leñosas en una parcela forestal de Barro Colorado.	<i>rbcL</i> , <i>matK</i> y <i>trnH-psbA</i>	Kress <i>et al.</i> , 2009
418	Determinar características comunes, espaciales y temporales en patrones de variación del ADN del cloroplasto de tres especies de árboles neotropicales.	<i>trnG</i> y <i>trnH-psbA</i>	Poelchau y Hamrick, 2013
1	Desarrollar un plan para implementar la combinación de métodos filogenéticos y fenéticos para la asignación taxonómica de códigos de barras de ADN en proyectos de diversidad vegetal a gran escala.	<i>psbA-trnH</i>	Papadopoulou <i>et al.</i> , 2015
12	No publicado	<i>rbcL</i> y <i>matK</i>	iBOL
4	No publicado	<i>rbcL</i>	Steeves <i>et al.</i>

1.1.12. Estudios genéticos en *Brosimum alicastrum* en América Latina.

En primera estancia, se encuentra un estudio genético del paisaje en Centroamérica utilizando cuatro pares de marcadores AFLP, en este trabajo se encontró que los factores que mejor explican las distancias genéticas en *B. alicastrum* son las barreras históricas o las barreras reproductivas crípticas, asimismo, los autores concluyen que la estacionalidad de la precipitación puede afectar el flujo génico de esta especie (Poelchau y Hamrick, 2012).

En un estudio filogeográfico en poblaciones de *B. alicastrum* en El Salvador, Nicaragua, Costa Rica y Panamá utilizando las regiones *trnG* y *trnH-psbA* del ADNcp, se encontró un alto nivel de polimorfismos, señalando que las poblaciones de *B. alicastrum* se subdividieron en el centro de Nicaragua, entre los límites de los refugios del Pleistoceno de El Salvador y Costa Rica, además, se sugirió que la divergencia de esta especie (en los sitios de estudio) alcanzó su punto máximo en el Pleistoceno (Poelchau y Hamrick, 2013).

Lander y Monro (2015) estudiaron la filogeografía de *B. alicastrum* en todo su rango de distribución, desde México hasta el norte de Brasil y Ecuador, utilizando la información generada por tres pares de marcadores de ADN de cloroplasto (1. *rpS16x1/trnQ^(UUG)*, 2. *ndhF/rpL32-R* y 3. *rpL32-F/trnL^(UAG)*) y el marcador nuclear ribosomal ITS-AB101F/ITS-AB102R. Los autores encontraron alta diversidad genética entre las poblaciones muestreadas, especialmente con los marcadores de cloroplasto. Ellos concluyeron que la diversidad genética encontrada se distribuye espacialmente, demostrando también cierta relación con la temperatura, la precipitación, la altitud, algunas ecozonas de la FAO y ecoregiones de la WWF (bosque caducifolio húmedo, selva húmeda, bosque seco). Un punto importante que mencionan en el trabajo es la consideración de cinco países, entre los cuales se encuentra México, como base para realizar una buena estrategia para preservar la diversidad genética de *B. alicastrum*.

1.1.13. Estudios genéticos en *Brosimum alicastrum* en México.

En un trabajo realizado en la península de Yucatán, específicamente en poblaciones de Mérida (Yucatán), Hopelchén (Campeche) y Sacalum (Yucatán), con el objetivo de determinar la huella genética de *B. alicastrum* utilizando marcadores ISSR (intersecuencias simples repetidas) y DAMD (amplificación directa de minisatélites de ADN), se encontró mayor tasa de polimorfismos y mejor agrupamiento genético al utilizar los marcadores DAMD, así como la existencia de una alta variabilidad intra-específica (Larqué-Saavedra *et al.*, 2014b)

Más recientemente, se evaluó la diversidad y estructura genética de 33 poblaciones naturales de *B. alicastrum* en los estados de Tamaulipas, San Luis Potosí, Veracruz, Tabasco, Campeche, Yucatán, Quintana Roo, Chiapas, Oaxaca, Michoacán, Jalisco, Nayarit y Sinaloa, mediante marcadores de microsatélites nucleares. En ese estudio se encontró una alta variabilidad genética (especialmente dentro de las poblaciones) y fuerte estructura genética con la presencia de tres grupos genéticos bien definidos, cuya localización, distribución y agrupación concuerdan con las provincias biogeográficas de México que conforman el Neotrópico húmedo (Golfo de México, Yucateca y Petén) y subhúmedo (costa del Pacífico) de Mesoamérica (López-Barrera, 2019).

1.2. JUSTIFICACIÓN

Brosimum alicastrum es una especie originaria de los bosques húmedos de América tropical que se distribuye desde México hasta el norte de Ecuador y Brasil. Es un árbol de gran importancia tanto desde el punto de vista ambiental como antropocéntrico. El ramón ha sido propuesto como una alternativa para disminuir la importación de granos para la alimentación humana y pecuaria, además de que el establecimiento de plantaciones en áreas deforestadas contribuirá a la recuperación de las mismas, así como mitigar el cambio climático, debido a que es un sumidero de carbono.

Se han realizado diversos estudios en *B. alicastrum* referentes a aspectos fotosintéticos, de productividad e incluso sociales. No obstante, son pocos los estudios moleculares realizados en esta especie. En México destaca un estudio sobre la diversidad y estructura genética de *B. alicastrum*, en el cual se encontraron tres grandes grupos genéticos. En lo que respecta a estudios filogeográficos, únicamente se han realizado dos para *B. alicastrum* y solo uno de ellos incluye a México. Sin embargo, el número de poblaciones analizadas fue limitado.

Por lo anterior y dada la relevancia de esta especie, surgió el interés de realizar un estudio filogeográfico de *B. alicastrum* en México, por lo que, este trabajo brindará información muy valiosa para identificar los factores geográficos y/o climáticos que afectan la estructura filogeográfica de esta especie en el país, asimismo, se podrán identificar zonas con alta diversidad genética, además de haplotipos únicos y, por consiguiente, zonas de gran valor para la conservación, siendo este el primer estudio filogeográfico para *B. alicastrum* enfocado en México.

1.3. HIPÓTESIS

Con base en estudios previos y los datos de la distribución reportada de *Brosimum alicastrum* en México, se espera encontrar una estructura filogeográfica definida por al menos tres grupos genéticos mediante el uso de marcadores moleculares de cloroplasto.

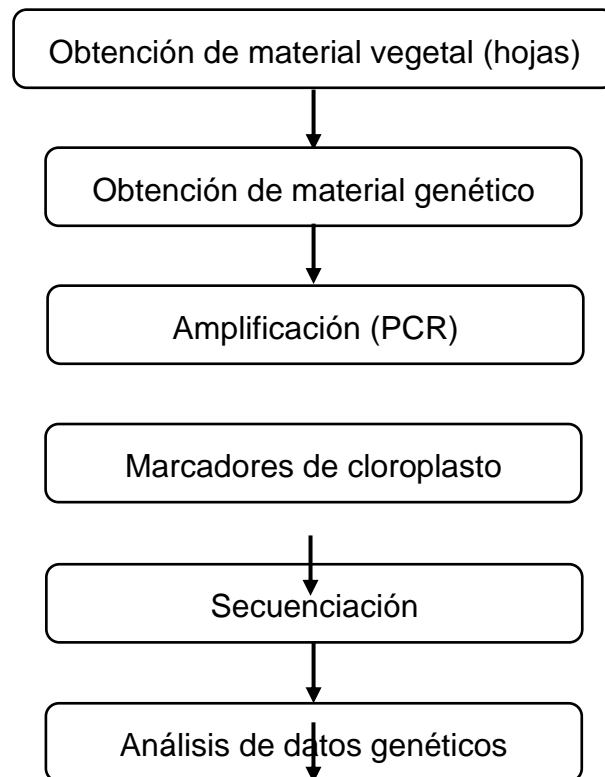
1.4. OBJETIVOS

1.4.1. General

Analizar la estructura filogeográfica de *Brosimum alicastrum* en México mediante el uso de marcadores moleculares de cloroplasto

1.4.2. Específicos

- Identificar los factores geográficos y climáticos que influyen en la estructura filogeográfica de *Brosimum alicastrum* en México.
- Identificar zonas de alta variabilidad genética de *Brosimum alicastrum* en México.
- Determinar haplotipos únicos y zonas de conservación de *Brosimum alicastrum* en México.

1.5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

CAPÍTULO II

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Material de estudio

Se usaron fragmentos de hojas frescas de 62 individuos pertenecientes a 18 poblaciones representativas de la investigación realizada por López-Barrera (2019) (Tabla 2.1), las cuales fueron donadas por la autora para el presente proyecto, y actualmente se conservan en congelación a -80°C en instalaciones del CICY, para enriquecer el muestro, se incluyeron secuencias de 31 individuos pertenecientes a cinco poblaciones muestreadas por Lander y Monro (2015) en México (Tabla 2.2). La distribución geográfica de las muestras se observa en la Figura 2.1.

Tabla 2.1. Material vegetal (hojas) fresco de poblaciones de *Brosimum alicastrum* obtenido del trabajo de López-Barrera (2019).

No.	Población	Estado	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)	Individuos analizados
1	El Azteca	Tamaulipas	23.077	-99.162	313	3
2	El Ojital	Tamaulipas	22.976	-99.153	218	4
3	El Sauz	SLP	21.932	-99.204	346	3
4	Aquismon	SLP	21.627	-99.04	260	3
5	Playa Bruja	SLP	21.257	-98.805	134	5
6	Naranjos	Veracruz	21.333	-97.659	110	4
7	Horcones	Veracruz	21.084	-97.821	338	3
8	Monte Negro	Veracruz	20.000	-96.742	292	5
9	Jalcomulco	Veracruz	19.335	-96.746	356	3
10	El Madrigal	Tabasco	17.496	-92.825	111	1
11	Tikuch	Yucatán	20.701	-88.111	32	4
12	El Ramonal	Q. Roo	19.399	-88.621	41	1

Tabla 2.1. Continuación

No.	Población	Estado	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)	Individuos analizados
13	Los Divorciados	Q. Roo	19.078	-88.456	53	2
14	Crucero Corozal	Chiapas	16.761	-91.008	167	3
15	Mazahua	Oaxaca	16.629	-94.949	173	1
16	Ruinas Guiengola	Oaxaca	16.387	-95.326	435	3
17	Ahuacapan	Jalisco	19.667	-104.333	950	1
18	El Copomal	Nayarit	21.886	-105.099	33	2

Tabla 2.2. Poblaciones de *Brosimum alicastrum* muestreadas en México por Lander y Monro (2015).

No.	Población	Estado	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)	Individuos
I	Mérida	Yucatán	20.97	-89.62	12	6
II	Coba	Q. Roo	20.489	-87.738	10	7
III	Tinunah	Yucatán	20.263	-88.683	30	7
IV	Tulum	Q. Roo	20.212	-87.432	5	7
V	Culavista	Nayarit	20.965	-105.309	15	4



Figura 2. 1. Mapa de distribución de poblaciones de *Brosimum alicastrum* en México incluidas en el presente estudio.

2.2.2. Extracción y amplificación del material genético

El material genético (ADN) de las hojas se obtuvo con el método de extracción con CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetilamonio) tomando como base el protocolo descrito por Doyle y Doyle (1987) y modificado por Faleiro *et al.* (2002) (Anexo 1).

Para el presente estudio se amplificaron, mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), dos regiones conservadas del genoma de cloroplasto. Las amplificaciones se realizaron en sentido y contrasentido utilizando los cebadores enlistados en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3. Regiones del genoma plastídico seleccionadas para la realización del presente estudio filogeográfico.

Región	Cebadores	Secuencia	Referencia
<i>trnQ-5'/rps16</i>	trnQ ^(UUG) (F)	GCGTGGCCAAGYGGTAAGGC	Shaw <i>et al.</i> , 2007
	rpS16x1 (R)	GTTGCTTTYTACCACATCGTTT	
<i>rpl32-F/trnL</i>	rpL32 (F)	CAGTTCCAAAAAACGTACTTC	
	trnL ^(UAG) (R)	CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT	

Se realizaron pruebas de amplificación de las regiones del genoma del cloroplasto, modificando las concentraciones de los reactivos y la temperatura de alineamiento de los cebadores. Al final, el protocolo empleado para amplificar la región *trnQ-5'/rps16* consistió en una mezcla con volumen final de 35 μ L, conteniendo buffer de PCR 1, 250 μ M de cada dNTP, 0.1 μ M de cada cebador, 1.4 μ L de albúmina sérica bovina (BSA) (10 mg/mL), 1 \times de Sol-Q, 1.4 U de taq polimerasa (Qiagen, México) y 1 μ L de ADN (20 ng/ μ L). El programa de temperaturas consistió en una desnaturalización inicial a 97°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 60°C por 2 min, 72°C por 2 min y una extensión final de 72°C por 7 min.

Para la amplificación de la región *trnL-F/rpl32-R* se preparó una mezcla con volumen final de 35 μ L, conteniendo buffer de PCR 1 \times , 250 μ M de cada dNTP, 0.1 μ M de cada cebador, 1.4 μ L de BSA (10 mg/mL), 1.4 U de taq polimerasa (Qiagen, México) y 1 μ L de ADN (20 ng/ μ L). El programa de temperaturas consistió en una desnaturalización inicial a 97°C por 2 min, seguido de 35 ciclos de 94°C por 1 min, 61.7°C por 2 min, 72°C por 2 min y una extensión final de 72°C por 7 min.

2.2.3. Secuenciación

En tubos de 1.5 mL se depositaron 5 μ L de producto de PCR a una concentración de 50 ng/ μ L y 5 μ L de cada uno los cebadores utilizados para las amplificaciones. Las muestras se secuenciaron en ambos sentidos por MacroGen Korea mediante el servicio Ez-Seq utilizando secuenciación Sanger.

2.2.3. Edición y alineamiento de las secuencias

Se utilizó la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) de Genbank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con el objeto de verificar que las secuencias sean similares o cercanas a la familia Moraceae. Las secuencias se editaron en Sequencher V.4.1 y se alinearon en MEGA V7 (Kumar *et al.*, 2016) usando MUSCLE (Multiple Sequence Comparison by Log- Expectation) (Edgar, 2004). Las secuencias de las regiones *rpl32-F/trnL* (522 pb) y *trnQ/rps16x1* (643 pb), al ser ambas regiones del genoma de cloroplastos, se concatenaron, obteniendo secuencias de 1165 pb y se analizaron como una sola unidad.

2.2.4. Diversidad genética y haplotípica

En el software Seqstate (Müller, 2006) se estimaron diferentes valores estadísticos de las secuencias. El número de haplotipos (k), diversidad nucleotídica (π) y diversidad haplotípica (h) se estimaron con DnaSp V6 (Rozas *et al.*, 2017). Adicionalmente, las secuencias se colapsaron en haplotipos únicos en PopArt V1.7 (<http://popart.otago.ac.nz/>), en este mismo software se generaron y editaron las redes de haplotipos utilizando el método TCS (Clement *et al.*, 2002). Las proporciones haplotípicas en las poblaciones se graficaron en diagramas de pastel utilizando MS Excel 2016 y se ubicaron geográficamente en un mapa con QGis 3.4.3 (QGIS Development Team, 2020).

Para corroborar los haplogrupos identificados, se generó un árbol Neighbor joining en el software MEGA V7 utilizando 10,000 bootstraps, posteriormente, se editó dicho árbol usando el programa FigTree (Rambaut, 2010).

2.2.5 Estructura filogeográfica

Se realizó un análisis bayesiano de la estructura poblacional con el apoyo del software BAPS v.5.3 (Corander *et al.* 2008), el cual utiliza un modelo basado en particiones e identifica grupos de secuencias utilizando una variante del algoritmo Metropolis-Hasting (Francisco *et al.*, 2012). Se evaluaron 10 repeticiones de algoritmos para cada valor de K (número de grupos) entre 1 y 10 y la partición óptima de la población de grupos K se caracterizó por la mayor probabilidad de registro marginal.

El análisis de varianza molecular (AMOVA) se estimó con Arlequin V3.5 (Excoffier y Lischer 2010) agrupando las poblaciones de México de tres diferentes maneras: 1) sin agrupación; 2) de acuerdo a los grupos genéticos identificados en BAPS y 3) de acuerdo a las provincias biogeográficas del Golfo de México, Costa del Pacífico, Yucateca y Petén de la CONABIO (1997).

Se calcularon los estimadores Nst (medida de diferenciación genética que incorpora distancias filogenéticas) y Gst (medida desordenada de diferenciación genética que no incorpora distancias filogenéticas) en DNAsp V6, posteriormente estos valores se compararon entre sí para inferir la existencia de estructura filogeográfica.

En Barrier (Manni *et al.*, 2004) se identificó la presencia de discontinuidades genéticas y con ello, grupos de poblaciones genéticamente diferenciadas. Este programa genera un mapa virtual utilizando las coordenadas geográficas para generar un polígono (triangulación de Delaunay). Las barreras en el polígono se estimaron mediante el algoritmo de máxima diferencia de Monmonier haciendo uso de un bootstrap de la matriz de los valores pareados de Fst obtenida de Arlequin.

Para identificar la influencia de los factores climáticos sobre la estructura genética de las muestras se realizó un análisis de componentes principales utilizando datos de 19

variables bioclimáticas y la altitud. Las variables bioclimáticas se encuentran relacionadas con la temperatura y precipitación, estos datos fueron obtenidos de la base de datos de WorldClim y cuentan con una resolución de 1 km² (<https://www.worldclim.org/data/worldclim21.html>) (Tabla 2.4). Los valores de las 19 variables bioclimáticas se extrajeron en R Studio (RStudio Team, 2020) haciendo uso de las paqueterías SP (Bivand *et al.*, 2013; Pebesma y Bivand, 2005), raster (Hijmans y van Etten, 2012) y sf (Pebesma, 2018).

Tabla 2.4. Variables bioclimáticas de la base de datos de WorldClim.

Variable	Descripción
BIO1	Temperatura media anual
BIO2	Rango medio diurno (promedio mensual (temperatura máxima – temperatura mínima))
BIO3	Isoterma (BIO2/BIO7) (*100)
BIO4	Estacionalidad de la temperatura (desviación estándar * 100)
BIO5	Temperatura del mes más cálido
BIO6	Temperatura del mes frío
BIO7	Rango de temperatura anual (BIO5 – BIO6)
BIO8	Temperatura media del trimestre más húmedo
BIO9	Temperatura media del trimestre más seco
BIO10	Temperatura media del trimestre más cálido
BIO11	Temperatura media del trimestre más frío
BIO12	Precipitación anual
BIO13	Precipitación del mes más húmedo
BIO14	Precipitación del mes más seco
BIO15	Estacionalidad de la precipitación (coeficiente de variación)
BIO16	Precipitación del trimestre más húmedo

Tabla 2.4. Continuación.

Variable	Descripción
BIO17	Precipitación del trimestre más seco
BIO18	Precipitación del trimestre más cálido
BIO19	Precipitación del trimestre más frío

2.2.6 Análisis filogenético

Se estimó que el modelo TPM1uf+G es el modelo de sustitución de nucleótidos que mejor se adaptó a las secuencias, siguiendo el criterio BIC (criterio de información bayesiana) implementado en JmodelTest.

Se realizó un análisis bayesiano de las secuencias de los haplotipos identificados en PopArt, dicho análisis se aplicó en Mr. Bayes V3.2 (Ronquist *et al.*, 2012). Se corrieron dos análisis aplicando simulaciones de cadenas de Markov Monte Carlo con 10,000,000 de iteraciones muestreadas cada 1,000. Se descartaron el primero y último 20% de los árboles y el árbol consenso resultante se editó en FigTree. Se incluyó en el análisis secuencias de tres especies de la familia Moraceae (Tabla 2.5) seleccionadas de acuerdo a la filogenia de la familia publicada por Zerega *et al.* (2005), las secuencias se descargaron de GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)

Tabla 2.5. Especies utilizadas como grupos externos.

Especie	Accesión
<i>Brossonetia papyrifera</i> (L.) Vent.	MH189570.1
<i>Mailasia scandens</i> (Lourerio) Hooker y Arnoot	NC_047182.1
<i>Antiaris toxicaria</i> Lesch.	NC_042884.1

CAPÍTULO III

3.1 RESULTADOS

3.3.1 Diversidad genética y haplotípica

Las secuencias analizadas en el presente estudio tuvieron bajo contenido de GC, 9.5 y 19.8% para las regiones *rpl32F/trnL* y *trnQ/rps16x1*, respectivamente. La variabilidad fue de 2.29% para la región *rpl32F/trnL* y 4.51% para la región *trnQ/rps16x1*, siendo la región *trnQ/rps16x1* más informativa (Tabla 3.1).

Tabla 3.1. Estadísticos de las secuencias del genoma de cloroplastos incluidos en el estudio.

	<i>rpl32-F/trnL</i>	<i>trnQ/rps16x1</i>	Concatenado
Posición en el alineamiento	1	2	
Caracteres	522	643	1165
Longitud (bases)	498-513	616-641	1114-1147
Divergencia (%)	0.428	0.563	0.511
ti/tv	0.461	1.846	0.996
Variabilidad (%)	2.299	4.51	3.774
Informativo (%)	1.341	2.177	1.801
% GC	9.503	19.752	15.211
% A	42.326	37.526	39.653
% C	5.034	8.973	7.228
% G	4.47	10.779	7.984
% T	48.17	42.722	45.136

Al analizar las secuencias concatenadas se encontró una diversidad haplotípica de $h=0.8323$, con 30 haplotipos únicos y una diversidad nucleotídica de $\pi=0.00724$. Los

haplotipos identificados en cada una de las poblaciones incluidas en el presente estudio se enlistan en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Identificador de poblaciones, estados donde se encuentran las poblaciones, número de individuos (N), haplotipos que contiene y provincia biogeográfica a la que pertenecen las poblaciones.

No.	Clave	Población	Estado	Haplotipos	Provincia
1	AZT	El Azteca	Tamaulipas	H1, H3	Golfo
2	OJI	El Ojital	Tamaulipas	H1, H5	Golfo
3	SAU	El Sauz	SLP	H1, H11	Golfo
4	AQU	Aquismón	SLP	H1, H2	Golfo
5	BRU	Playa Bruja	SLP	H1	Golfo
6	NAR	Naranjos	Veracruz	H1	Golfo
7	HOR	Horcones	Veracruz	H1, H3	Golfo
8	MON	Monte Negro	Veracruz	H1, H9, H10	Golfo
9	JAL	Jalcomulco	Veracruz	H1, H7	Golfo
10	MAD	Madrigal	Tabasco	H8	Golfo
11	TIK	Tikuch	Yucatán	H17, H18, H19, H20	Yucateca
12	RAM	Ramonal	Q. Roo	H15	Petén
13	DIV	Divorciados	Q. Roo	H14, H15	Petén
14	CCO	Crucero Corozal	Chiapas	H1, H12	Golfo
15	MAZ	Mazahua	Oaxaca	H1	Pacífico
16	GUI	Ruinas Guiengola	Oaxaca	H1, H5, H6	Pacífico
17	AHU	Ahuacapán	Jalisco	H25	Pacífico
18	COP	El Copomal	Nayarit	H26, H27	Pacífico
I	MER	Mérida	Yucatán	H13, H16	Yucateca
II	COB	Coba	Q. Roo	H13	Petén

Tabla 3.2. Continuacion.

No.	Clave	Población	Estado	Haplotipos	Provincia
III	TIN	Tinuncah	Yucatán	H21, H22, H23, H24	Yucateca
IV	TUL	Tulum	Q. Roo	H13	Petén
V	CUL	Culavista	Nayarit	H28, H29, H30	Pacífico

De los 30 haplotipos identificados en este análisis, los más representativos son los haplotipos H1 y H13 con 28 y 19 individuos incluidos, respectivamente. De acuerdo a la red de haplotipos, las poblaciones de *B. alicastrum* estudiadas poder ser clasificadas en tres haplogrupos: 1) Los individuos que representaron el haplogrupo 1 se encuentran distribuidos en la costa del Golfo y sur de México, donde se observan 12 haplotipos, incluido el haplotipo más común (H1); 2) los individuos que integraron el haplogrupo 2 se distribuyen en la península de Yucatán, donde se identificaron 12 haplotipos, con predominancia del haplotipo H13; 3) los individuos que conformaron el haplogrupo 3 estan presentes en la costa del Pacífico, este haplogrupos esta conformado por seis haplotipos (H25-H30) menos comunes y que no se identificaron en las otras zonas antes mencionadas (Figura 3.1).

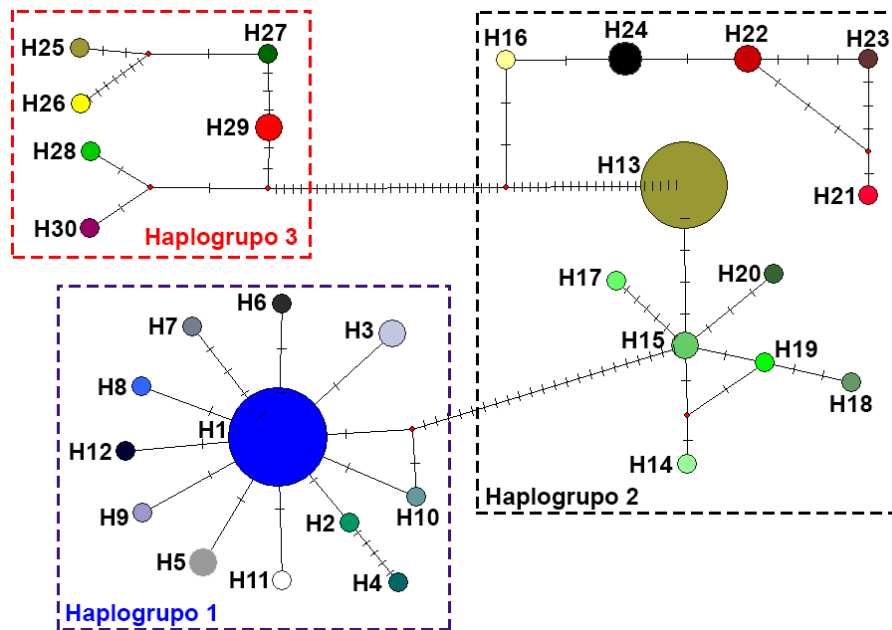


Figura 3.1. Red de haplotipos de los individuos de *Brosimum alicastrum* estudiados. Las barras indican pasos mutacionales entre haplotipos

Al sobreponer la capa de las provincias biogeográficas de CONABIO en el mapa de la distribución de haplotipos se observa que las provincias Yucateca y Petén comparten el haplotipo H13. La agrupación genética representada por el haplotipo H1 se comparte en la provincia geográfica del Golfo de México y sur de la provincia de la costa del Pacífico. Por último, en la parte norte de la provincia de la costa del Pacífico se observan haplotipos que no se encuentran en las zonas antes mencionadas, siendo así un tercer grupo genético (Figura 3.2). Lo anterior apoya la existencia de tres grupos genéticos de *B. alicastrum* en México. En el grupo genético conformado por las poblaciones del Golfo y sur de México predomina el haplotipo H1 en toda la extensión del grupo genético, pudiendo ser considerado ancestral para dicho grupo.

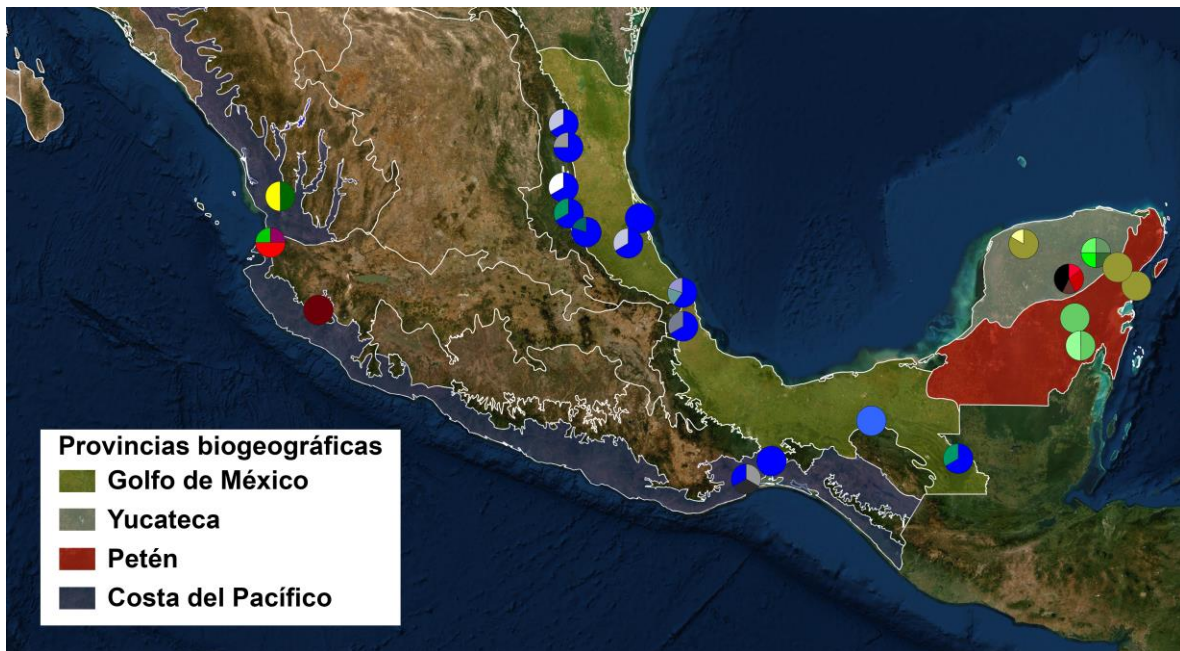


Figura 3.2. Distribución geográfica de los haplotipos de *Brosimum alicastrum* en México.

En la topología Neighbor-joining (Figura 3.3) se observa que los individuos se separaron en tres grandes grupos, a) el primero comprendido por aquellos incluidos en poblaciones de la costa del Golfo y sur de México, b) el segundo con individuos de las poblaciones de la península de Yucatán y c) el tercero con los individuos de las poblaciones de la costa del Pacífico, apoyando los resultados obtenidos en la red de haplotipos en donde se identificaron también tres grupos génicos.

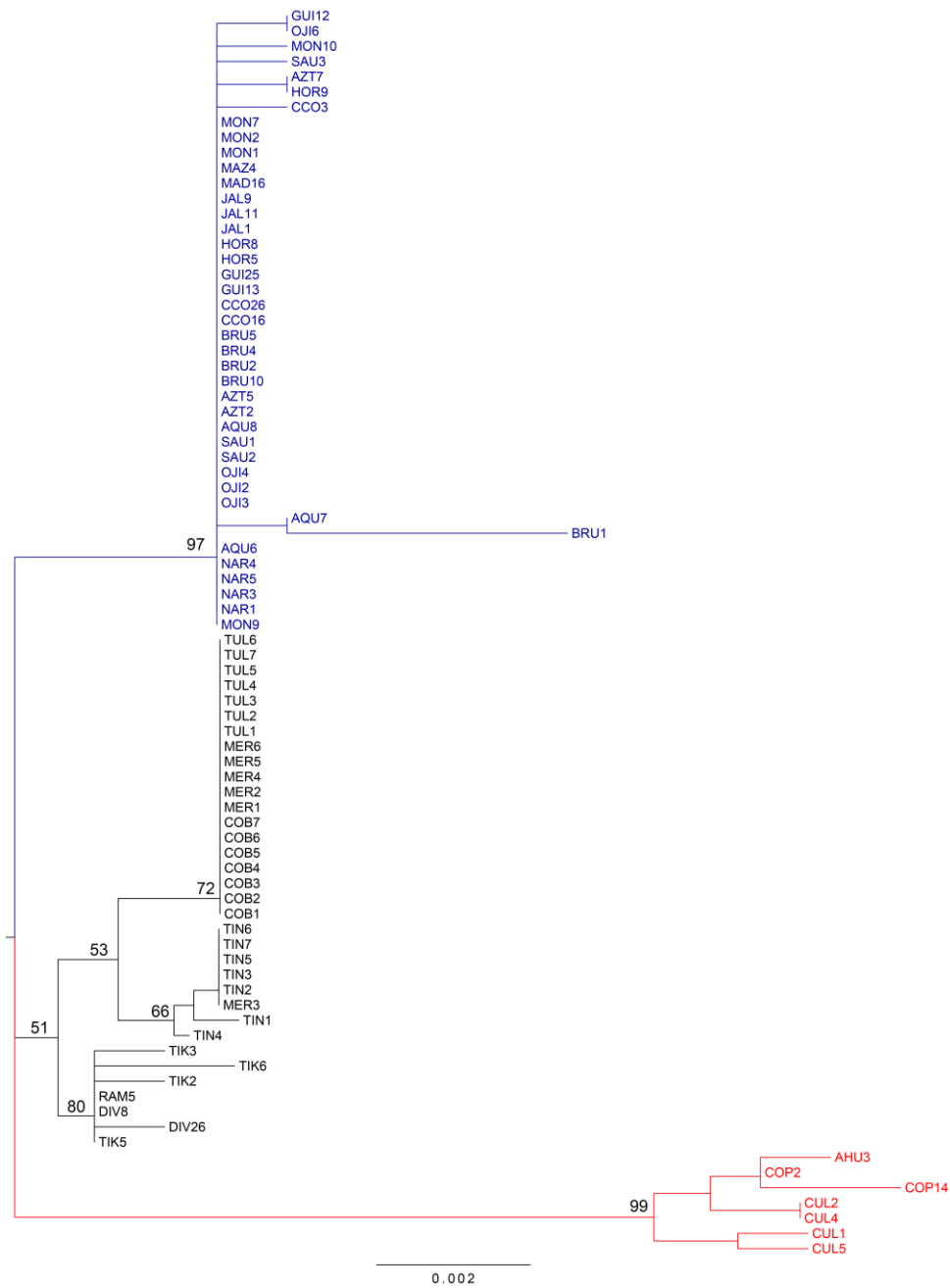


Figura 3.3. Topología Neighbor-Joining de los individuos de *Brosimum alicastrum* incluidas en el estudio. Los individuos de color azul pertenecen a poblaciones del Golfo de México, las de color negro a poblaciones de la península de Yucatán y de color rojo a las poblaciones de la costa del Pacífico.

3.3.2 Estructura filogeográfica

En el análisis de estructura poblacional con BAPS se identificaron 3 agrupaciones genéticas, la primera incluyó todas las poblaciones de la costa del Golfo y Sur de México, la segunda se conformó con las poblaciones de la costa del Pacífico y la tercera con las poblaciones de la península de Yucatán (Figura 3.4).

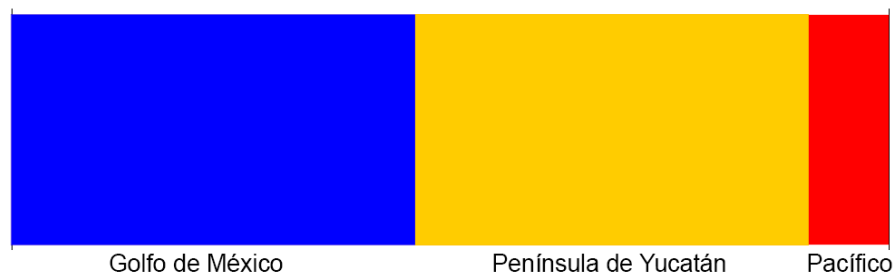


Figura 3.4. Grupos genéticos identificados en BAPS.

El análisis no jerárquico de varianza molecular (AMOVA) arrojó porcentajes de variación altas, especialmente dentro de las poblaciones. Los valores de F_{st} fueron estadísticamente significativos en todas las maneras de agrupación de las poblaciones, indicando así que los grupos son diferentes unos de otros (Tabla 3.3), de igual manera se encontró que varias de las poblaciones individuales son diferentes unas de otras (Anexo 2).

Tabla 3.3. Análisis de varianza molecular de las poblaciones de *Brosimum alicastrum* agrupadas con base en los resultados de BAPS y las provincias biogeográficas de México.

Fuente de la variación	g.l	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación	Índice de fijación
De acuerdo a los cluster identificados en BAPS					
Entre poblaciones	2	8.79	0.17443	35.61	$F_{st}=$ 0.35614
Dentro de las poblaciones	79	24.912	0.31535	64.39	
Total	81	33.707	0.48978		
De acuerdo a las provincias biogeográficas (CONABIO)					
Entre poblaciones	3	9.935	0.15887	34.27	$F_{st}=$ 0.34266
Dentro de las poblaciones	78	23.772	0.30477	65.73	
Total	81	33.707	0.46364		

Se identificaron cinco barreras con BARRIER: una que separó las poblaciones del golfo de México con las del norte de la costa del Pacífico. Una segunda barrera se encontró en la zona del Istmo de Tehuantepec. La tercera barrera se encontró cerca del borde de la provincia del Golfo y del Petén. En las poblaciones de la península de Yucatán se encontraron dos barreras que separan las poblaciones en 3 grupos. De las cinco barreras identificadas, solo la que separa las poblaciones del norte de la costa del Pacífico con las del norte del golfo de México corresponde a una barrera física, específicamente a las cordilleras que conforman el Altiplano central de México (Figura 3.5).

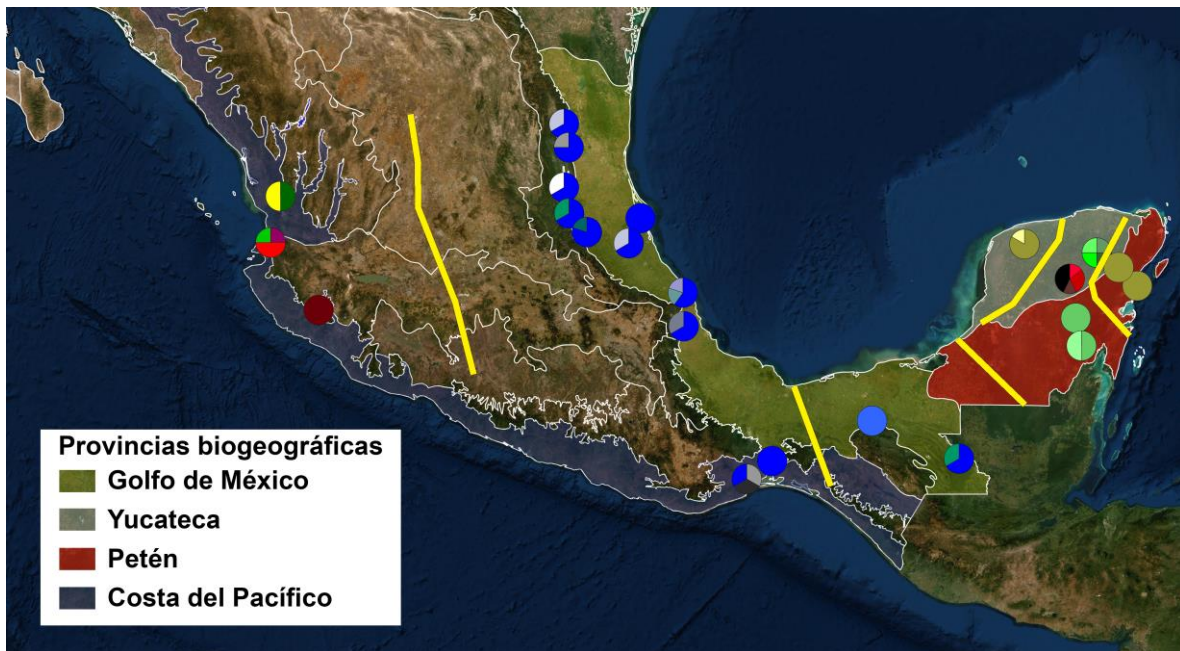


Figura 3.5. Mapa de distribución de los haplotipos con las barreras genéticas identificadas.

Al agrupar las poblaciones de acuerdo a los grupos genéticos identificados en BAPS se determinó que los valores del índice de fijación fueron estadísticamente significativos entre los tres grupos, el valor mayor de F_{st} se estimó entre el grupo 1, representado por las poblaciones del Golfo y sur de México, y el grupo 3, representado por las poblaciones de la costa de Pacífico; por otro lado, el valor menor del índice de fijación se encontró entre el grupo 2, representado por las poblaciones de la península de Yucatán y el grupo 3. Cuando se agruparon las poblaciones de acuerdo a las provincias biogeográficas de la CONABIO, se encontró que el valor mayor de F_{st} ocurrió entre la provincia del Golfo y el Petén, mientras que el menor fue entre la costa del Pacífico y la Yucateca (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Valores pareados del índice de fijación F_{st} entre las poblaciones de *Brosimum alicastrum* agrupadas de acuerdo a los clusters genéticos identificados en BAPS (1: Golfo y sur de México, 2: península de Yucatán y 3: Pacífico) y las provincias biogeográficas.

Grupos BAPS				Provincias biogeográficas				
	1	2	3		Golfo	Pacífico	Yucateca	Petén
1	-			Golfo	-			
2	0.32	-		Pacífico	0.19	-		
3	0.39	0.21	-	Yucateca	0.32	0.07	-	
				Petén	0.56	0.39	0.19	-

El valor del índice N_{st} (0.85262) fue mayor que el de G_{st} (0.43081), este resultado indica que existe estructura filogeográfica entre las poblaciones.

Del análisis de componentes principales, se obtuvo que, es posible resumir gran parte de las 20 variables incluidas todas en tres componentes principales. La selección del número de componentes se hizo identificando en una gráfica de varianzas (calculada en R Studio) el punto en donde la gráfica forma un ángulo pronunciado asemejándose a un “codo” (Figura 3.6). Aunque con tres componentes principales se explica un alto porcentaje de los datos (77%), se tomó en cuenta un componente principal más, logrando abarcar el 87% la información inicial (Tabla 3.5).

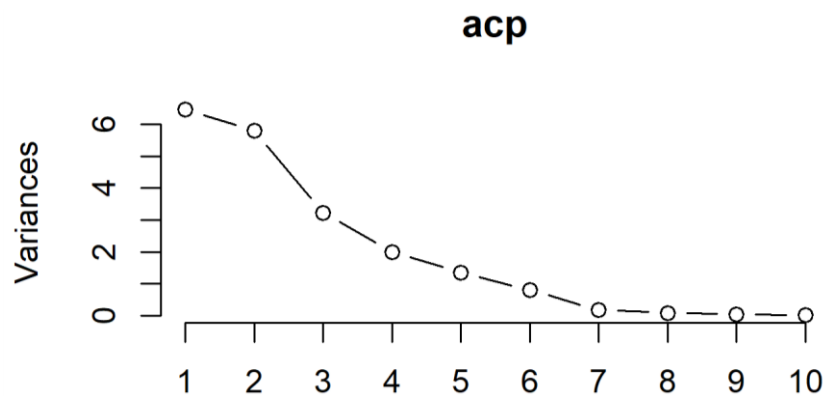


Figura 3.6. Gráfica de varianzas de los primeros 10 componentes.

Tabla 3.5. Desviación estándar, proporción de varianza y varianza acumulada de los primeros cuatro componentes.

	PC1	PC2	PC3	PC4
Desviación estándar	2.54	2.41	1.80	1.41
Proporción de varianza	0.32	0.29	0.16	0.10
Proporción acumulada	0.32	0.61	0.77	0.87

Las variables más representativas del componente principal PC1 son la BIO1, BIO6 y BIO11, todas relacionadas a la temperatura. En el caso de la PC2 las variables más representativas son la BIO14, BIO17 y BIO19, relacionadas a la precipitación, mientras que, el PC3 está representada por BIO8, BIO10 variables relacionadas a la temperatura y BIO18, relacionada con la precipitación. Por último, el PC4 se encuentra

representado por BIO2, BIO3, variables relacionadas a la temperatura y BIO15 relacionada a la precipitación (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Variables climáticas asociadas a cada componente principal. Los valores en negritas son las variables que aportan más en cada componente principal.

Variable	Descripción	PC1	PC2	PC3	PC4
BIO1	Temperatura media anual	0.358	-0.051	-0.202	-0.073
BIO2	Rango medio diario (promedio mensual (temperatura máxima – temperatura mínima))	0.030	0.240	-0.154	0.337
BIO3	Isotermia (BIO2/BIO7) (*100)	0.314	0.025	0.081	0.337
BIO4	Estacionalidad de la temperatura (desviación estándar * 100)	-0.309	0.081	-0.205	-0.319
BIO5	Temperatura del mes más cálido	0.193	0.104	-0.351	-0.002
BIO6	Temperatura del mes frío	0.334	-0.185	0.054	-0.044
BIO7	Rango de temperatura anual (BIO5 – BIO6)	-0.222	0.232	-0.234	0.041
BIO8	Temperatura media del trimestre más húmedo	0.181	0.062	-0.418	-0.294
BIO9	Temperatura media del trimestre más seco	0.323	-0.157	-0.001	0.264
BIO10	Temperatura media del trimestre más cálido	0.202	0.001	-0.399	-0.316
BIO11	Temperatura media del trimestre más frío	0.379	-0.071	-0.022	0.134
BIO12	Precipitación anual	-0.135	-0.362	-0.138	0.115
BIO13	Precipitación del mes más húmedo	-0.186	-0.256	-0.259	0.215

Tabla 3.7. Continuación.

Variable	Descripción	PC1	PC2	PC3	PC4
BIO14	Precipitación del mes más seco	-0.061	-0.382	0.053	-0.098
BIO15	Estacionalidad de la precipitación (coeficiente de variación)	-0.036	0.246	-0.197	0.355
BIO16	Precipitación del trimestre más húmedo	-0.162	-0.242	-0.279	0.312
BIO17	Precipitación del trimestre más seco	-0.068	-0.383	0.039	-0.089
BIO18	Precipitación del trimestre más cálido	-0.177	-0.114	-0.376	0.220
BIO19	Precipitación del trimestre más frío	-0.051	-0.392	0.004	0.022
Altitud		-0.184	0.160	0.152	0.199

En la gráfica de componentes principales se observa que es posible agrupar las poblaciones en tres grandes grupos. En el primer grupo se encuentran poblaciones de la península de Yucatán y dos del sur del País (GUI y MAZ), así como una de la costa del pacífico (COP), influenciados por el PC1. En el segundo grupo se encuentran poblaciones del Golfo de México y de la costa del Pacífico, influenciados en gran medida el PC2. En el tercer grupo se encuentran dos poblaciones del sur del país influenciado por el PC3 (Figura 3.7).

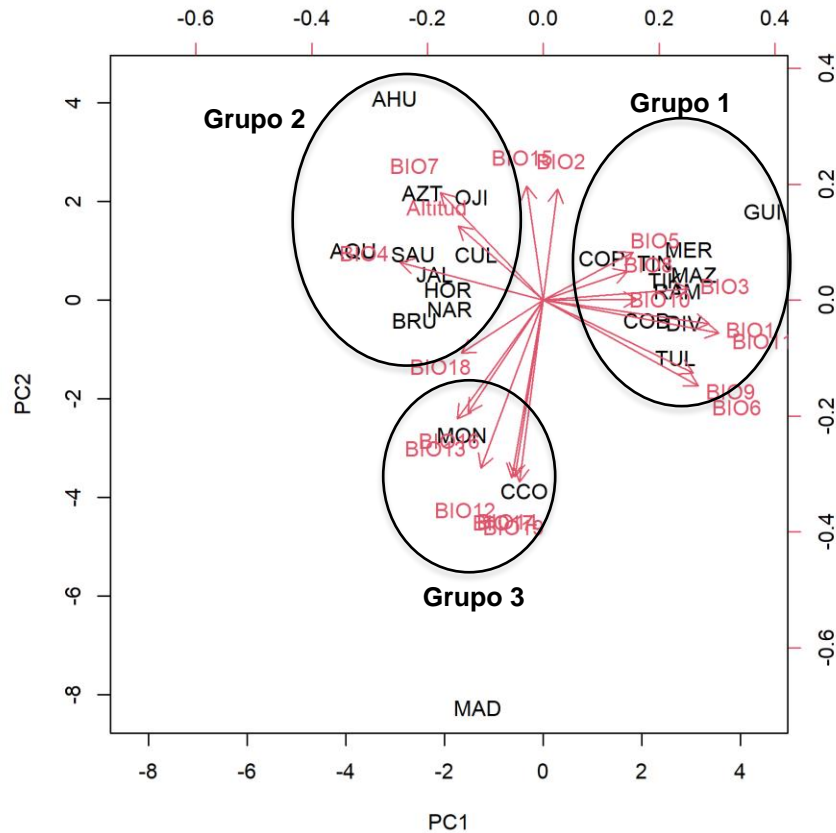


Figura 3.7. Gráfica del análisis de componentes principales.

3.4.5 Análisis filogenético

De acuerdo al árbol de consenso de haplotipos obtenido del análisis bayesiano, se observa que fue posible agrupar dichos haplotipos en tres haplogrupos: 1) los haplotipos H1-H12 se encontraron en la provincia biogeográfica del Golfo de México y zona sur de la provincia de la costa del Pacífico; 2) los haplotipos H13-H15 y H17-H20 en la provincia del Petén y H6, H21-H24 en la provincia Yucateca, todos localizados en la península de Yucatán; y 3) los haplotipos H28-H30 en la zona norte de la provincia del Pacífico (Figura 3.8).

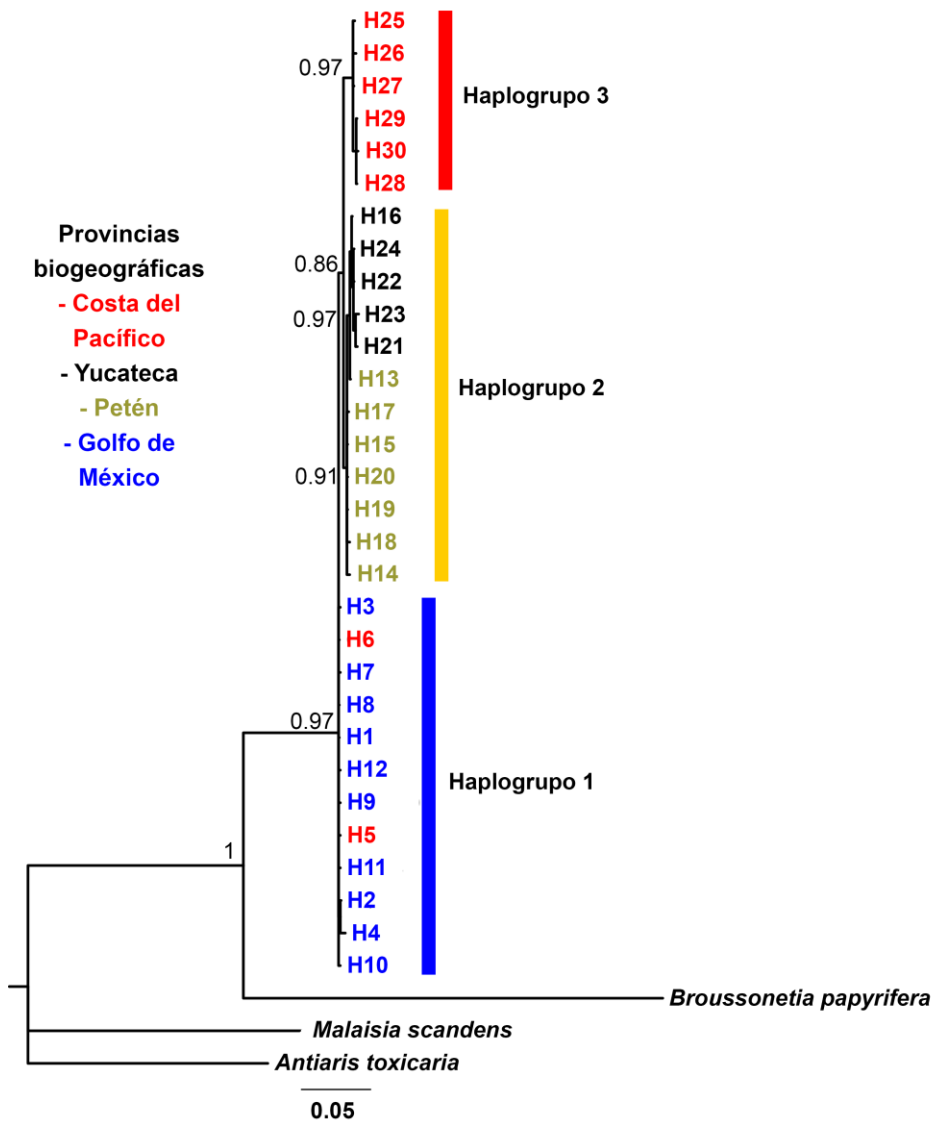


Figura 3.8. Árbol filogenético de los haplotipos obtenido mediante análisis bayesiano.

CAPÍTULO IV

2.4. DISCUSIÓN

Diversidad y estructura genética

La diversidad genética es considerada como la cantidad de variabilidad genética entre los individuos de una variedad o población de una especie. En poblaciones de plantas es generalmente aceptado que esta diversidad genética se encuentra estructurada espacial y temporalmente (Ramanatha-Rao y Hodgkin, 2002; Loveless y Hamrick, 1984).

En el presente trabajo, se identificaron 30 haplotipos, de los cuales, los haplotipos H1 y H13 fueron los más abundantes, estos están distribuidos en el Golfo de México y la península de Yucatán, respectivamente. Se encontraron altos índices de diversidad genética, siendo mayor dentro de las poblaciones, estos resultados fueron similares a lo reportado con marcadores nucleares (López-Barrera, 2019) y de cloroplasto (Lander y Monro, 2015). El alto índice de diversidad haplotípica (0.8323) y la baja diversidad nucleotídica (0.00724) indican que la diversificación ocurrió hace relativamente poco tiempo. Poelchau y Hamrick (2013), concluyeron en su trabajo que la máxima tasa de divergencia de *B. alicastrum* ocurrió en el Pleistoceno, además, discuten que posiblemente esta especie colonizó Centroamérica desde Sudamérica y, eventualmente, llegó a México. Se ha sugerido que el bosque caducifolio tropical en áreas del Peten, Guatemala y occidente de Honduras, dominada por especies del género *Brosimum*, se originó durante el Holoceno temprano, hace 10000-11000 años (Rue, 1987; Leyden, 1984; Lewin, 1984), siendo las poblaciones mexicanas mucho más jóvenes (Rico-Gray y García-Franco, 1991).

La reproducción de *B. alicastrum* es exclusivamente cruzada, las especies que se reproducen de esta manera mantienen la variación genética mediante el movimiento de genes y la recombinación genética (Bizoux *et al.*, 2009; Hamrick *et al.*, 1992; Loveless y Hamrick, 1984). Adicionalmente, debido a que esta especie es longeva, llegando a vivir más de 150 años beneficia las altas tasas de diversidad genética (Martínez-Ramos y Alvarez-Buylla, 1998), asegura la presencia de varias generaciones dentro de una población, donde diferentes alelos o genotipos son favorecidos durante su establecimiento

(López-Barrera, 2019). Los individuos que llegan a la madurez distribuyen la información genética que almacenan, contribuyendo así al mantenimiento de la misma dentro de su población, heredando aquellos alelos que permitan la supervivencia de las futuras generaciones de plantas (Finkeldey y Hattermer, 2007; Hamrick *et al.*, 1992; Hamrick *et al.*, 1979). La amplia distribución de *B. alicastrum* también contribuye a su alta variabilidad genética, generalmente las especies con distribuciones amplias presenta esta característica, contrario a las especies restringidas solo a ciertas zonas (Loveless, 1992; Hamrick y Godt, 1989; Hamrick *et al.*, 1979).

De manera general, la naturaleza sésil de las especies vegetales mantiene la diversidad genética intra poblacional alta, produciendo así adaptaciones locales (Antonovics, 1971), lo anterior ocurre en la mayoría de plantas leñosas y árboles forestales tropicales (Finkeldey y Hattermer, 2007; Loveless, 1992; Hamrick *et al.*, 1992; Hamrick y Godt, 1989; Hamrick *et al.*, 1979).

En este trabajo se encontró que las poblaciones de *B. alicastrum* en México se encuentran agrupados en tres grandes grupos genéticos bien diferenciados, un grupo conformado por las poblaciones de la península de Yucatán, otro por las poblaciones del Golfo y sur de México y otra por las de la costa del Pacífico. López-Barrera (2019), al trabajar con marcadores de microsatelites nucleares encontró, al igual que en el presente trabajo, que la estructura genética de *B. alicastrum* está determinada por tres grupos genéticos. Sin embargo, López-Barrera identificó que las poblaciones del sur del país y las de la península de Yucatán pertenecen a un grupo genético mientras que en el presente trabajo las poblaciones del sur se agruparon con las del Golfo de México. Esta diferencia posiblemente se deba a que el ADN de cloroplastos se hereda por la madre, es decir solo con las semillas, mientras que el ADN nuclear es el resultado de la combinación del material genético de ambos padres, sufriendo varios procesos tal como la recombinación. Las semillas de *B. alicastrum* son dispersadas principalmente por distintas especies de aves (*Ortalis vetula* y *Crax rubra*) y mamíferos como los murciélagos (*Artibeus jamaicensis*, *A. phaeotis*, *Stunira udoyice* y *Corolia perspicillata*), monos (*Alouata palliata*), ardillas (*Sciurus yucatanensis*) y mapaches (*Procion lotor*), y en menor medida por roedores como el ratón (*Heteromys desmarestianus*) (Berg, 1972). Por otro

lado, el polen de esta especie es movido por la acción del viento, pudiendo moverse hasta por 2000 m (Aguilar-Aguilar, 2016).

Los valores altos de F_{st} , especial entre los grupos identificados en BAPS (0.36) indican que *B. alicastrum* presenta fuerte estructura genética, similar a lo encontrado por López-Barrera (2019) ($F_{st}=0.37$). Como ya se mencionó anteriormente, la dispersión de las semillas de *B. alicastrum* es favorecida por distintas especies de animales, este mecanismo de dispersión propicia mayor diferencia genética entre las poblaciones debido a la persistencia local por la reducida migración (Nason, 2002), lo cual se vió reflejado en la alta estructura genética encontrada. Teniendo en cuenta lo anterior, es posible afirmar que tanto la dispersión por polen y por semillas contribuyen de manera muy similar a la estructura genética de *B. alicastrum*.

Los valores más altos de estructura genética ocurrieron entre las poblaciones del Golfo y sur de México y las del Pacífico ($F_{st}=0.39$) y resulta interesante que las poblaciones del Pacífico presenten una estructura genética menor con las de la península de Yucatán ($F_{st}=0.21$), mientras que un valor intermedio se encontró entre las poblaciones del Golfo y sur y las de la península de Yucatán ($F_{st}=0.32$).

La provincia del Pacífico es una franja angosta de planicie costera que se extiende desde el Río Piaxtla hasta Chiapas, siendo casi dos veces más ancha hacia el norte (60 km aproximadamente) en comparación con el sur; su vegetación es mayormente tropical donde predominan los climas semicálidos subhúmedos con lluvias en verano de 500-1500 mm al año, la vegetación típica en esta provincia son selvas caducifolias. La provincia del Golfo de México se extiende desde la cuenca del Río San Fernando hasta el Río Candelaria donde empieza la península de Yucatán. El nivel de humedad en esta provincia es elevado, 90% de ésta recibe más de 1000 mm de lluvia anual y cerca de la mitad más de 2000 mm, la vegetación predominante son las selvas altas y medianas perennifolias. Existe una gran relación entre el sur de esta provincia con la del Petén. La provincia Yucateca es relativamente seca donde predomina el clima tropical subhúmedo (95%), el 85% de la vegetación está compuesta por selvas bajas caducifolias. En la provincia del Petén predomina la vegetación compuesta por selvas altas perennifolias, las lluvias en esta provincia son mayores que en la provincia Yucateca. Las provincias Yucateca y Petén han sido consideradas como una sola provincia por la gran cantidad de

especies que comparten, sin embargo, la división en dos provincias se debe a que, como se mencionó anteriormente, la estructura de la vegetación es más seca hacia la Yucateca y más húmedas hacia el Petén (Espinosa *et al.*, 2008), en este trabajo se encontró, a nivel poblacional que, estas dos provincias comparten haplotipos.

Barreras de flujo genético

La barrera que corresponde al Altiplano Mexicano y que separa a las poblaciones del pacífico con las del golfo de México ha sido descrita anteriormente por López-Barrera (2019) para *B. alicastrum* utilizando marcadores de microsátélites nucleares, siendo al igual que en el presente estudio, la única barrera genética física.

El Istmo de Tehuantepec, región donde se localizó la segunda barrera al flujo genético es una región con elevada riqueza biológica, corresponde a la zona más estrecha entre el Golfo de México y el océano Pacífico, se encuentra en la zona de contacto de la región Neártica con la Neotropical y mucho tiempo estuvo sumergida bajo el agua (Sarukhan *et al.*, 2008).

La tercera barrera genética se ubicó cerca del límite entre las provincias del Golfo de México y la del Petén, al haber diferencias en la precipitación y el tipo de vegetación entre estas provincias la barrera identificada es de tipo biogeográfica.

Finalmente, en la península de Yucatán las poblaciones fueron separadas por dos barreras que no parecen tener una explicación física, en cambio, si se considera que el clima es más seco en la provincia Yucateca, las barreras podrían ser consideradas climáticas. Además, gran parte de las poblacion de árboles en la península ha sufrido alguna alteración por parte de las comunidades mayas, especialmente cerca de las zonas arqueológicas se ha visto que proliferan ciertas especies como *B. alicastrum*, haciendo de esta manera que las distribución de esta especie ya no sea considerada natural debido a que el hombre la ha manipulado desde tiempos prehispánicos (National Academy of Sciences 1975; Puleston, 1972); la huella huma en la península de Yucatán se ha estimado en más de 5000 años atrás (Toledo *et al.*, 2008).

La teoría de los refugios indica que, durante las glaciaciones, las zonas húmedas más elevadas fungieron como hábitats de las especies tropicales (Haffer, 1969). De acuerdo a esta teoría las zonas tropicales de América fueron áridas o semiáridas en intervalos durante la máxima glaciación del hemisferio norte, por lo que, los taxa tropicales fueron confinados a refugios en áreas elevadas más húmedas donde existían las condiciones para su crecimiento (Wendt, 1987; Toledo, 1982).

En el neotrópico se ha sugerido que, debido a los diferentes eventos de glaciación y deglaciación, el clima era inestable y como consecuencia las especies en estas zonas tuvieron que dispersarse en los refugios. En México se ha propuesto la existencia de ocho refugios para las especies vegetales durante los cambios climáticos durante el Pleistoceno (Toledo, 1982). En Centroamérica se ha sugerido que la máxima tasa de divergencia de *B. alicastrum* ocurrió durante el Pleistoceno (Poelchau y Hamrick, 2013). En este trabajo no se encontró relación entre las barreras identificadas entre las poblaciones de *B. alicastrum* en México con la ubicación refugios propuestos por Toledo (1982), lo cual tiene sentido ya que se ha propuesto que esta especie colonizó México en tiempos mas recientes durante el Holoceno (Rico y García, 1991)

Conservación de *Brosimum alicastrum*

La importancia de la biodiversidad para la humanidad ha sido reconocida en décadas recientes, esta diversidad es esencial para el desarrollo sustentable de varias actividades humanas, incluyendo maneras en las que la población más vulnerable pueda cubrir sus necesidades nutricionales, manteniendo también la diversidad cultural (Shiva, 1994), afortunadamente, desde hace unas décadas, se ha visto un incremento en el interés del manejo y preservación de la diversidad genética en los bosques tropicales (Gentry, 1992).

Brosimum alicastrum es un árbol que ha sido utilizado para distintos fines desde la época de los Mayas, en el bosque tropical seco se encuentra en hábitats rivereños, áreas clave para la conservación de dicho bosque, ofreciendo diversos beneficios también para muchas especies animales, especialmente durante la época de sequías (Aguilar-Aguilar,

2016; Sánchez-Azofeifa *et al.*, 2009). Preservar su diversidad genética es vital para su supervivencia a largo plazo.

Con el fin de mantener la diversidad genética de cada una de los grupos genéticos de *B. alicastrum* que se encontraron en el presente trabajo, lo ideal es dispersar las semillas dentro de las mismas zonas que abarca cada grupo genético, tal y como lo recomiendan Lander y Monro (2015) en su estudio filogeográfico sobre *B. alicastrum*. Es necesario tener en cuenta lo anterior cuando se requiera establecer plantaciones comerciales de esta especie que ha sido propuesta como una alternativa al consumo de granos, incorporando así al sector forestal en la cruzada contra el hambre. También, se ha propuesto que para mantener la mayor diversidad posible y así contar con un pool genético más extenso de la especie, especialmente para conservación *ex situ* o bancos de germoplasma, es recomendable la colecta de semillas abarcando la mayor cantidad de poblaciones posible (Lander y Monro, 2015; Ledig y Kitzmiller, 1992), incluyendo especialmente las zonas con alta variabilidad genética y con haplotipos menos comunes.

CAPÍTULO V

5.1 CONCLUSIONES

- El Ramón (*B. alicastrum*) en México presenta estructura filogeográfica alta delimitada por tres grupos genéticos bien diferenciados con base en una red de haplotipos, BAPS, topología Neighbor-Joining y análisis bayesiano.
- El valor de *Fst* determinado en el presente trabajo (0.36) es similar al encontrado en un estudio previo realizado con microsatélites (0.37), por lo tanto, la dispersión de semillas y polen contribuyen de manera similar a la estructura genética de *B. alicastrum*.
- Se encontró una alta diversidad genética con la presencia de 30 haplotipos únicos, encontrándose además que la mayor parte de la variación genética se encuentra dentro de las poblaciones.
- *Brosimum alicastrum* se distribuye en cuatro provincias biogeográficas, las cuales son el golfo de México, Yucateca, Petén y costa del Pacífico, cuyas diferencias climáticas y geográficas contribuyen a la estructura filogeográfica encontrada en el presente trabajo.
- Las variables bioclimáticas influyeron en la distribución de las poblaciones de *B. alicastrum*.
- Los haplotipos poco comunes en las poblaciones de la península de Yucatán y del norte del Pacífico, así como el haplotipo más común del Golfo de México, deben ser considerados en futuros programas de reforestación y conservación con el fin de mantener la mayor diversidad genética de *B. alicastrum*.

5.2 PERSPECTIVAS

- Incluir regiones del genoma nuclear (ITS) en futuros estudios filogeográficos de *B. alicastrum* en México.
- Describir la morfología de diferentes poblaciones de *B. alicastrum* en México.
- Realizar un estudio filogeográfico incluyendo las poblaciones de este estudio así como poblaciones de Centro y Sudamérica.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Aguilar, M.J. (2016). Genética de la conservación del árbol tropical dioico *Brosimum alicastrum* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. Morelia, Michoacán, México.
- Antonovics, J. (1971). The effect of a heterogeneous environment on the genetics of natural populations: the realization that environments differ has had a profound effect on our views and role of genetic variability in populations. *American Scientist*, 59, 593-599.
- Avise, J.C. (2000). Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Avise, J.C. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36, 3–15.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C. (1987). Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 489-522.
- Ayala, A., y Sandoval, S. M. (1995). Establecimiento y producción temprana de forraje de ramón (*Brosimum alicastrum* Swartz) en plantaciones a altas densidades en el norte de Yucatán, México. *Agroforestería en las Américas*, 7, 10-16.
- Beheregaray L.B. (2008). Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology*, 17, 3754–3774.
- Berg, C. (1972). Olmedieae Brosimeae (Moraceae). *Flora Neotropica*, 7, 1-228.
- Berg, C.C (2001). Moreae, Artocarpeae, and Dorstenia (Moraceae), with Introductions to the Family and Ficus and with Additions and Corrections to Flora Neotropica Monograph 7. *Flora Neotropica*, 83, 1-346.
- Bivand RS, Pebesma E, Gomez-Rubio V (2013). Applied spatial data analysis with R, Second edition. Springer, NY.
- Bizoux, J.P., Daïnou, K., Bourland, N., Hardy, O.J., Heuertz, M., Mahy, G., Doucet, J.L. (2009). Spatial genetic structure in *Milicia excelsa* (Moraceae) indicates extensive gene dispersal in a low-density wind-pollinated tropical tree. *Molecular Ecology*, 18 (21), 4398-4408.

- Cardoso, S.R.S., Eloy, N.B., Cardoso, M.A., Ferreira, P.C.G. (2000). Genetic differentiation of *Euterpe edulis* Mart. populations estimated by AFLP analysis. *Molecular Ecology*, 9, 1753-1760.
- Cardoso, S.R.S., Provan, J., Lira, C.D.F. Ramos-Pereira, L.O., Gomes-Ferreira, P.C., Aires-Cardoso, M. (2005). High levels of genetic structuring as a result of population fragmentation in the tropical tree species *Caesalpinia echinata* Lam. *Biodiversity & Conservation*, 14, 1047-1057.
- Caron, H., Dumas, S., Marque, G. Messier, C., Bandou, E., Petit, R.J., Kremer, A. (2000). Spatial and temporal distribution of chloroplast DNA polymorphism in a tropical tree species. *Molecular Ecology*, 9, 1089-1098.
- Carvajal, S. (2017). Moraceae. En: J. Rzedowski & G. Calderón de Rzedowski (eds.). Flora del Bajío y de regiones adyacentes 147: 1-59.
- Clement, M., Snell, Q., Walker, P., Posada, D., & Crandall, K. (2002). TCS: Estimating gene genealogies. *Parallel and Distributed Processing Symposium, International Proceedings*, 2, 184.
- CONABIO. (1997). Provincias biogeográficas de México. Escala 1:4,000,000. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
- CONABIO. (2006). Capital natural y bienestar social. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
- Corander, J., Marttinen, P., Sirén, J., Tang, J. (2008). Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinformatics*, 9, 539.
- Corner, E.J.H. (1967). *Ficus* in the Solomon Islands and its bearing on the Post-Jurassic history of Melanesia. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 253 (783), 23-159.
- Daniell, H., Lin, C.S., Yu, M., Chang, W.C. (2016). Chloroplast genomes: diversity, evolution and applications in genetic engineering. *Genome Biology*, 17, 134.
- Datwyler, S. L., Weiblen, G. D. (2004). On the origin of the fig: phylogenetic relationships of Moraceae from ndhF sequences. *American Journal of Botany*, 91 (5), 767-777.
- Degen, B., Caron, H., Bandou, E., Maggia, L., Chevallier, M.H., Leveau, A., Kremer, A. (2001). Fine-scale spatial genetic structure of eight tropical tree species as analysed by RAPDs. *Heredity*, 87, 497-507.

- Degen, B., Sebben, A.M. (2014). Genetics and tropical forests. In: Pancel L, Köhl M (eds) Tropical forestry handbook. Springer, Berlin, pp 885–920.
- Dick, C.W. (2010). Phylogeography and population structure of tropical trees. *Tropical Plant Biology*, 3, 1-3.
- DOF. (2013). Decreto por el que se establece el Sistema Nacional para la Cruzada contra el Hambre [Online]. Disponible en http://www.sedesol.gob.mx/work/models/SEDESOL/Cruzada/1_DECRETO_POR_EL_QUE_SE_ESTABLECE_EL_SISTEMA_NACIONAL_PARA_LA_CRUZADA_CONTRA_EL_HAMBRE.pdf [Acceso 22 septiembre 2020].
- Domínguez–Domínguez, O. y Vázquez–Domínguez, E. (2009). Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32 (1), 59-70.
- Doyle, J.J., y Doyle. J.L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for samal quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.
- Dupéron-Laudoueneix, M., 1980, Présence d'un bois fossile de Moraceae dans l'Éocène de la Charente. *105e Congrès national des Sociétés Savantes, Caen, Sciences, I*, 117–129.
- Dutech, C., Seiter, J., Petronelli, P. Joly, H.I., Jarne, P. (2002). Evidence of low gene flow in a Neotropical clustered tree species in two rainforest stands of French Guiana. *Molecular Ecology*, 11, 725–738.
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 5, 113.
- Espinosa, D., Ocegueda, S., Aguilar, C., Flores, O., Llorente, J. (2008). El conocimiento biogeográfico de las especies y su regionalización natural. En: CONABIO. Capital Natural de México, Volumen I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Comisión Nacional el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.
- Excoffier, L. and H.E. L. Lischer (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564-567.
- Faleiro, F.G., Araujo, I.S., Bahia, R., Santos, R.F., Yamada, M.M., Anher, D. (2002). Otimização da extração e amplificação de DNA de *Theobroma cacao* L. visando obtenção de marcadores RAPD. *Agrotrópica*, 14 (2), 31-34.

- Figueroa-Esquivel, E.M., Puebla-Olivares, F., Eguiarte, L.E., Núñez-Farfam, J. (2010). Genetic structure of a bird-dispersed tropical tree (*Dendropanax arboreus*) in a fragmented landscape in Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 81, 789-800.
- Finkeldey, R. y Hattemer, H.H. (2007). *Tropical Forest Genetica*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Foro Consultivo Científico y Tecnológico, AC. (2015). El sector forestal en apoyo a la cruzada contra el hambre y el cambio climático [Online]. Disponible en <http://www.foroconsultivo.org/mx/FCCyT/eventos/el-sector-forestal-en-apoyo-la-cruzada-contra-el-hambre-y-el-cambio-clim%C3%A1tico> [Acceso 21 noviembre 2019]
- Francisco, J.C., Cohan, F.M., and Krizanc, D. (2012). Demarcation of bacterial ecotypes from DNA sequence data: A comparative analysis of four algorithms. IEEE 2nd International Conference on Computational Advances in Bio and medical Sciences (ICCABS), Las Vegas, NV, 2012, pp. 1-6
- García, E. (2004). *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen*, 5a. ed., Instituto de Geografía, UNAM, México.
- Gentry, A.H. (1998). Changes in plant community diversity and floristic composition on environmental and geographical gradients. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 75, 1-34.
- Gentry, A.H. (1992). Tropical Forest biodiversity: distributional patterns and their conservational significance. *Oikos*, 63, 19-28.
- Godt, M.W.J. y Hamrick, J.L (1993). Genetic diversity and population structure in *Tradescantia hirsuticaulis* (Commelinaceae). *American Journal of Botany*, 80, 959-966.
- Gómez-Pompa, A., Vázquez-Yanes, C., Guevara S. (1972). The tropical rain forest: a non-renewable resource. *Science* 177:762-765.
- Haider, N. (2001). Chloroplast-specific universal primers and their uses in plant studies. *Biologia Plantarum*, 55 (2), 225-236.
- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W., Sherman-Broyles, S.L. (1992). Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forest*, 6, 95-124.

- Hamrick, J.L., Linhart, Y.B., y Mitton, J.B. (1979). Relationship between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 10, 173-200.
- Hernández-González, O., Vergara-Yoisura, S. y Larqué-Saavedra, A. (2015). Primeras etapas de crecimiento de *Brosimum alicastrum* Sw. en Yucatán. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 6 (27), 38-48.
- Hernández-González, O., Vergara-Yoisura, S., Larqué-Saavedra, A. (2014) Studies on the productivity of *Brosimum alicastrum* a tropical tree used for animal feed in the Yucatan Peninsula. *Bothalia*, 44 (6), 70-81.
- Hernández-González, O., Vergara-Yoisura, S., Sulub-Tun, R., Castillo-Chuc, J., Larqué-Saavedra, A. (2019). Gas exchange and fluorescence of *Brosimum alicastrum*. *Terra Latinoamericana*, 37, 459-467.
- Hijmans RJ, van Etten J (2012). raster: Geographic analysis and modeling with raster data. R package version 2.0-12. <http://CRAN.R-project.org/package=raster>
- Koleff, P., Soberón, J., et al. (2008). Patrones de diversidad espacial en grupos selectos de especies. En: CONABIO. Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México, pp. 323-364.
- Kress, W. J., Erickson, D. L., Jones, F. A., Swenson, N.G., Perez, R., Sanjur, O., Bermingham, E. (2009). Plant DNA barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *PNAS*, 106 (44), 18621-18626.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution* , 33 (7), 1870-1874.
- Lander, T., y Monro, A. (2015). Conservation of *Brosimum alicastrum*, an underutilized crop and keystone forest tree species; a potential win-win for conservation and development in Latin America. *Biodiversity and Conservation*, 24 (8), 1917-1930.
- Lanteri, A. y Confalonieri, V. (2003). Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. En: Morrone J.J. y Llorente, J. (Eds.) Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía. CONABIO, México. pp. 185-194.
- Larqué-Saavedra, A. (2011). Propuesta de un sistema forestal productor de semillas para reducir la importación de granos. La crónica de Hoy. México, D.F.
- Larqué-Saavedra, A. (2013). El árbol Ramón, opción viable de alimentación; complementaria al maíz. La Jornada. México, D.F.

- Larqué-Saavedra, A. (2014a). El sector forestal en apoyo a la cruzada contra el hambre. "El uso de la biodiversidad". Gaceta SIIDETEX No. 49.
- Larqué-Saavedra, A. (2014b). Sistema silvoforestal productor de semilla para reducir la importación de granos. Informe técnico final [Online]. Disponible en: <http://asam.centrogeo.org.mx/index.php/resultado-3?showall=1&limitstart=> [Acceso 31 diciembre 2018]
- Ledig, F.T. y Kitzmiller, J.T. (1992). Ramon and maya ruins: an ecological, not an economic, relation. *Science* 216: 298-299
- Lewin, R. (1984). Fragil forests implied by pleistocene pollen. *Science* 226:36-37.
- Leyden, B.W. (1984). Guatemalan forest systhesis after pleistocene aridity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 81: 4856-4859.
- López-Barrera, G. (2019). Diversidad y estructura genética de *Brosimum alicastrum* Sw. (Moraceae) en México (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. Morelia, Michoacán, México.
- Loveless, M.D. (1992). Isosyme variation in tropical trees: patterns of genetic organization. *New Forest* 6: 67-94.
- Loveless, M.D. y Hamrick, J.L. (1984). Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Sistematics* 15: 65-96.
- Manni, F., Guerard, E., and Heyer, E. (2004). Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: How barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Hum. Biol.* 76:173-190.
- Martínez-Ramos, M. y Álvarez-Buylla, E. (1995). Ecología de poblaciones de plantas en una selva húmeda de México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 56: 121-153.
- Meiners, M., Sánchez, C., Blois, S. (2009). El ramón: fruto de nuestra cultura y raíz para la conservación. *CONABIO. Biodiversitas* 87: 7-10.
- Monroy-Vilchis, O. (2003). Principios generales de biología de la conservación. En Sánchez, O., Vega, E., Peters, E., Monroy-Vilchis, O. (Eds.) *Conservación de ecosistemas templados de montaña en México*. Instituto Nacional de Ecología. México. pp. 107-116.
- Morrone, J.J. (2005). Hacia una síntesis biogeográfica de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 76 (2): 207-252.

- Morrone, J.J., D. Espinosa-Organista y J. Llorente-Bousquets. (2002). Mexican biogeographic provinces: Preliminary scheme, general characterizations, and synonymies. *Acta Zoológica Mexicana* 85: 83-108.
- Müller, K. (2005). SeqState - primer design and sequence statistics for phylogenetic DNA data sets. *Applied Bioinformatics* 4:65-69
- Myers, N. (1996). Environmental services of biodiversity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 2764-2769.
- National Academy of Sciences. (1975). Under-exploited tropical plants with promising economical value. Washington, D.C. pp. 114-118.
- Niembro, A., Vázquez, M., y Sánchez, O. (2010). Árboles de Veracruz. 100 especies para la reforestación estratégica. Secretaría de Educación del Estado de Veracruz, Comisión del Estado de Veracruz de Ignacio de la Llave para la conmemoración de la Independencia Nacional y la Revolución, Centro de Investigaciones Tropicales. Xalapa, Veracruz, México.
- Novick, R.R., Dick, C.W., Lemes, M.R., Navarro, C., Caccone, A., Bermingham, E. (2003). Genetic structure of Mesoamerican populations of Big-leaf mahogany (*Swietenia macrophylla*) inferred from microsatellite analysis. *Molecular Ecology* 12: 2885-2893.
- Ohyama, M., Fukuzawa, H., Kohchi, T., Shirai, H., Sano, T., Sano, S., Umesono, K., Shiki, Y., Takeuchi, M., Chang, Z., Aota, S., Inokuchi, H., Ozeki, H. (1986). Chloroplast gene organization deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. *Nature* 322: 572-574.
- Olguin-Maciel, E., Larqué-Saavedra, A., Pérez-Brito, D., Barahona-Pérez, L.F., Alzate-Gaviria, L., Toledano-Thompson, T., Lappe-Oliveras, P.E., Huchin-Poot, E.G., Tapia-Tussell, R. (2007). *Brosimum Alicastrum* as a Novel Starch Source for Bioethanol Production. *Energies* 2017, 10, 1574.
- ONU. (1992). Convenio sobre la diversidad biológica. Rio de Janeiro, Brasil.
- Ortega, F., Sedlock, R.L., Speed, R.C. (2000). Evolución tectónica de México durante el Fanerozoico, en J. Llorente, E. González y N. Papavero (eds.), Biodiversidad, taxonomía y biogeografía de artrópodos de México, vol. II. UNAM-CONABIO, México, pp. 3-59.

- Palmer, J.D. (1992). Comparison of Chloroplast and Mitochondrial Genome Evolution in Plants. In: Herrmann R.G. (ed) Cell Organelles. Plant Gene Research (Basic Knowledge and Application). Springer, Vienna. pp. 99-133.
- Papadopoulou, A., Chesters, D., Coronado, I., De la Cadena, G., Cardoso, A., Reyes, J.C., Maes, J.M., Rueda, R.M., Gómez-Zurita, J. (2015). Automated DNA-based plant identification for large-scale biodiversity assessment. *Molecular Ecology Resources*, 15, 136–152.
- Pardo-Tejeda, E., Sánchez, M.C., (1980). *Brosimum alicastrum* (ramón, capomo, ojite, ojoche). Recurso silvestre desaprovechado. Xalapa, Ver., Méx., Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos. 31 pp.
- Payn, K.G., Dvorak, W.S., Janse, B.J.H., Myburg, A.A. (2008). Microsatellite diversity and genetic structure of the commercially important tropical tree species *Eucalyptus urophylla*, endemic to seven islands in eastern Indonesia. *Tree Genetics & Genomes* (2008) 4:519–530.
- Pebesma E (2018). “Simple Features for R: Standardized Support for Spatial Vector Data.” *The R Journal*, 10(1), 439–446. doi: 10.32614/RJ-2018-009.
- Pebesma EJ, Bivand RS (2005). “Classes and methods for spatial data in R.” *R News*, 5(2), 9–13. <https://CRAN.R-project.org/doc/Rnews/>
- Pennington, T., Sarukhán, J. (2005). *Brosimum alicastrum*. Distribución potencial, escala 1:4000000., CONABIO, 2005. Consultado el 16 de diciembre del 2018 de: http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/layouts/dis_b_alicgw.
- Peters C.M. y Pardo-Tejeda, E. (1982). *Brosimum alicastrum* (Moraceae): uses and potential in Mexico. *Economic Botany*. 36(2):166-175.
- Pimm, S., Russell, G.J., Gittleman, J., y Brooks T.M. (1995). The future of biodiversity. *Science* 269:347–350.
- Poelchau, M.F., Hamrick, J.L. (2012). Differential effects of landscape-level environmental features of genetic structure in three codistributed tree species in Central America. *Molecular Ecology* 21: 4970-4982.
- Poelchau, M.F., Hamrick, J.L. (2013). Comparative phylogeography of three common Neotropical tree species. *Journal of Biogeography* 40(4): 618-631.
- Puleston, D.E. (1972). *Brosimum alicastrum*, as a subsistence alternative for the classic Maya of the Central Southern lowlands. Masters of Arts Thesis. University of Pennsylvania. 141 p.

- QGIS Development Team (2020). QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org>
- Ramanatha-Rao, V., Hodgkin, T. (2002). Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 1-19.
- Rambaut, A. (2010). FigTree v1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh.
- Reading, A.J., Thompson, R.D., Millington, A.C. (1995). Humid tropical environments. Cambridge, United Kingdom.
- Rico-Gray, V. y García-Franco, J.G. (1991). The Maya and the vegetation of the Yucatan peninsula. *Journal of Ethnobiology* 11(1):135-142.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*, 61(3), 539–542.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, a., Sánchez-DelBarrio, J.C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramons-Onsins, S.E., Sánchez-Gracia, A. (2017). DNASP v6: DNA sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 34: 3229-3302.
- RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA. <https://rstudio.com/>
- Rue, D.J. (1987). Early agriculture and early postclassic maya occupation in western Honduras. *Nature* 326:285-286.
- Sánchez-Azofeifa, G.A., Quesada, M., Cuevas-Reyes, P., Castillo, A., Sánchez-Montoya, G. (2009). Land cover and conservation in the área of influence on the Chamela-Cuixmala Biosphere Reserve, México. *Forest Ecology and Managment* 258(6): 907-912.
- Sarukhán, J., Carabias, J., Koleff, P., Urquiza-Haas, T. (2012). Capital natural de México: Acciones estratégicas para su valoración, preservación y recuperación. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México.
- Sarukhán, J., Koleff, P., Carabias, J., Soberón, J., Dirzo, R., Llorente-Busquetes, J., Halfter, G., González, R., March, I., Mohar, A., Anta, S., de la Maza, J. (2009). Capital natural de México. Síntesis: conocimiento actual, evaluación y perspectivas de sustentabilidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México.

- Semarnat. (2013). Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales. Indicadores Clave y de Desempeño Ambiental. Edición 2012. México.
- Senapati, S.K., Das, G.K., Aparajita, S. & Rout, G.R. (2012) Assessment of genetic variability in the Asoka Tree of India. *Biodiversity*, 13 (1), 16-23.
- Shaw, J., Lickey, E.B., Schilling, E.E., Small, R.L. (2007). Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*, 94, 275-288.
- Shilton, L.A., Altringham, J.D., Compton, S.G., Whittaker, R.J. (1999). Old World fruit bats can be long-distance seed dispersers through extended retention of viable seeds in the gut. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 266, 219–223.
- Shiva, V. (1994). Agriculture and food production. UNESCO/Environmental Education Dossiers No. 9 (May): 2–3
- Stevens, P. F. (2001). Angiosperm Phylogeny Website. [Online] (Version 14, July 2017) Disponible en <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. [Acceso 16 diciembre 2018]
- Sytsma, K. J., Morawetz, J., Pires, C., Nepokroeff, M., Conti, M., Zjhra, M., Hall, J.C., Chase M.W. (2002). Urticalean rosids: Circumscription, rosid ancestry, and phylogenetics based on rbcL, trnL-F, and ndhF sequences. *American Journal of Botany*, 89 (9), 1531-1546.
- Toledo, V.M. (1982). Pleistocene changes of vegetation in tropical Mexico. In: Prance, G.T. (Ed), Biological diversification in the tropics: Proceedings of the 5th International Symposium of the Association for Tropical Biology. Caracas, Columbia University Press, New York, pp. 93-111.
- Toledo, V.M., Barrera-Bassols, N., García-Frapolli, E., Alarcón-Chaires, P. (2008). Uso múltiple y biodiversidad entre los mayas yucatecos (México). *Interciencia*, 35 (5), 345-352.
- Vidal-Zepeda, R. 2005. Las regiones climáticas de México. Instituto de Geografía, UNAM, México.
- Vranckx, G. Jacquemyn, H., Muys, B., Honnay, O. (2012). Meta-analysis of susceptibility of woody plants to loss of genetic diversity through habitat fragmentation. *Conservation Biology*, 26 (2), 228-237.

- Wang, R., Compton, S.G., Chen, X.Y. (2011). Fragmentation can increase spatial genetic structure without decreasing pollen-mediated gene flow in a wind-pollinated tree. *Molecular Ecology*, 20, 4421-4432.
- Xu, J.H., Liu, Q., Hu, W., Wang, T., Xue, Q., Messing, J. (2015). Dynamics of chloroplast genomes in green plants. *Genomics*, 106, 221–231.
- Zerega, N. J. C., Clement, W. L., Datwyler, S. L., y Weiblen, G. D. (2005). Biogeography and divergence times in the mulberry family (Moraceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37 (2), 402-416.
- Zink, R.M. (2002). Methods in Comparative Phylogeography, and Their Application to Studying Evolution in the North American Aridlands. *Integrative and Comparative Biology*, 42, 953–959.

ANEXOS

Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN con CTAB [Doyle y Doyle (1987) y modificado por Faleiro *et al.* (2002)]

1. Macerar material vegetal (0.1 g) y recuperar en un tubo de 2 mL
2. Añadir 800 µL de buffer de extracción precalentado a 65°C
3. Incubar 1 h a 65°C (mezclar cada 10 min)
4. Añadir 700 µL de cloroformo y agitar por inversión durante 10 min
5. Centrifugar a 13,000 rpm durante 10 min
6. Transferir sobrenadante a un tubo de 2 mL
7. Añadir 55 µL de CTAB al 7% y agitar durante 5 min
8. Añadir 700 µL de cloroformo y agitar durante 10 min
9. Centrifugar a 13,000 rpm durante 10 min
10. Transferir sobrenadante en un tubo de 1.5 mL
11. Añadir 700 µL de isopropanol frío e incubar a -20°C durante 30 min
12. Centrifugar a 13,000 rpm durante 10 min y eliminar sobrenadante con cuidado
13. Añadir 600 µL de etanol a 90%
14. Centrifugar a 13,000 rpm durante 5 min y eliminar sobrenadante con cuidado
15. Secar pastilla
16. Resuspender pastilla en 100 µL de H₂O ultrapura

Limpieza

1. Añadir 10% de NaCl 5M del volumen inicial más 2/3 partes de isopropanol frío
2. Incubar a -20°C durante 3 h
3. Centrifugar a 13,000 rpm durante 10 min y eliminar sobrenadante con cuidado
4. Añadir 600 µL de etanol a 90%
5. Centrifugar a 13,000 rpm durante 5 min y eliminar sobrenadante con cuidado
6. Secar pastilla
7. Resuspender pastilla en 100 µL de H₂O ultrapura

Anexo 2. Comparación en parejas de los valores de F_{st} (triángulo inferior) en las poblaciones de estudio. Los valores de p se muestran el triángulo superior. * Valores estadísticamente significativos.

	AQU	AZT	BRU	GUI	HOR	JAL	MAD	MAZ	MON
AQU	-	0.99±0.003	0.99±0.003	0.99±0.003	0.99±0.003	0.99±0.003	0.99±0.003	0.99±0.003	0.99±0.003
AZT	-0.200	-	0.99±0.003	0.99±0.003	0.99±0.003	0.99±0.003	0.99±0.003	0.99±0.003	0.99±0.003
BRU	-0.104	-0.104	-	0.46±0.05	0.99±0.003	0.99±0.003	0.99±0.003	0.99±0.003	0.99±0.003
GUI	-0.071	-0.071	0.118	-	0.99±0.003	0.99±0.003	0.99±0.003	0.99±0.003	0.50±0.037
HOR	-0.200	-0.500	-0.104	-0.071	-	0.99±0.003	0.99±0.003	0.99±0.003	0.99±0.003
JAL	-0.200	-0.200	-0.104	-0.071	-0.200	-	0.99±0.003	0.99±0.003	0.99±0.003
MAD	0.333	0.333	0.600	0.000	0.333	0.333	-	0.99±0.003	0.47±0.040
MAZ	-1.000	-1.000	-1.000	-0.500	-1.000	-1.000	1.000	-	0.99±0.003
MON	-0.143	-0.143	-0.058	-0.034	-0.143	-0.143	0.300	-0.750	-
NAR	0.111	0.111	-0.053	0.351	0.111	0.111	1.000	0.000	0.070
OJI	-0.153	-0.153	-0.119	-0.091	-0.153	-0.153	0.500	-1.000	-0.100
SAU	-0.200	-0.200	-0.104	-0.071	-0.200	-0.200	0.333	-1.000	-0.143
CCO	-0.200	-0.200	-0.104	-0.071	-0.200	-0.200	0.333	-1.000	-0.143
COB	0.816	0.816	0.835	0.708	0.816	0.816	1.000	1.000	0.706
DIV	0.208	0.208	0.440	0.000	0.208	0.208	0.000	0.000	0.212
MER	0.554	0.554	0.636	0.431	0.554	0.554	0.667	0.667	0.497
RAM	0.333	0.333	0.600	0.000	0.333	0.333	1.000	1.000	0.300
TIK	0.148	0.148	0.326	0.000	0.148	0.148	0.000	0.000	0.161
TIN	0.242	0.242	0.372	0.119	0.242	0.242	0.190	0.190	0.240
TUL	0.816	0.816	0.835	0.708	0.816	0.816	1.000	1.000	0.706
AHU	0.333	0.333	0.600	0.000	0.333	0.333	1.000	1.000	0.300
COP	0.208	0.208	0.440	0.000	0.208	0.208	0.000	0.000	0.212
CUL	0.240	0.240	0.403	0.092	0.240	0.240	0.167	0.167	0.239

Anexo 2. Continuación

	NAR	OJI	SAU	CCO	COB	DIV	MER	RAM
AQU	0.50±0.0 47	0.99±0.0 03	0.99±0.0 03	0.99±0.0 03	0.01±0.0 09*	0.35±0.0 34	0.01±0.0 09*	0.99±0.0 03
AZT	0.46±0.0 34	0.99±0.0 03	0.99±0.0 03	0.99±0.0 03	0.01±0.0 09*	0.53±0.0 50	0.037±0. 020*	0.99±0.0 03
BRU	0.99±0.0 03	0.99±0.0 03	0.99±0.0 03	0.99±0.0 03	0*	0.07±0.0 18	0.01±0.0 09*	0.99±0.0 03
GUI	0.17±0.0 37	0.67±0.0 51	0.99±0.0 03	0.99±0.0 03	0*	0.99±0.0 03	0.05±0.0 20	0.99±0.0 03
HOR	0.57±0.0 28	0.99±0.0 03	0.99±0.0 03	0.99±0.0 03	0.03±0.0 14*	0.34±0.0 50	0.02±0.0 12*	0.99±0.0 03
JAL	0.33±0.0 59	0.99±0.0 03	0.99±0.0 03	0.99±0.0 03	0.03±0.0 19*	0.37±0.0 34	0.01±0.0 09*	0.99±0.0 03
MAD	0.23±0.0 28	0.36±0.0 27	0.50±0.0 39	0.46±0.0 57	0.16±0.0 35	0.99±0.0 03	0.23±0.0 57	0.99±0.0 03
MAZ	0.99±0.0 03	0.99±0.0 03	0.99±0.0 03	0.99±0.0 03	0.10±0.0 29	0.99±0.0 03	0.25±0.0 54	0.99±0.0 03
MON	0.47±0.0 50	0.99±0.0 03	0.99±0.0 03	0.99±0.0 03	0*	0.27±0.0 38	0.01±0.0 09*	0.99±0.0 03
NAR	-	0.99±0.0 03	0.44±0.0 58	0.51±0.0 47	0.01±0.0 09*	0.11±0.0 23	0*	0.99±0.0 03
OJI	0.000	-	0.99±0.0 03	0.99±0.0 03	0.01±0.0 09*	0.14±0.0 24	0.02±0.0 18*	0.99±0.0 03
SAU	0.111	-0.153	-	0.99±0.0 03	0*	0.53±0.0 48	0.01±0.0 09*	0.99±0.0 03
CCO	0.111	-0.153	-0.200	-	0.01±0.0 09*	0.46±0.0 53	0.02±0.0 12*	0.99±0.0 03
COB	1.000	0.824	0.816	0.816	-	0.11±0.0 30	0.55±0.0 29	0.99±0.0 03
DIV	0.724	0.344	0.208	0.208	0.831	-	0.16±0.0 35	0.99±0.0 03
MER	0.797	0.599	0.554	0.554	0.028	0.510	-	0.99±0.0 03
RAM	1.000	0.500	0.333	0.333	1.000	-1.000	0.667	-
TIK	0.500	0.250	0.148	0.148	0.627	0.000	0.385	0.000
TIN	0.503	0.316	0.242	0.242	0.595	0.138	0.416	0.190
TUL	1.000	0.824	0.816	0.816	0.000	0.831	0.028	1.000
AHU	1.000	0.500	0.333	0.333	1.000	0.000	0.667	1.000
COP	0.724	0.344	0.208	0.208	0.831	0.000	0.510	0.000
CUL	0.583	0.333	0.240	0.240	0.695	0.111	0.458	0.167

Anexo 2. Continuación

	TIK	TIN	TUL	AHU	COP	CUL
AQU	0.12±0.027	0.04±0.020 *	0.02±0.012 *	0.99±0.003	0.48±0.039	0.13±0.028
AZT	0.19±0.030	0.08±0.025	0*	0.99±0.003	0.43±0.069	0.14±0.024
BRU	0.054±0.01 5	0*	0*	0.99±0.003	0.10±0.021	0.06±0.019
GUI	0.99±0.003	0.14±0.045	0.02±0.012 *	0.99±0.003	0.99±0.003	0.41±0.053
HOR	0.12±0.036	0.07±0.038	0.02±0.012 *	0.99±0.003	0.50±0.041	0.13±0.024
JAL	0.17±0.034	0.03±0.019 *	0.02±0.012 *	0.99±0.003	0.36±0.024	0.19±0.037
MAD	0.99±0.003	0.37±0.048	0.10±0.032	0.99±0.003	0.99±0.003	0.62±0.055
MAZ	0.99±0.003	0.42±0.033	0.15±0.031	0.99±0.003	0.99±0.003	0.57±0.051
MON	0.09±0.027	0*	0*	0.99±0.003	0.16±0.030	0.05±0.020
NAR	0.02±0.018 *	0*	0*	0.99±0.003	0.15±0.027	0*
OJI	0.16±0.040	0.03±0.014 *	0*	0.99±0.003	0.23±0.041	0.02±0.012
SAU	0.17±0.016	0.05±0.020	0*	0.99±0.003	0.41±0.041	0.14±0.043
CCO	0.12±0.033	0.07±0.026	0*	0.99±0.003	0.41±0.047	0.20±0.030
COB	0*	0*	0.99±0.003	0.99±0.003	0*	0*
DIV	0.99±0.003	0.25±0.040	0.01±0.009 *	0.99±0.003	0.99±0.003	0.55±0.048
MER	0.027±0.01 4*	0.01±0.009 *	0.44±0.048	0.99±0.003	0.17±0.034	0.02±0.012 *
RAM	0.99±0.003	0.33±0.047	0.16±0.040	0.99±0.003	0.99±0.003	0.59±0.073
TIK	-	0.07±0.018	0.01±0.009 *	0.99±0.003	0.99±0.003	0.42±0.019
TIN	0.109	-	0*	0.99±0.003	0.38±0.059	0.06±0.019
TUL	0.627	0.595	-	0.99±0.003	0.10±0.025	0.03±0.014 *
AHU	0.000	0.190	1.000	-	0.99±0.003	0.68±0.039
COP	0.000	0.138	0.831	0.000	-	0.50±0.053
CUL	0.083	0.180	0.695	0.167	0.111	-