



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA**

**TESIS**

**FILOGEOGRAFÍA DE *TALINOPSIS FRUTESCENS* A. GRAY  
(ANACAMPSEROTACEAE)**

**PRESENTA**

**Mónica Isabel Miguel Vázquez**

**PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

**TUTOR**

**Dr. Gilberto Alejandro Ocampo Acosta**

**INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORAL**

**Dra. María Elena Siqueiros Delgado**

**Dra. Rosa Cerros Tlatilpa**

**Aguascalientes, Ags., 24 de junio de 2019**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

**M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS**  
**DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS**  
**P R E S E N T E**

Por medio del presente, tengo a bien informarle que la **M. en B. MÓNICA ISABEL MIGUEL VÁZQUEZ** con ID 215964, estudiante del Doctorado en Ciencias Biológicas ha cumplido de manera satisfactoria el proceso de redacción, revisión y correcciones de su tesis titulada **FILOGEOGRAFÍA DE TALINOPSIS FRUTESCENS A. GRAY (ANACAMPSEROTACEAE)**.

Por lo anteriormente mencionado y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO** para la impresión del documento y continuar con el proceso de titulación y programación del examen de grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

**"SE LUMEN PROFERRE"**

Aguascalientes, Ags. a 27 de mayo de 2019

---

**Dr. Gilberto Alejandro Ocampo Acosta**  
**Director de tesis**

c.c.p. Archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
P R E S E N T E

Por medio del presente, tengo a bien informarle que la **M. en B. MÓNICA ISABEL MIGUEL VÁZQUEZ** con ID 215964, estudiante del Doctorado en Ciencias Biológicas ha cumplido de manera satisfactoria el proceso de redacción, revisión y correcciones de su tesis titulada **FILOGEOGRAFÍA DE TALINOPSIS FRUTESCENS A. GRAY (ANACAMPSEROTACEAE)**.

Por lo anteriormente mencionado y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO** para la impresión del documento y continuar con el proceso de titulación y programación del examen de grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

**"SE LUMEN PROFERRE"**

Aguascalientes, Ags. a 27 de mayo de 2019

**Dra. María Elena Siqueiros Delgado**  
Integrante del comité tutorial

c.c.p. Archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUÍZ GALLEGOS  
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS  
P R E S E N T E

Por medio del presente, tengo a bien informarle que la **M. en B. MÓNICA ISABEL MIGUEL VÁZQUEZ** con ID 215964, estudiante del Doctorado en Ciencias Biológicas ha cumplido de manera satisfactoria el proceso de redacción, revisión y correcciones de su tesis titulada **FILOGEOGRAFÍA DE TALINOPSIS FRUTESCENS A. GRAY (ANACAMPSEROTACEAE)**.

Por lo anteriormente mencionado y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO** para la impresión del documento y continuar con el proceso de titulación y programación del examen de grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

**"SE LUMEN PROFERRE"**

Aguascalientes, Ags. a 22 de mayo de 2019

---

**Dra. Rosa Cerros Tlatilpa**  
Integrante del comité tutorial



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES

**MONICA ISABEL MIGUEL VAZQUEZ**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Estimada alumna:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: **“FILOGEOGRAFIA DE TALINOPSIS FRUTESCENS A. GRAY (ANACAMPSEROTACEAE)”** hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

**ATENTAMENTE**

Aguascalientes, Ags., a 24 de Junio de 2019

*“Se lumen proferre”*

**EL DECANO**

**M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGOS**

c.c.p.- Archivo.



# Journal of Arid Land

International Standard Serial Number: 1674-6767

## Paper Acceptance Letter

June 24, 2019

Mónica I MIGUEL-VÁZQUEZ, Yasser S LÓPEZ- DE- OLMOS, Gilberto OCAMPO

It is my pleasure to inform you that your paper has been accepted by *Journal of Arid Land*. And it will be published on the Issue 4, Volume 12, 2020.

**Paper No.:** JAL20180325

**Title:** A look into the past, present, and future potential distribution of *Talinopsis frutescens* (Anacampserotaceae), a North American endemic lineage closely related to cacti

DOI: <https://doi.org/10.1007/s40333-019-0019-4>

Thank you very much for contribution to *Journal of Arid Land*.

Best wishes,

Editorial Department

*Journal of Arid Land*



Address: 818 South Beijing Road, Urumqi 830011, Xinjiang, China;  
E-mail: [xjjal@ms.xjb.ac.cn](mailto:xjjal@ms.xjb.ac.cn); Website: [jal.xjegi.com](http://jal.xjegi.com)

## AGRADECIMIENTOS

A Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado a través de la beca número 436041.

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes y al Doctorado en Ciencias Biológicas por las facilidades brindadas para la realización de este estudio.

A la Cactus and Succulent Society of America por el apoyo otorgado a través del CSSA Reserach Grant, con el que se financió parcialmente este proyecto.

A la Dra. María Elena Siqueiros por formar parte de mi comité tutorial y por sus contribuciones al proyecto.

Al Dr. Eduardo Ruíz Sánchez por sus valiosas aportaciones al proyecto, por su asesoramiento y apoyo desinteresado.

A la Dra. Rosa Cerros Tlatilpa por sus aportaciones al proyecto, por su apoyo, consejos, motivación y por acompañarme durante todo este proceso. Siempre es un honor trabajar y compartir con usted.

Al Dr. Gilberto Ocampo, por darme la oportunidad de trabajar contigo y por creer en mí; por compartir tus conocimientos en lo académico y en lo personal, por siempre hacer un espacio para explicarme, charlar y hasta para bromear. Gracias por alentarme siempre a mejorar. Fue un proceso muy interesante del cual aprendí muchísimo.

Al Dr. Eugenio Pérez Molphe y al Dr. Francisco Morales, por brindarme todas las facilidades para trabajar en sus respectivos laboratorios.

A los técnicos encargados de los diferentes laboratorios donde tuve la oportunidad de trabajar, por el apoyo y facilidades brindadas: Martha Pérez, Alejandra Palomeque, Adilene Dávila, Rocío Moreno, Nancy Meza, Josafath Quezada e Isaac Reyes.

A mis compañeros del herbario, del posgrado y de la vida. Emmanuel, gracias por tu amistad y por contagiarme con esa buena vibra que te caracteriza. A Julio Martínez por tu ayuda en campo, por tu amistad y por hacer mi estancia en el herbario muy amena. A Higi, por cultivar mi paciencia y robarme de vez en cuando una carcajada. A mi estimada Marce, gracias por la amistad y apoyo brindado desde el primer día; personas como tú se encuentran pocas veces en la vida, que lindo haber caminado juntas durante estos años, espero sean muchos más. A mis queridos amigos Citalli, Rocío, Arturo y Paco por su apoyo y cariño incondicional.



*A mis padres, a mi hermano y a Sergio.  
Gracias por su amor, paciencia y apoyo incondicional.*

ÍNDICE GENERAL

|                                             |    |
|---------------------------------------------|----|
| RESUMEN .....                               | 5  |
| ABSTRACT .....                              | 6  |
| INTRODUCCIÓN .....                          | 7  |
| Filogeografía .....                         | 7  |
| Teoría de coalescencia .....                | 8  |
| Genética de poblaciones .....               | 9  |
| <i>Talinopsis frutescens</i> A. Gray .....  | 11 |
| ANTECEDENTES .....                          | 14 |
| JUSTIFICACIÓN .....                         | 21 |
| OBJETIVOS .....                             | 22 |
| General .....                               | 22 |
| Particulares .....                          | 22 |
| HIPÓTESIS .....                             | 22 |
| MÉTODOS .....                               | 23 |
| Revisión de herbario y bases de datos ..... | 23 |
| Muestreo .....                              | 23 |
| Análisis moleculares .....                  | 23 |
| Análisis filogenéticos .....                | 24 |
| Diversidad genética poblacional .....       | 26 |
| Análisis de coalescencia .....              | 27 |
| Estimación de tiempos de divergencia .....  | 28 |
| Biogeografía histórica .....                | 28 |
| Modelado de nicho ecológico .....           | 29 |
| RESULTADOS .....                            | 30 |
| Revisión de herbario y bases de datos ..... | 30 |
| Muestreo .....                              | 31 |
| Análisis moleculares .....                  | 33 |
| <i>Extracción de ADN</i> .....              | 33 |

|                                                                                                                                              |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <i>Selección de marcadores moleculares y amplificación de las regiones de interés</i> .....                                                  | 35 |
| Análisis filogenéticos .....                                                                                                                 | 38 |
| Redes de haplotipos y diversidad genética poblacional .....                                                                                  | 45 |
| AMOVA .....                                                                                                                                  | 52 |
| SAMOVA .....                                                                                                                                 | 53 |
| Permut .....                                                                                                                                 | 54 |
| Análisis de coalescencia .....                                                                                                               | 55 |
| Estimación de tiempos de divergencia .....                                                                                                   | 56 |
| Biogeografía histórica .....                                                                                                                 | 57 |
| <i>S-DIVA</i> .....                                                                                                                          | 57 |
| <i>DEC (Lagrange)</i> .....                                                                                                                  | 58 |
| Modelado de nicho ecológico .....                                                                                                            | 59 |
| DISCUSIÓN .....                                                                                                                              | 63 |
| CONCLUSIÓN .....                                                                                                                             | 69 |
| LITERATURA CITADA .....                                                                                                                      | 70 |
| ANEXOS                                                                                                                                       |    |
| ANEXO A. Protocolos empleados para la extracción de ADN.                                                                                     |    |
| ANEXO B. Registros de GenBank de las secuencias usadas como grupos externos en los diferentes análisis.                                      |    |
| ANEXO C. Fuentes de datos.                                                                                                                   |    |
| ANEXO D. Otros productos del proyecto.                                                                                                       |    |
| ANEXO E. Condiciones de los programas de termociclador empleados para amplificar los marcadores probados y empleados en el presente estudio. |    |
| ANEXO F. Kits de PCR y volúmenes de reactivos empleados para amplificar las regiones de interés en este estudio.                             |    |
| Anexo G. Longitud de las matrices empleadas para cada tipo de análisis realizado en este estudio.                                            |    |
| Anexo H. Valores obtenidos para cada uno de los <i>K</i> propuestos en el análisis de SAMOVA.                                                |    |
| ANEXO I. Comparaciones pareadas entre las variables climáticas de Bioclim.                                                                   |    |

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Oligos probados en el proyecto ..... 37

Cuadro 2. Poblaciones, localidades, coordenadas, número de individuos y haplotipos empleados para la elaboración de las redes de haplotipos e índices poblacionales ..... 50

Cuadro 3. Resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) de las poblaciones de *Talinopsis frutescens* ..... 52

Cuadro 4. Contribuciones relativas de las variables ambientales al modelo de MaxEnt bajo diferentes escenarios ..... 60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol hipotético de genes con 20 generaciones ..... 10

Figura 2. Filogenia de Caryophyllales ..... 12

Figura 3. *Talinopsis frutescens* ..... 13

Figura 4. Tipos de vegetación donde habita *Talinopsis frutescens* ..... 14

Figura 5. Distribución conocida de *Talinopsis frutescens*, provincias biogeográficas (CONABIO, 1997) y otras regiones relevantes en este estudio ..... 19

Figura 6. Sitios donde se recolectaron muestras y ejemplares de *Talinopsis frutescens* ..... 32

Figura 7. Asociaciones y características relevantes de *Talinopsis frutescens* ..... 33

Figura 8. Filogenias obtenidas por el método de máxima verosimilitud con el programa IQ-TREE para la región de núcleo y las de cloroplasto ..... 39

Figura 9. Filogenia obtenida por el método de máxima verosimilitud con el programa IQ-TREE, utilizando una matriz combinada que incluye los tres marcadores empleados ..... 40

Figura 10. Filogenias obtenidas por el método de máxima verosimilitud con el programa RaxML para la región de núcleo y las de cloroplasto ..... 41

Figura 11. Filogenia obtenida por el método de máxima verosimilitud con el programa RaxML, utilizando una matriz combinada que incluye los tres marcadores empleados ..... 42

Figura 12. Filogenias obtenidas por el método de inferencia Bayesiana para el marcador de núcleo y para los de cloroplasto ..... 43

Figura 13. Filogenia obtenida por el método de inferencia Bayesiana utilizando una matriz combinada que incluye los tres marcadores empleados ..... 44

Figura 14. Red de los haplotipos de núcleo elaborada en PopART ..... 46

Figura 15. Distribución geográfica de los haplotipos de núcleo (ITS) de *Talinopsis frutescens* ..... 47

Figura 16. Red de los haplotipos de cloroplasto elaborada en PopART ..... 48

Figura 17. Distribución geográfica de los haplotipos de los marcadores de cloroplasto (intrón *rpL16* y espaciador intergénico *trnS-trnG*) de *Talinopsis frutescens* ..... 49

Figura 18. Valores de  $F_{CT}$  obtenidos para cada uno de los  $K$  propuestos ..... 53

Figura 19. Agrupamientos con mayor valor de  $F_{CT}$  obtenidos con el análisis de SAMOVA ..... 54

Figura 20. Topología obtenida del análisis de coalescencia hecho en \*BEAST (StarBeast) ..... 56

Figura 21. Cronograma generado por el programa PATHd8, tomando en cuenta el árbol resultado del análisis de coalescencia ..... 57

Figura 22. Reconstrucción de áreas ancestrales ..... 59

Figura 23. Modelado de nicho ecológico de *Talinopsis frutescens* elaborado en MaxEnt ..... 62

## RESUMEN

*Talinopsis frutescens* es una especie que ha sido escasamente estudiada. Sus flores abren unas horas y después se cierran para siempre, intrigando sobre el nivel de variación e intercambio genético entre sus poblaciones. Habita en ambientes áridos y se asocia con otras plantas o con rocas. Su rango de distribución es discontinuo, desde el sur de E.U.A. hasta el centro de México (Valle de Tehuacán-Cuicatlán; VTC), solamente interrumpido por la Faja Volcánica Trans-Mexicana (FVTM). Los objetivos de este trabajo consistieron en saber si existe flujo genético entre las poblaciones de *T. frutescens*, si éstas están diferenciadas y si la aparición de la FVTM tuvo algún efecto en su distribución actual. Se recolectaron muestras de hojas a lo largo de su distribución, se extrajo ADN y se amplificaron tres regiones moleculares, una de núcleo y dos de cloroplasto. Los resultados mostraron diferenciación de las poblaciones del VTC, resultado de la aparición de la FVTM, pues el tiempo de divergencia de éstas coincide con el periodo de vulcanismo silícico (Mioceno tardío). Los valores de  $H_d$  y  $\pi$  indican una reciente expansión, la cual es apoyada por otros resultados obtenidos en este trabajo; *T. frutescens* se habría originado en el Altiplano sur y pudiera haber tenido dos episodios principales de expansión, uno durante el Mioceno, que coincide con la diversificación de grupos de suculentas en ambientes áridos y otro hace menos de 0.5 Ma en el Pleistoceno, probablemente relacionado con los periodos glaciales e interglaciales. Se encontró estructura filogeográfica en las regiones de cloroplasto, posiblemente relacionada con una dispersión limitada de las semillas. Este estudio es el primer trabajo de este tipo enfocado en *T. frutescens*. Se espera que la información proporcionada sea útil para entender la historia evolutiva de las plantas de ambientes áridos y con ello apoyar estrategias de conservación de este tipo de hábitats, que en su mayoría, carecen de criterios de protección.

Palabras clave: ambientes áridos, filogeografía, modelado de nicho ecológico, Norteamérica, suculenta endémica, tiempos de divergencia.

## ABSTRACT

*Talinopsis frutescens* is a species that has been poorly studied, its flowers open just during few hours and then closes forever, intriguing about the variation level and genetic exchange among their populations. The species inhabits arid environments and is associated with other plants or rocks. Its distribution range is discontinuous, from the southern USA to the central part of Mexico (Tehuacán-Cuicatlán Valley; TCV), only interrupted by the Trans Mexican Volcanic Belt (TMVB). The objectives of this work consisted of: know if there is gene flow among *T. frutescens* populations, if these are differentiated and if the emergence of the TMVB influenced the current species distribution. Leaves samples were collected throughout its distribution range, DNA was extracted, and three molecular regions were amplified, one from nucleus and two from chloroplast. Results shown differentiation of the TCV populations, result of the TMVB emerge, since its divergence times coincides with the silicic vulcanism period (late Miocene).  $Hd$  and  $\pi$  values indicates a recent expansion, which is supported by other results obtained in this work; *T. frutescens* would have originated in the Altiplano sur and could have had two main expansion episodes, one during the Miocene, that coincides with the diversification of other groups of succulents in arid environments, and other would have happened less than 0.5 Ma ago, during the Pleistocene, probably related with the glacial and interglacial periods. Structure phylogeographic was detected in chloroplast regions, likely related with the seeds limited dispersion. This is the first work of this type focused on *T. frutescens*. It is expected that the information provided will be helpful to understand the evolutive history of arid environments plants and with this support conservation strategies of this type of habits; which mostly does not have protection criteria.

Keywords: arid environments, divergence times, ecological niche modelling, endemic succulent, North America, phylogeography.

## INTRODUCCIÓN

### Filogeografía

El término filogeografía fue introducido formalmente por Avise *et al.* en 1987 y la publicación original tenía por objetivo unificar a los biólogos evolutivos en los campos dispares de la filogenética y la genética de poblaciones (Hickerson *et al.* 2010). Por definición, la filogeografía es el estudio relacionado con los principios y procedimientos que rigen la distribución geográfica de linajes de genes (Avise, 2000). En otras palabras, la filogeografía intenta explicar cómo taxa individuales llegaron a distribuirse en la forma en que se encuentran actualmente (Ebach y Humphires, 2003). La filogeografía usa árboles de genes para inferir las fuerzas históricas y contemporáneas que han producido la arquitectura genealógica de poblaciones y especies cercanamente relacionadas (Avise, 2009). Los análisis filogeográficos consisten en “sobreponer” al espacio geográfico filogenias de linajes moleculares (o genealogías génicas) para buscar patrones que permitan inferir los procesos históricos y demográficos que les dieron lugar. Esta superposición puede ser literalmente gráfica, o bien, puede representarse mediante la codificación de linajes en un árbol filogenético de acuerdo con su origen geográfico (Piñero *et al.*, 2008).

La filogeografía incorpora un conjunto de teorías, métodos e inferencias procedentes de la genética de poblaciones clásica y de la teoría de la coalescencia (Salas-Lizana, 2013). A lo largo del tiempo, la filogeografía ha aumentado el rigor estadístico de sus métodos; esto se debe en gran parte a los avances en la teoría de coalescencia, la cual permitió la estimación de parámetros basados en modelos y pruebas de hipótesis (Hickerson *et al.* 2010). En esta disciplina es fundamental contar con información sobre los cambios en la estructura o composición genética, ya sea entre generaciones a lo largo del tiempo o espacialmente entre individuos, poblaciones o especies (Vázquez-Domínguez, 2007a). La filogeografía permite y refuerza la interacción entre la micro y la macroevolución, donde la genética molecular juega un papel primordial como herramienta indispensable (Avise *et al.*, 1987).

En filogeografía se aplican los mismos algoritmos que se emplean para reconstruir árboles de especies o taxa superiores, obteniendo como resultado un filograma que representa las relaciones genealógicas entre haplotipos y donde las ramas de diferentes longitudes expresan la cantidad de cambio evolutivo; por ejemplo, este cambio evolutivo puede expresarse en número de pasos mutacionales o número de sustituciones por sitio. Al comparar secuencias homólogas, el número de diferencias en las bases es un estimador del tiempo de divergencia entre linajes, por lo que la filogeografía emplea estimaciones del reloj molecular (Vázquez-Domínguez, 2007b) provenientes de análisis del ácido desoxirribonucleico (ADN) nuclear, mitocondrial y/o de cloroplasto. La filogeografía es uno de los campos más integrativos en la biología evolutiva, ya que se han desarrollado diversas herramientas a medida que ha aumentado la complejidad de las hipótesis que se abordan; ejemplo de ello son la estimación de los parámetros filogeográficos combinados con el modelado de nicho ecológico, estudios de especiación ecológica y radiación, pruebas de modelos de ensamblaje de comunidades, así como análisis espaciales de rasgos cuantitativos y selección natural (Hickerson *et al.* 2010).

Tomando en cuenta el carácter integrativo de la filogeografía, son diversas las preguntas biológicas que ha ayudado a esclarecer; cuestiones complejas como la identificación de eventos históricos de hibridación (González-Rodríguez *et al.*, 2004) y el efecto de sucesos climáticos y topográficos sobre las poblaciones de diversos taxa (Moreno-Letelier *et al.*, 2014; Loera *et al.*, 2017; Scheinvar *et al.*, 2017) son ejemplo de los temas que han sido abordados a través de la filogeografía.

#### **Teoría de coalescencia**

La teoría de coalescencia es la que describe las relaciones históricas entre linajes de genes como una función de los parámetros demográficos; es también el nombre que actualmente se le da al análisis matemático y estadístico formal de las genealogías de genes (Avice, 2000; Cruzan y Templeton, 2000; Templeton, 2004). Dicha teoría se basa en que, bajo neutralidad, en una población y a lo largo de las generaciones, surgen de forma permanente nuevos alelos por mutación y se

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

pierden otros por deriva génica, de tal forma que todos los alelos de un gen en una generación derivan de –o coalescen hacia– un único alelo ancestral. Los procesos de coalescencia en poblaciones naturales “garantizan” las conexiones filogenéticas entre genotipos dentro de una especie a través de descendencia. De esta forma, al ver hacia atrás en el tiempo, los haplotipos eventualmente coalescen en lo que se denomina el ancestro común más reciente (MRCA, por sus siglas en inglés) (Vázquez-Domínguez, 2007b), mientras que el tiempo que los alelos de una muestra tardan en encontrar a su MRCA es el tiempo al ancestro común más reciente (TMRCA, por sus siglas en inglés) (Salas-Lizana, 2013) (Figura 1). La teoría de coalescencia formalizó elegantemente una poderosa forma de usar solo la muestra de alelos, de modo que las genealogías genéticas se modelan en el tiempo virtualmente bajo cualquier historia demográfica compleja para estimar parámetros filogeográficos, como son tamaños poblacionales históricos, tiempos de divergencia y tasas de migración dado el tiempo estocástico de los eventos coalescentes (Wakeley, 2008). De igual forma, esta teoría se volvió relevante y necesaria para los análisis filogeográficos para estimar filogenias a nivel de especie, a niveles bajos de divergencia, con datos de múltiples loci y múltiples individuos de subespecies o poblaciones (Kubatko *et al.*, 2009).

### **Genética de poblaciones**

La teoría de la genética de poblaciones tradicional fue basada típicamente en ecuaciones con miras a que ellas permitieran predecir frecuencias de alelos en generaciones futuras y considerando el modelado de poblaciones enteras (Ewens, 1979). La genética de poblaciones se refiere al estudio de los genes en las poblaciones, explora los niveles de variación genética dentro y entre las poblaciones que forman a las especies y explica sus patrones en términos de las fuerzas evolutivas (Eguiarte *et al.*, 2013). Esta disciplina proporciona las bases teóricas y experimentales de cómo dicha variación genética de las poblaciones cambia en tiempo y espacio. La genética de poblaciones investiga tanto el origen de la diversidad genética a través de mutaciones y variabilidad cromosómica, así como el modo de distribución de la diversidad genética por la vía de selección, deriva y

migración (Singh, 2015). Esta disciplina utiliza modelos matemáticos, los cuales pueden o no corresponder estrechamente con la naturaleza; si se observa la conformidad con la situación natural de un modelo, es posible evaluar numéricamente los cambios en las poblaciones y predecir las posibles consecuencias (Altukhov, 2006). Por lo anterior, esta disciplina ha demostrado ser una herramienta muy poderosa para el estudio de la evolución (Eguiarte *et al.*, 2013).

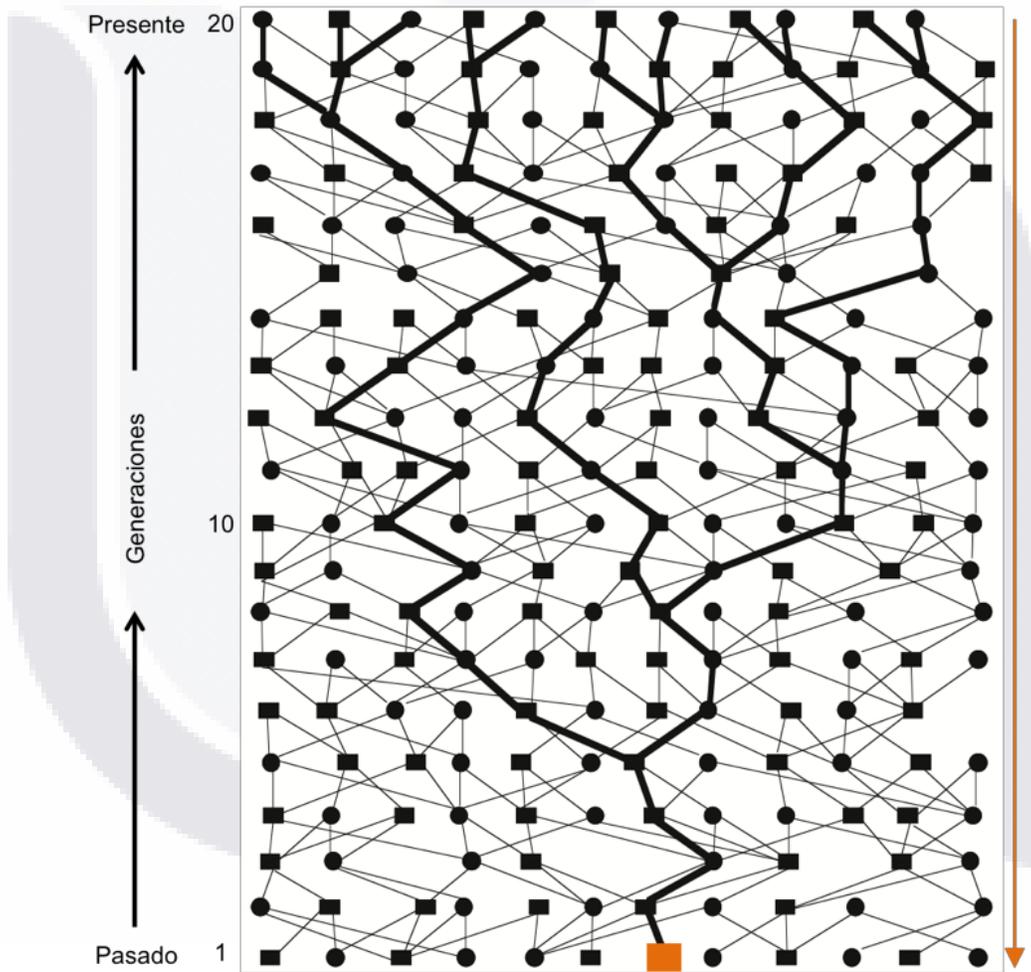


Figura 1. Árbol hipotético de genes con 20 generaciones. Los cuadros representan machos, los círculos hembras, las líneas conectan su descendencia y la línea negra gruesa traza la descendencia genética del MRC (Most Recent Common Ancestor) a través de 20 generaciones. El cuadro anaranjado indica el ancestro común más reciente (MRCA) y la flecha anaranjada indica el tiempo al ancestro común más reciente (TMRCA) (modificado de Avise, 2009).

### ***Talinopsis frutescens* A. Gray**

Anacampserotaceae es una familia de plantas suculentas y es uno de los linajes más cercanamente emparentados con Cactaceae; ambos taxa son miembros del orden Caryophyllales (Hernández-Ledesma *et al.*, 2015; Walker *et al.*, 2018) (Figura 2). Anacampserotaceae comprende 36 especies distribuidas en los géneros *Anacampseros*, *Grahamia* y *Talinopsis*; el primero tiene 34 especies y los dos últimos cuentan con una especie respectivamente (Hernández-Ledesma *et al.*, 2015). La única especie dentro del género *Talinopsis* es *T. frutescens* A. Gray, la cual es endémica del continente americano y se distribuye desde el sur de los Estados Unidos hasta el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, en Puebla, México (Ocampo, 2011).

Las plantas de *T. frutescens* son arbustos o subarbustos de 25-60 cm de alto (Figura 3A), glabras, con raíces fibrosas y tuberosas (Figura 3B). Los tallos jóvenes y ramas delgadas están ligeramente comprimidos lateralmente. Las hojas son opuestas o fasciculadas, deciduas en la temporada de sequía, los nudos tienen mechones de tricomas de 0.5- 0.7 mm largo, blancos o pardo-amarillentos; las láminas miden de 0.6-1.5 cm de largo y 0.1-0.2 cm ancho, son teretes, tienen la base cuneada y el ápice es agudo, son carnosas y glabras. Las inflorescencias son cimas sésiles, generalmente con pocas flores (Figura 3C). Las flores tienen sépalos de 5-8 mm de largo y 3-4 mm ancho, ovados a elíptico-ovados, obtusos y son persistentes en el fruto; los pétalos están imbricados, miden de 0.7-1.0 cm largo y 0.4-0.5 cm ancho, son elípticos a oblongo-elípticos, con el ápice redondeado y de color amarillo o rosa; el número de estambres va de 20-25, los filamentos miden 3-4 mm largo, las anteras son oblongas a elípticas, de 0.6-0.7 mm largo y 0.4-0.5 mm de ancho, son 2-loculares; el ovario mide cerca de 2 mm largo y el estilo cerca de 1 mm de largo, columnar, con 3 estigmas de 1-1.3 mm de largo y oblongos (Figura 3D). Los frutos son cápsulas de 1-1.2 cm de largo y 0.3-0.4 cm de ancho en la parte media, fusiformes y dehiscentes longitudinalmente desde el ápice, las valvas del exocarpo son de color pardo oscuras, recurvadas, mientras que el endocarpo es 6-valvado, blanco a pardo-amarillento, papiráceo y recto (Figura 3E); a menudo se encuentran frutos de la temporada anterior en las ramas viejas; las semillas miden

1.9-2.4 mm largo y 1- 1.3 mm de ancho, son arqueadas a cimbitiformes, pardas y con la superficie granulosa (Ocampo, 2011) (Figura 3E). La floración y fructificación se ha registrado de mayo a octubre (Ocampo, 2010; 2011).

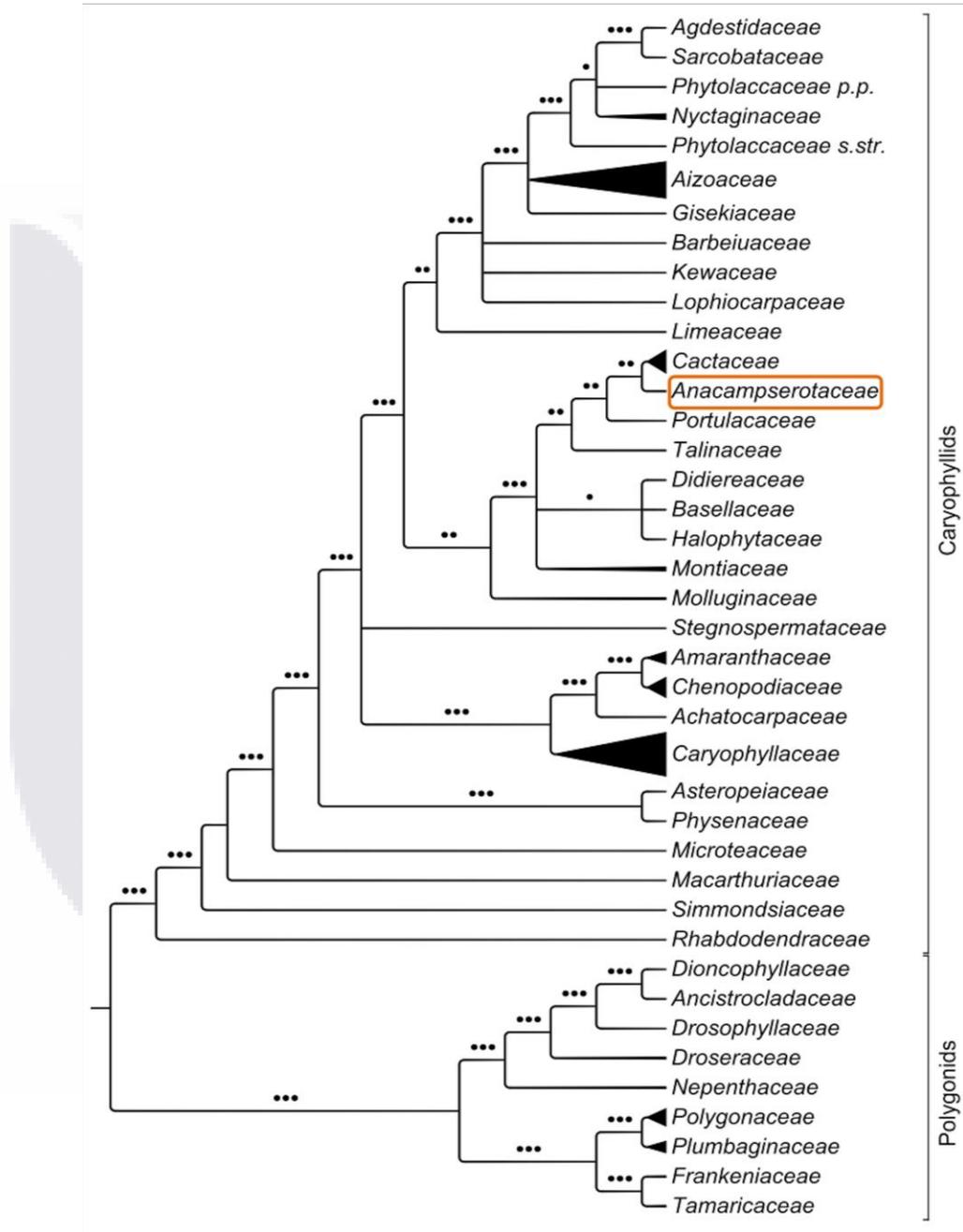


Figura 2. Filogenia de Caryophyllales. En el recuadro naranja se resalta la posición de Anacampserotaceae como linaje hermano de Cactaceae (Modificado de Hernández-Ledesma *et al.*, 2015). Los triángulos indican ramas colapsadas y el ancho de estas va en proporción de la riqueza de cada clado. ●●●= apoyo alto, ●●= apoyo intermedio, ●= apoyo bajo.

*Talinopsis frutescens* se distribuye en el bosque tropical caducifolio y en matorral xerófilo, aunque se le ha encontrado en terrenos de cultivo, pastizales y vegetación secundaria derivada de bosque de coníferas y de bosque de pino-encino (Ocampo, 2010) (Figura 4), en altitudes que van de 1100 a 2500 m s.n.m (Ocampo, 2010; 2011).

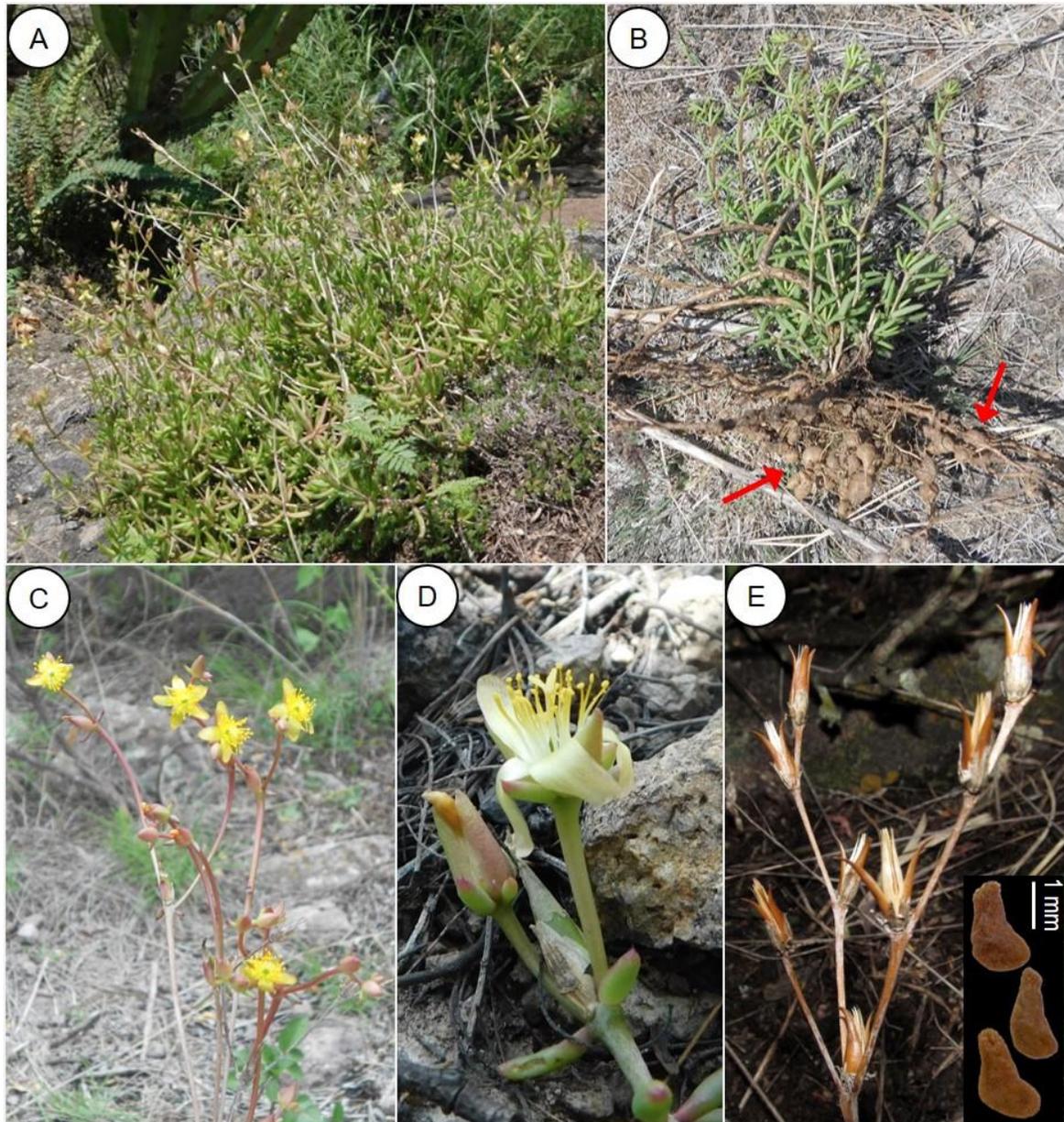


Figura 3. *Talinopsis frutescens*. A) Forma de vida; B) Raíces (flechas rojas); C) Inflorescencia; D) Botón florar y flor abierta; E) Frutos y detalle de las semillas.

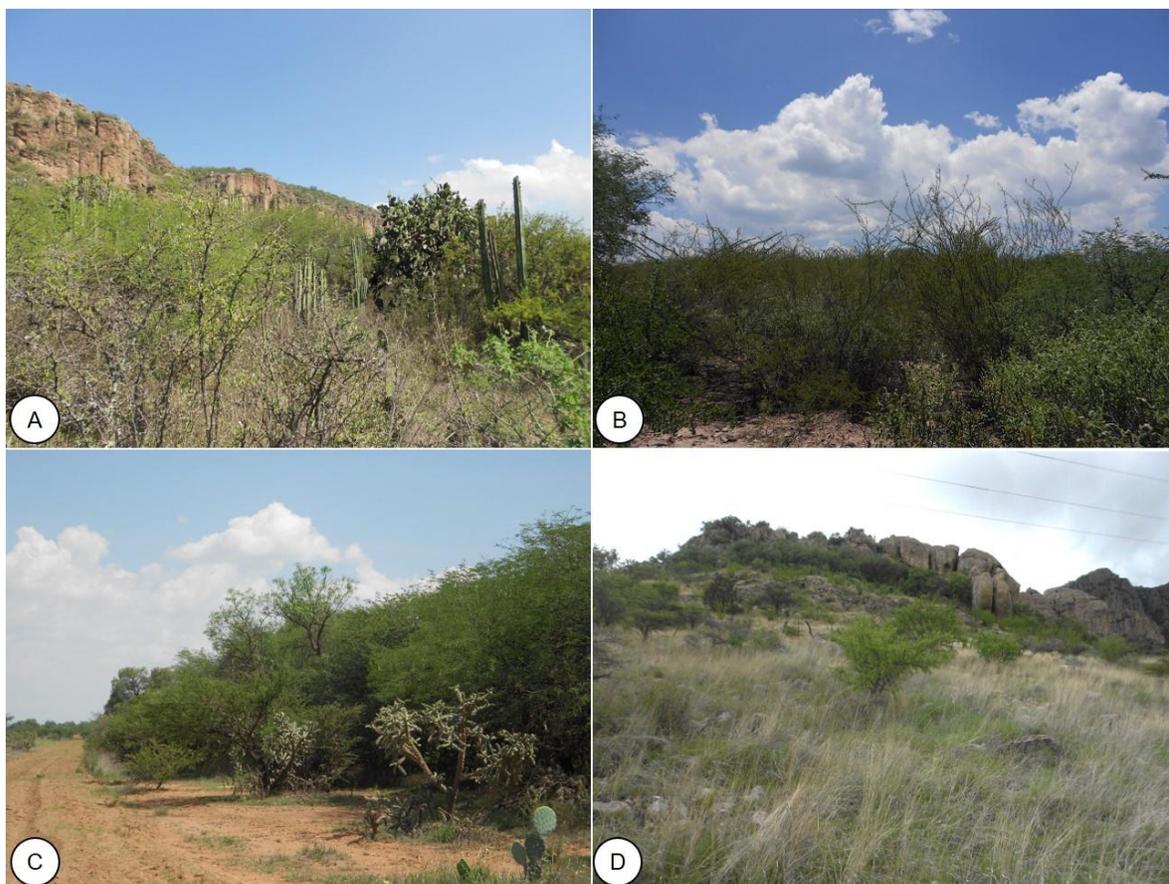


Figura 4. Tipos de vegetación donde habita *Talinopsis frutescens* A. Gray. A) Bosque tropical caducifolio; B) Matorral xerófilo; C) Vegetación secundaria asociada a zona de cultivo; D) Ecotono de bosque de encino con pastizal.

## ANTECEDENTES

Estudios moleculares recientes han aportado información sobre las relaciones evolutivas del suborden Cactineae, el cual incluye a las familias Anacampserotaceae, Basellaceae, Cactaceae, Didiereaceae, Halophytaceae, Montiaceae, Portulacaceae, Talinaceae (Ocampo y Columbus, 2010) y han evidenciado que Portulacaceae, como se circunscribe tradicionalmente (Portulacaceae s.l.), no es un grupo monofilético (Hershkovitz y Zimmer, 1997, 2000; Applequist y Wallace, 2001; Nyffeler y Eggli, 2010; Ocampo y Columbus, 2010; Arakaki *et al.*, 2011). Resulta interesante que algunos de los linajes previamente mencionados están más cercanamente emparentados con las cactáceas

(Cactaceae) que con otros géneros de Portulacaceae s.l. (Applequist y Wallace, 2001; Nyffeler y Eggli, 2010). Basados en esta evidencia y en características morfológicas, Nyffeler y Eggli (2010) desintegraron Portulacaceae s.l. en cuatro familias, Anacampserotaceae, Montiaceae, Portulacaceae (s.s.) y Talinaceae.

Anacampserotaceae, es uno de los linajes que están más cercanamente relacionados con Cactaceae (Nyffeler y Eggli, 2010; Ocampo y Columbus, 2010; Arakaki *et al.*, 2011; Hernández-Ledesma *et al.*, 2015; Walker *et al.*, 2018). Anacampserotaceae se caracteriza por tener cápsulas con dehiscencia loculicida, en donde las valvas del endocarpo provienen de una estructura en forma de canasta, y la testa exterior de las semillas está separada de la capa interna (Nyffeler y Eggli, 2010). La familia consiste de tres géneros (*Anacampseros*, *Grahamia* y *Talinopsis*) y 36 especies, de las cuales 30 se distribuyen en África, cinco en América y una en Australia. *Anacampseros* es un grupo de herbáceas enanas con hojas dispuestas en roseta; *Grahamia* y *Talinopsis*, son subarborescentes leñosos con distintos internodos (Nyffeler y Eggli, 2010), *Grahamia* presenta flores blancas y a diferencia de *Talinopsis* y *Anacampseros*, en el fruto maduro el exocarpo no se separa del endocarpo (Ocampo, 2011); *Talinopsis* puede presentar flores amarillas o rosas (Miguel-Vázquez y Ocampo, 2017).

Análisis de secuencias de ADN han mostraron que los linajes más tempranamente divergentes de la familia corresponden a dos géneros monotípicos americanos: *Grahamia bracteata* Gillies ex Hook. (Argentina) y *Talinopsis frutescens* A. Gray (E.U.A. y México) (Nyffeler y Eggli, 2010). Este último taxón es el miembro más tempranamente divergente de la familia, lo que constituye un problema muy interesante desde el punto de vista biogeográfico, puesto que *T. frutescens* es endémico de Norteamérica, mientras que la mayoría de las especies restantes de la familia (86%) se distribuyen en otros continentes (83% en África y 3% en Australia). Ocampo y Columbus (2010) estimaron que Anacampserotaceae apareció hace 12-30 millones de años (Ma); posteriormente, Arakaki *et al.* (2011) asignaron a la familia una edad de 31.2 Ma y poco tiempo después Ocampo y Columbus (2012) reestimaron la edad de la familia en 30 Ma. Aunque los orígenes

de la familia no son claros, parece que se originó en el continente americano (Ocampo y Columbus, 2010).

*Talinopsis frutescens* es una especie que ha sido poco estudiada, de la cual se desconocen aspectos como polinización, dispersión, reproducción, anatomía e interacciones con otros organismos, entre otros. Tampoco existen estudios que aborden la filogeografía de la especie o de algún taxón incluido dentro de Anacampserotaceae, caso contrario a lo que ocurre en Cactaceae (e.g., Bonatelli *et al.*, 2014; Pérez *et al.*, 2015; Cornejo-Romero *et al.*, 2017). La distribución conocida de *T. frutescens* se extiende desde la parte sur de Estados Unidos hasta el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, en Puebla, México (Figura 5). Los individuos de *T. frutescens* se desarrollan preferentemente en sitios con vegetación de matorral xerófilo y bosque tropical caducifolio (Ocampo, 2011). La floración se registra de mayo a octubre (Ocampo, 2010) y las flores abren solamente una vez durante pocas horas (Miguel-Vázquez y Ocampo, 2018), lo cual podría estar reduciendo las probabilidades de que lleven a cabo polinización cruzada. Este comportamiento podría ser un limitante importante para el flujo génico intra e interpoblacional.

La distribución conocida de *T. frutescens* se extiende a través de cinco diferentes provincias biogeográficas (CONABIO, 1997), el Altiplano norte, el Altiplano sur, la Sierra Madre Occidental (SMO), la Sierra Madre Oriental y la Faja Volcánica Trans-Mexicana (FVTM). La provincia de la FVTM es de particular importancia para la distribución de la especie en estudio, ya que se tiene registro de poblaciones en los extremos norte y sur de ésta, más no así en su parte media. La FVTM está constituida por una zona de montañas y volcanes; se estima que su formación comenzó en el Mioceno medio, hace aproximadamente 7.5-21 Ma y cuyo último episodio volcánico se dio desde el Plioceno tardío hasta el Holoceno (Gómez-Truena *et al.*, 2007; Cohen *et al.*, 2013). Las poblaciones de *T. frutescens* más meridionales se ubican en la zona del Valle de Tehuacán-Cuicatlán (VTC; Puebla-Oaxaca), en el extremo sureste de la provincia de la FVTM, mientras que el resto de las poblaciones de las que se tiene conocimiento se ubican al norte la FVTM, principalmente en el Altiplano Mexicano (Figura 5).

Las zonas en las que se puede encontrar a *T. frutescens* corresponden a regiones áridas; la mayoría de las áreas donde se ha registrado su presencia se ubican en el Altiplano Mexicano, el cual incluye las provincias biogeográficas del Altiplano sur (Zacatecano-Potosino) y el Altiplano norte (Chihuahuense), este último incluye la mayor parte del desierto Chihuahuense (DC) en territorio mexicano. Estas regiones resultan de gran interés debido a su compleja historia geológica y climática, la cual han sido factor importante para dar como resultado la diversidad actual de flora y fauna que ahí se encuentra (Morafka, 1977; Wilson y Pitts, 2010). Otra zona donde se sabe que se distribuye la especie es el VTC, que pertenece a la región xerofítica de México (Rzedowski, 2006) y posee una biodiversidad excepcional, lo que la convierte en la zona árida y semiárida de Norteamérica con mayor riqueza biológica (Dávila *et al.*, 2002).

El DC es el desierto de mayor extensión en Norteamérica con 647500 km<sup>2</sup> y se considera como una de las regiones secas con mayor riqueza de especies del mundo (Morafka, 1977; Hoyt, 2002). El DC va desde el sur de Nuevo México (E.U.A.) a través de la cuenca del Río Grande y se extiende hacia el sur sobre el Altiplano Mexicano en los estados de Chihuahua, Coahuila, Durango, Nuevo León y San Luis Potosí. El DC está limitado al oeste y al este por las SMO y Oriental, respectivamente, mientras que sus límites al norte y al sur son más difíciles de definir, por lo que generalmente se basan en indicadores diagnóstico como clima o comunidades animales y/o vegetales (Hoyt, 2002). Se presume que la formación de los desiertos occidentales pudo haber empezado en el Mioceno (23.03-5.33 Ma). Aunque en el Paleógeno-Neógeno (66-2.5 Ma) el DC era poco árido, al menos en algunos lugares no habría alcanzado su estado de aridez hasta el Pleistoceno temprano (2.58-0.78 Ma) con la conformación final de las SMO, la Sierra Madre Oriental y la formación de las condiciones áridas sobre las grandes planicies. Las presentes condiciones de aridez probablemente existieron en la mayor parte del Pleistoceno (2.58-0.01 Ma), pero es de común acuerdo que ocasionalmente hubo períodos pluviales (Martin y Harrell, 1957). El grado en que estos periodos de incremento de humedad se extendieron sobre el DC, así como sus efectos sobre la

fauna y flora, ha sido objeto de considerable debate (Milstead, 1960; Willson y Pitts, 2010).



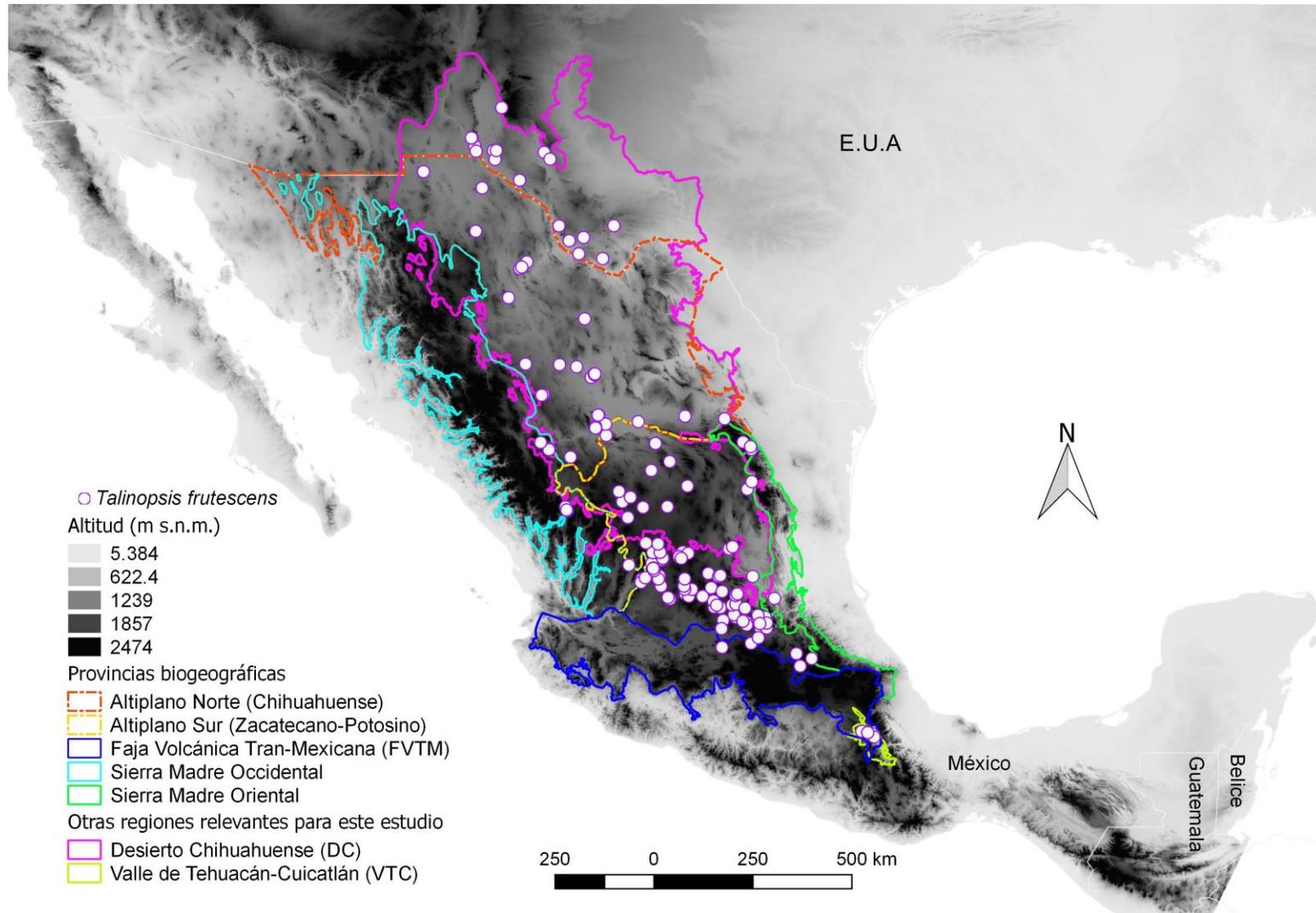


Figura 5. Distribución conocida de *Talinopsis frutescens*. Se muestran provincias biogeográficas (CONABIO, 1997) y otras regiones relevantes en este estudio. Como base se empleó una cobertura de elevación (Jarvis *et al.*, 2008).

Otra región árida de gran relevancia para este estudio es el VTC, la cual es considerada parte de la región xerofítica de México (Rzedowski, 2006). Esta provincia florística se ubica en la parte sureste de Puebla y en el área adyacente de Oaxaca. El VTC cubre un área de 10000 km<sup>2</sup> y representa un mosaico fisiográfico complejo con valles internos, separados por numerosas cadenas montañosas. La diversidad de plantas de esta región representa el 10-11.4% de la diversidad nacional, con aproximadamente 180 familias, 891 géneros y 2650 especies de plantas vasculares (Valiente-Banuet *et al.*, 2009) con un número alto de endemismos (Dávila *et al.*, 2002). Si estas cifras se comparan con las de otras regiones áridas de México, serían similares a las registradas en el Desierto Sonorense y aproximadamente 1000 especies menos que las del DC; sin embargo, comparativamente, la extensión del VTC es mucho menor que las otras dos regiones (Valiente-Banuet *et al.*, 2009).

Se sabe que una buena porción de la flora endémica de México se localiza en regiones áridas (Rzedowski, 1993), por lo que es posible encontrar diversos estudios enfocados en taxa que se distribuyen en estas zonas, como cactáceas y otras suculentas. Se han realizado diversos trabajos enfocados en aspectos ecológicos de la vegetación actual (Milstead, 1960; Silva-Montellano y Eguiarte, 2003; Granados-Sánchez *et al.*, 2011) y de la vegetación histórica (Wells, 1966), así como estudios filogeográficos. Un ejemplo de estos últimos es el realizado por Nason *et al.* (2002), el cual se enfocó en las cactáceas columnares de la zona desértica de Sonora, Baja California y Baja California Sur. En 2009 Sosa *et al.* estudiaron la historia evolutiva de las poblaciones de *Hunnemannia fumariifolia* Sweet (Papaveraceae), especie endémica de México. Posteriormente, Rebernick *et al.* (2010) investigaron el efecto que tuvo la aridificación de la zona suroeste de Norteamérica sobre la filogeografía y evolución de *Melampodium leucanthum* Torr. & A. Gray (Asteraceae), una especie de amplia distribución y de las mejor adaptada a las condiciones de sequía. En 2017 Scheinvar *et al.* reconstruyeron la historia de *Agave lechuguilla* Torr. (Asparagaceae), un elemento característico e importante del DC. En el mismo año, Angulo *et al.* identificaron los rasgos genéticos y modelaron el nicho ecológico de *Berberis trifoliolata* (Berberidaceae), un arbusto endémico del

DC, con proyecciones a los períodos del último máximo glacial y del último periodo interglaciar. Este último aspecto también fue abordado por Loera *et al.* (2017), quienes investigaron la posible influencia de la actividad orogénica del Neogeno tardío y de los ciclos glaciales e inter glaciales del Pleistoceno sobre la divergencia intraespecífica y la historia demográfica de una especie de gimnosperma, *Ephedra compacta* (Ephedraceae). El trabajo de Loera *et al.*, 2017, junto con el estudio realizado por Vásquez-Cruz y Sosa (2016), enfocado en el género monotípico *Lindleya* (Rosaceae), representan un antecedente relevante para la presente investigación, ya que al igual que *T. frutescens*, estas dos taxa son endémicos de Norteamérica y sus rangos de distribución son discontinuos, desde el Altiplano Mexicano hasta el Valle de Tehuacán-Cuicatlán. La distribución peculiar de la especie en estudio es un factor importante que permite especular acerca del flujo génico entre sus poblaciones ubicadas en el extremo sur y aquellas localizadas en el resto de la distribución conocida. Algunas de las preguntas que surgen son las siguientes: ¿existe flujo génico entre ambos grupos de poblaciones? De ser así, ¿qué tan elevado es? o de lo contrario, si no lo hay, ¿hace cuánto tiempo se interrumpió?, ¿qué tan diferenciadas se encuentran las poblaciones? ¿es esto un resultado de la aparición de la FVTM? ¿qué tanta variación genética hay en las poblaciones meridionales?

## **JUSTIFICACIÓN**

El presente trabajo aportará información al conocimiento de *T. frutescens*. Esta especie ha sido poco estudiada y tiene importancia evolutiva para Anacampserotaceae y para otros linajes de plantas suculentas, como las cactáceas, grupo con el cual está cercanamente emparentada y cuyas poblaciones han sido considerablemente mermadas, debido a factores como la fragmentación y la extracción ilegal de ejemplares, entre otros. De igual forma, los resultados que arroje esta investigación permitirán saber más acerca de los procesos de evolución y diversificación de las suculentas en los ambientes áridos de México y podrían emplearse en un futuro con fines de conservación.

## OBJETIVOS

### General

Estimar si existe flujo génico entre las poblaciones de *T. frutescens*, determinar si existe diferenciación entre ellas y definir si la diferenciación (en caso de existir) está influenciada por la distribución geográfica de la especie. Además, estimar los patrones de distribución histórica que contribuyeron a que *T. frutescens* alcanzara su distribución actual conocida.

### Particulares

Determinar si existe variación genética entre las poblaciones de *T. frutescens*.

En el caso que se detecte variación genética entre las poblaciones de *T. frutescens*:

- Determinar si hay flujo génico entre las poblaciones.
- Estimar los procesos históricos que han influenciado los patrones geográficos de variación genética.
- Analizar los posibles patrones de distribución histórica de *T. frutescens*.
- Estimar los tiempos de divergencia de las poblaciones de *T. frutescens*.

## HIPÓTESIS

1. Debido a la distribución geográfica de *T. frutescens*, que va desde el sur de Estados Unidos hasta el VTC, se espera que exista variación genética entre sus poblaciones.
2. La FVTM divide a las poblaciones que se encuentran al norte y sur de la misma, por lo que el flujo génico podría ser limitado.
3. Los tiempos de divergencia de las poblaciones ubicadas al norte y sur de la FVTM de *T. frutescens* coincidirán con los eventos orogénicos ocurridos en la misma.

## MÉTODOS

### Revisión de herbario y bases de datos

Se examinaron los ejemplares de herbario correspondientes a *T. frutescens* depositados en diferentes colecciones del país (HUAA, IEB, MEXU, XAL) y una en el extranjero (RSA), así como bases de datos en línea (GBIF.org (2017), REMIB, SERNEC PORTAL), con la finalidad de obtener datos acerca de su distribución, fenología y otros que pudieran servir para el proyecto (e.g., coloración de las flores, asociaciones con otros organismos).

### Muestreo

Se recolectaron hojas en silica gel de 9-16 individuos por población, dependiendo de la disponibilidad de material, a lo largo de la distribución conocida de *T. frutescens*, la cual se obtuvo a partir de la consulta de bases de datos y de ejemplares de herbario.

Por cada población se recolectaron hasta tres ejemplares de herbario, dependiendo de la disposición de material, los cuales serán depositados en los herbarios HUAA (Universidad Autónoma de Aguascalientes), IEB (Instituto de Ecología, A.C.) y MEXU (Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México).

### Análisis moleculares

Se extrajo material genómico de muestras individuales utilizando el kit de extracción Blood-Animal-Plant DNA Preparation Kit (Jena Bioscience, Jena, Alemania) y el método de CTAB 2X modificado de Doyle y Doyle (1987). A este último se le hicieron modificaciones y se emplearon al menos cuatro diferentes variantes en el protocolo con la finalidad de obtener ADN de buena calidad (Anexo A). Las muestras de ADN se cuantificaron en un espectrómetro de microvolumen Colibri® (Titertek-Berthold, Pforzheim, Alemania).

Se realizó una revisión de literatura (Taberlet *et al.*, 1991; Oxelman, *et al.*, 1997; Strand *et al.*, 1997; Klak *et al.*, 2003; Shaw *et al.*, 2005; 2007; 2014; Byrne y

Hankinson, 2012; Prince, 2015; Romero-Brito *et al.*, 2016) para seleccionar marcadores moleculares que hayan mostrado variación en grupos afines a la especie en estudio (Caryophyllales; e.g., Cactaceae y Portulacaceae). Se seleccionaron y evaluaron diez marcadores moleculares, tres de núcleo (G3PDH, ITS y Tpi) y siete de cloroplasto (intrón *rpL16*, *ndhF-rpL32*, *petL-psbE*, *psbJ-petA*, *rpL32-trnL*, *trnL-trnF* y *trnS-trnG*). Con base en la facilidad para amplificar cada región, la calidad de las secuencias obtenidas y la variación ofrecida, se seleccionaron tres marcadores moleculares, uno de núcleo (ITS) y dos de cloroplasto (intrón *rpL16* y el espaciador intergénico *trnS-trnG*), con los cuales fueron procesadas el total de muestras empleadas en este estudio.

Los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron enviados a un sitio externo (Macrogen, Corea del Sur) para su purificación y secuenciación en una sola dirección.

Las secuencias resultantes fueron editadas (GeneStudio™ Professional Edition V. 2.2.0.0 © 1999-2000) y alineadas utilizando el programa MUSCLE (Edgar, 2004) y la plataforma en línea MAFFT (Kato et al., 2017), seguido de una corrección manual en Phyde® v. 0.9971 (Müller *et al.*, 2010).

#### **Análisis filogenéticos**

Como grupo externo se utilizaron secuencias obtenidas de GenBank de *Portulaca oleracea* L. (Portulacaceae), *Pereskia aculeata* Mill. (Cactaceae) y *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertn. (Talinaceae) (los números de registro se incluyen en el Anexo B). Cada uno de estos taxa pertenecen a las tres familias más cercanamente emparentadas con Anacampserotaceae (Hernández-Ledesma *et al.*, 2015).

Los datos moleculares se analizaron a través de métodos de máxima verosimilitud (Felsenstein, 1973) y Bayesianos (Yang y Rannala, 1997). Los análisis de máxima verosimilitud se realizaron en el programa RaxML (Stamatakis, 2014) y en IQ-Tree (Hoang *et al.*, 2018). El motivo por el que se emplearon dos diferentes programas basados en máxima verosimilitud fue para cotejar ambas estimaciones, ya que, aunque ambos se basan en el mismo método, las opciones para llevar a

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cabo los análisis, así como las pruebas de apoyo que ofrecen son variadas. Un ejemplo de lo anterior es el modelo de sustitución que se puede asignar a los datos, ya que en RaxML se restringe al uso del modelo GTR (Tavaré, 1986), mientras que en IQ-TREE es posible utilizar particiones y asignar cualquier modelo a cada una de ellas. Otra característica relevante son las pruebas de apoyo que ofrecen cada uno. Mientras que RaxML brinda la prueba de Bootstrap (Felsenstein, 1985), en IQ-TREE es posible implementar una variante de ésta, el Ultra Fast Bootstrap, la cual tiene requerimientos computacionales menores por lo que es más rápida y obtiene valores de apoyo menos sesgados según sus autores (Hoang *et al.*, 2018); de manera complementaria, también se puede aplicar a las ramas la prueba aproximada de verosimilitud tipo SH (SH-aLRT, por sus siglas en inglés) (Guindon *et al.*, 2010). Para los análisis hechos en RaxML, se emplearon 1000 iteraciones de Bootstrap, mientras que para las hechas en IQ-Tree se usaron dos pruebas, Ultrafast Bootstrap y SH-aLRT, cada una con 1000 repeticiones.

Para el análisis Bayesiano se utilizó el programa MrBayes v. 3.2 (Ronquist *et al.*, 2012). Se emplearon 10000000 generaciones con un valor de burnin de 0.25 y el apoyo de los clados se determinó por medio de probabilidades posteriores Bayesianas (Rannala y Yang, 1996). Los modelos de evolución del ADN fueron estimados con el programa jModelTest 2 (Darriba *et al.*, 2012) para cada uno de los marcadores de forma individual, utilizando el modelo que mejor se ajustó para cada uno.

Para todos los análisis se emplearon dos matrices, una incluyendo el marcador de núcleo (ITS) y la otra en la que se combinaron los dos marcadores de cloroplasto (intrón *rpL16* y *trnS-trnG*). Para esta última matriz, se utilizaron particiones para aplicar el modelo correspondiente a cada uno de los marcadores. El análisis de los datos se llevó a cabo de esta manera, tomando en cuenta que las características del ADN de núcleo y cloroplasto son distintas, siendo un factor relevante la vía en que se hereda cada uno; esta característica puede influir en que las regiones pertenecientes a uno y otro órgano proyecten historias distintas (Arnold y Ems, 1998). Para poder comparar estos resultados con los obtenidos en los análisis de diversidad genética poblacional, en donde los estimadores se obtienen por cada tipo

de marcador empleado (núcleo y cloroplasto, en este estudio), las secuencias de las dos regiones de cloroplasto se analizaron en conjunto en una matriz y no de manera individual. Además, se hicieron estimaciones filogenéticas con una matriz combinada, incluyendo los tres marcadores empleados en este trabajo; el respectivo modelo evolutivo de cada región fue asignado en aquellos programas que permiten esta especificación (IQ-Tree y MrBayes).

Los análisis de RaxML y de inferencia Bayesiana se efectuaron en el clúster computacional CIPRES Science Gateway (Miller *et al.*, 2010).

#### **Diversidad genética poblacional**

Se obtuvo una red de haplotipos para el ADN de núcleo (ITS) y una para el ADN de cloroplasto (intrón *rpL16* y *trnS-trnG*) basada en parsimonia con el programa PopART (Clement *et al.*, 2002), usando el límite de 95% de probabilidad de conexión y tratando los gaps como datos faltantes. El motivo por el que se analizaron las secuencias de núcleo y las de cloroplasto en dos matrices por separado, es el mismo que se mencionó en la sección de análisis filogenéticos.

Se utilizó el programa DnaSP v6 (Rozas *et al.*, 2017) para calcular la diversidad de nucleótidos ( $\pi$ ; número promedio de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias de ADN), el número de haplotipos ( $h$ ) y la diversidad de haplotipos (Hd; medida de la frecuencia de variantes haplotípicas en una población) (Nei, 1987).

Para saber si las poblaciones presentaban estructura genética, se obtuvieron los valores  $F_{st}$  (índice de diferenciación de las poblaciones) (Weir y Cockerham, 1984). También se efectuó un análisis de varianza molecular (AMOVA) en el programa Arlequin v. 3.01 (Excoffier *et al.*, 2005), empleando el método de distancias pareadas, con 10000 generaciones, agrupando las poblaciones de la siguiente manera: a) sin agrupar, b) dos grupos (Altiplano (Norte y Sur) + SMO) y VTC), c) cuatro grupos (Altiplano Norte, Altiplano Sur, SMO y VTC). La regionalización utilizada en este análisis se explica en la sección de biogeografía histórica. Este análisis se empleó para determinar si existe diferenciación genética entre las poblaciones ubicadas en las distintas provincias biogeográficas.

Se hizo un análisis espacial de la varianza molecular en el programa SAMOVA ver. 1.0 (Dupanloup *et al.*, 2002) para estimar los grupos de poblaciones que son geográficamente homogéneos y genéticamente diferenciados entre ellos. La elección del número de grupos se define a través del índice  $F_{CT}$ , el cual representa la proporción de la varianza genética total debido a las diferencias entre grupos de poblaciones (Dupanloup *et al.*, 2002). El análisis se realizó con valores de  $K$  de 2 a 20 y los índices de fijación fueron probados usando 100 permutaciones.

Para saber si existía estructura filogeográfica, se estimaron los parámetros de diferenciación genética  $G_{ST}$  y  $N_{ST}$ , en donde el primero toma en cuenta las frecuencias haplotípicas y el segundo además de las frecuencias considera las similitudes entre haplotipos (Pons y Petit, 1996). Para esta estimación se emplearon 1000 permutaciones y se usó el programa PERMUT 2.0 (Pons y Petit, 1996).

Todos los análisis antes mencionados, se llevaron a cabo empleando por separado dos matrices, una con el marcador de núcleo (ITS) y la otra con los marcadores de cloroplasto (intrón *rpL16*, *trnS-trnG*).

#### **Análisis de coalescencia**

Para obtener un panorama más claro de las posibles relaciones entre las poblaciones de *T. frutescens*, se realizó un análisis de coalescencia por el método de inferencia Bayesiana con el programa \*BEAST v2.4.7 (StarBeast) (Bouckaert *et al.*, 2014). Se emplearon los tres marcadores (núcleo y cloroplasto), los cuales se analizaron al mismo tiempo en un análisis particionado y para el grupo externo se usaron secuencias de GenBank de las especies *Portulaca oleracea* (Portulacaceae) y *Talinum paniculatum* (Talinaceae) (Anexo B). Para las tres particiones se usó el modelo GTR (Tavaré, 1986) y se emplearon cadenas con longitud de 10000000 generaciones, guardando la información cada 5000 generaciones, con un preburnin de 0 y número de intentos de 10. La convergencia de las cadenas se verificó en Tracer v1.6.0 (Rambaut *et al.*, 2013) y se realizaron corridas hasta que el valor del número efectivo de muestras independientes (ESS) fue superior a 200. En LogCombiner v2.4.7 (Rambaut y Drummond, 2002-2017) se hizo un remuestreo a una frecuencia de 10000 generaciones, con un burnin de 10%. Los árboles

resultantes fueron resumidos en un árbol consenso, usando el programa TreeAnnotator v2.4.7 (Rambaut y Drummond, 2002-2017).

#### **Estimación de tiempos de divergencia**

Los tiempos de divergencia se obtuvieron con el programa PATHd8 (Britton *et al.*, 2007). Este programa requiere una topología estimada previamente, por lo cual se utilizó la obtenida por el método de coalescencia antes mencionado. Dicha topología se modificó forzando uno de los dos grupos externos (*Talinum paniculatum*) como raíz, de modo que (*Portulaca oleracea*) se consideró como grupo hermano de *Talinopsis frutescens*; esto se hizo para obtener el clado *Talinopsis* + *Portulaca*, al cual se le asignó un punto de calibración. Se empleó una calibración secundaria de edad fija, utilizando la edad obtenida por Ocampo y Columbus (2012) para el clado *Talinopsis* + *Portulaca*, la cual es de 29.7616 Ma.

#### **Biogeografía histórica**

Se utilizaron tres provincias biogeográficas, Altiplano norte, Altiplano sur y SMO, tomando en cuenta la regionalización hecha por CONABIO (1997), la cual está basada en el sistema de clasificación de provincias bióticas (con énfasis en criterios morfotectónicos; Ferrusquía-Villafranca, 1990), el de regiones y provincias mastogeográficas (Ramírez-Pulido y Castro-Campillo, 1990), el de divisiones florísticas (Rzedowski y Reyna-Trujillo, 1990) y el de provincias herpetofaunísticas (Casas-Andreu y Reyna-Trujillo, 1990). Como cuarta región se empleó el área correspondiente al Valle de Tehuacán-Cuicatlán (VTC), que no corresponde a una provincia biogeográfica, sino a un área natural protegida ubicada en el extremo sureste de la provincia biogeográfica de la FVTM. Se decidió emplear el VTC debido a que las características de la FVTM son muy heterogéneas, siendo el VTC la región más conspicua dentro de dicha provincia que cuenta con las características de hábitat para *T. frutescens* y de la cual se obtuvieron muestras para este estudio (Figura 5). Para los grupos externos, *Portulaca oleracea* y *Talinum paniculatum*, se utilizó una distribución a nivel continental para África, el Caribe y Centroamérica, ya que estos dos taxa son ampliamente distribuidos alrededor del mundo.

Para la reconstrucción de la biogeografía histórica se utilizó el programa RASP (Yu *et al.*, 2015), con el cual se efectuó el análisis de dispersión y vicarianza (S-DIVA) (Yu *et al.*, 2010) y el de método de máxima verosimilitud con el modelo DEC (Lagrange) (Ree y Smith, 2008). Para ambos análisis se utilizaron un máximo de cuatro áreas por nodo. El archivo de entrada contiene los últimos 1000 árboles de la fase estacionaria de un archivo que originalmente contenía 36941 árboles, producto del análisis de coalescencia realizado en \*BEAST (StarBeast); como árbol condensado se empleó la topología modificada (incluyendo longitudes de ramas) usada para la estimación de tiempos de divergencia.

#### **Modelado de nicho ecológico**

Se realizó el modelado de nicho ecológico (MNE) de *T. frutescens* con proyecciones al pasado, presente y futuro. Para la proyección al pasado, se consideraron el último periodo interglaciar (LIG; 140,000–120,000 años atrás; [Otto-Bliesner \*et al.\*, 2008](#)) y último máximo glacial (LGM; 22 000 años atrás). Para la proyección al futuro, se consideró el año 2070 y se tomaron en cuenta cuatro escenarios con un gradiente de valor de Representative Concentration Pathways (RCP; 2.6, 4.5, 6.0 y 8.5). Se emplearon las 19 variables climáticas de Worldclim 1.4 (Hijmans *et al.*, 2005) a una resolución de ~1 x 1 km, excepto por las del LGM que se usaron a ~5 x 5 km. Las simulaciones se llevaron a cabo con el programa MaxEnt v3.4.0 (Phillips *et al.*, 2018), usando el Community Climate System Model (CCSM4; Gent *et al.*, 2011), con un umbral de convergencia de  $10^{-5}$ , con 1000 iteraciones máximas y un valor de multiplicador de regularización de 1, así como los valores predeterminados para el resto de los parámetros de modelo. Para evaluar la calidad del modelo, se particionaron los datos en 75% de entrenamiento y 25 % de prueba.

Para confirmar que las variables con los porcentajes más altos de contribución para cada uno de los siete modelos no estuvieran altamente correlacionadas ( $r > 0.9$ ), se realizó un análisis de correlación de Pearson entre las 19 variables, empleando el programa ENMTools (Warren *et al.*, 2008). Adicionalmente, se empleó el mismo programa para comparar estadísticamente la amplitud del nicho (Nakazato *et al.*,

2010) de los siete modelos obtenidos, haciendo uso las métricas B1 y B2 (Levins, 1968).

Los registros de presencia de la especie se obtuvieron de la consulta de bases de datos, herbarios y colectas propias (Anexo C). Las bases de datos consultadas fueron la Global Biodiversity Information Facility (GBIF; <http://www.gbif.org/species>), la Red Mundial de Información sobre Biodiversidad (REMIB; [http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/remib\\_esp.html](http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/remib_esp.html)), el Serneec Portal (<http://serneecportal.org/portal/>), TROPICOS (<http://www.tropicos.org>) y UNIBIO (Unidad de Informática para la Biodiversidad). Se revisaron especímenes de los herbarios ANSM (Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, México), CIIDIR (Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR Unidad Durango, México), HUAA (Universidad Autónoma de Aguascalientes, México), IEB (Instituto de Ecología, A.C., Centro Regional del Bajío, México), INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, México), MEXU (Universidad Nacional Autónoma de México, México), RSA (Rancho Santa Ana Botanic Garden, E.U.A.) y el de la Universidad Autónoma de Zacatecas, México (colección no registrada en el Index Herbariorum; <http://sweetgum.nybg.org/science/ih/>).

## RESULTADOS

### Revisión de herbario y bases de datos

Se examinaron un total de 72 ejemplares de *T. frutescens* depositados en las colecciones mencionadas en la sección de Métodos. Durante la revisión, se tomaron fotografías de los ejemplares y se capturaron los datos de las etiquetas. De igual manera, se solicitó información (datos de colecta) sobre los ejemplares de la especie depositados en otras colecciones que no fue posible visitar: ANSM, CIIDIR, MEXU, UAZ y UNL. Además, se consultaron algunas bases de datos en línea, de donde se obtuvo información de ejemplares depositados en otros herbarios.

Con la información obtenida de las fuentes antes mencionadas, además de la adquirida de las recolecciones propias, se elaboró una tabla de datos empleando el programa Excel 2011, que incluye los siguientes campos: país, estado, municipio,

localidad, latitud, longitud, altitud, tipo de vegetación, descripción, fecha, colector, número de colecta, colectores asociados y observaciones. Esta tabla cuenta con 156 registros, los cuales han sido depurados, eliminando los duplicados depositados en diferentes colecciones. Aquellos registros que no contaban con coordenadas, pero incluían información suficiente para ubicar el sitio de colecta, fueron georreferenciados empleando el programa Google Earth Pro.

### **Muestreo**

Se llevaron a cabo dos viajes de recolección. El primero se realizó en el mes de junio de 2016 y se muestrearon poblaciones de los estados de Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Puebla y Querétaro. El segundo se realizó a finales de julio e inicios de agosto del mismo año y se visitaron los estados de Chihuahua, Durango, Nuevo León, San Luis Potosí y Zacatecas (Figura 6). Se obtuvieron 26 números de colecta, cada uno con uno a tres individuos para ejemplares de herbario, así como muestras de material foliar de nueve a 16 individuos por población; en total se obtuvieron muestras de 339 individuos. Además, se contó con muestras de cuatro poblaciones más (41 individuos), producto de viajes de colecta realizados previamente por G. Ocampo.

Como resultado adicional de la recolección en campo, se obtuvo información de la biología de *T. frutescens*. Se observaron algunos posibles polinizadores, tales como arañas, avispas, escarabajos y moscas visitando flores abiertas (Figura 7 A-B). Otro tipo de asociación que se identificó en campo fue el de las plantas de *T. frutescens* con otras especies como *Agave salmiana* (Asparagaceae), *Calliandra eriophylla* (Fabaceae), *Larrea tridentata* (Zygophyllaceae), *Opuntia* spp. (Cactaceae) y *Parthenium* sp. (Asteraceae) (Figura 7 C-E); también se observaron plantas de la especie en estudio protegidas por rocas. Por otro lado, en muchos de los sitios donde se recolectaron ejemplares, se observó ganado y los individuos de *T. frutescens* eran de menor tamaño y/o con señales de ramoneo.

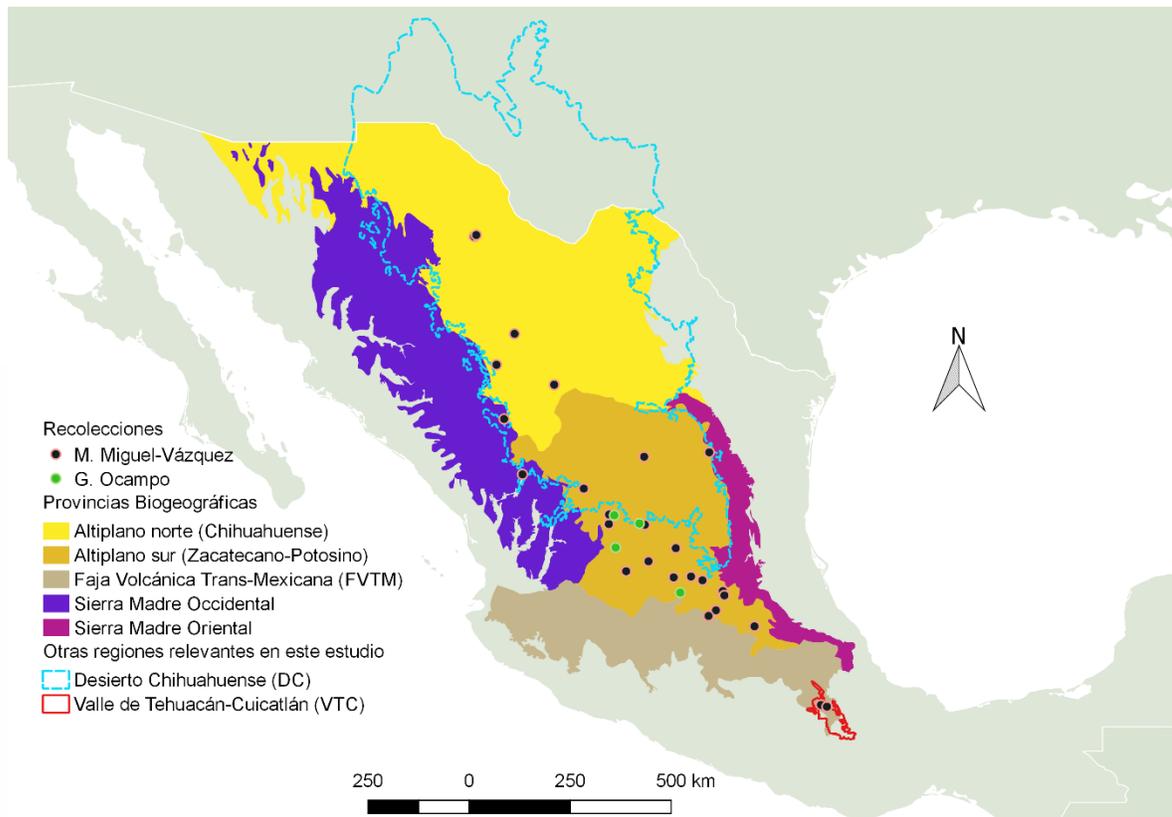


Figura 6. Sitios donde se recolectaron muestras y ejemplares de *T. frutescens*. Sombreado en diferente color las provincias biogeográficas (CONABIO, 1997) y se delimitan otras regiones relevantes para este estudio.

Otro aspecto interesante que se observó fue la variación en la coloración de las flores de algunas poblaciones de la zona noroeste del país, específicamente las de Durango. Las flores de las poblaciones muestreadas en los municipios de Mezquital y Nuevo Ideal presentaban coloración rosa (Figura 7F), mientras que las que fue posible observar en el resto de los estados eran amarillas. No solo la coloración de las flores de dichas poblaciones difería, también el tamaño de los frutos, los cuales eran más pequeños, así como la superficie de los entrenudos apicales caulinares y de las ramas de las inflorescencias, las cuales tenían consistencia pegajosa (Figura 7G); esta última característica de la superficie de tallos y ramas, también se observó en otras poblaciones en las que no fue posible observar flores abiertas ni su color.

Las observaciones antes mencionadas fueron publicadas en un artículo de divulgación científica (Anexo D).

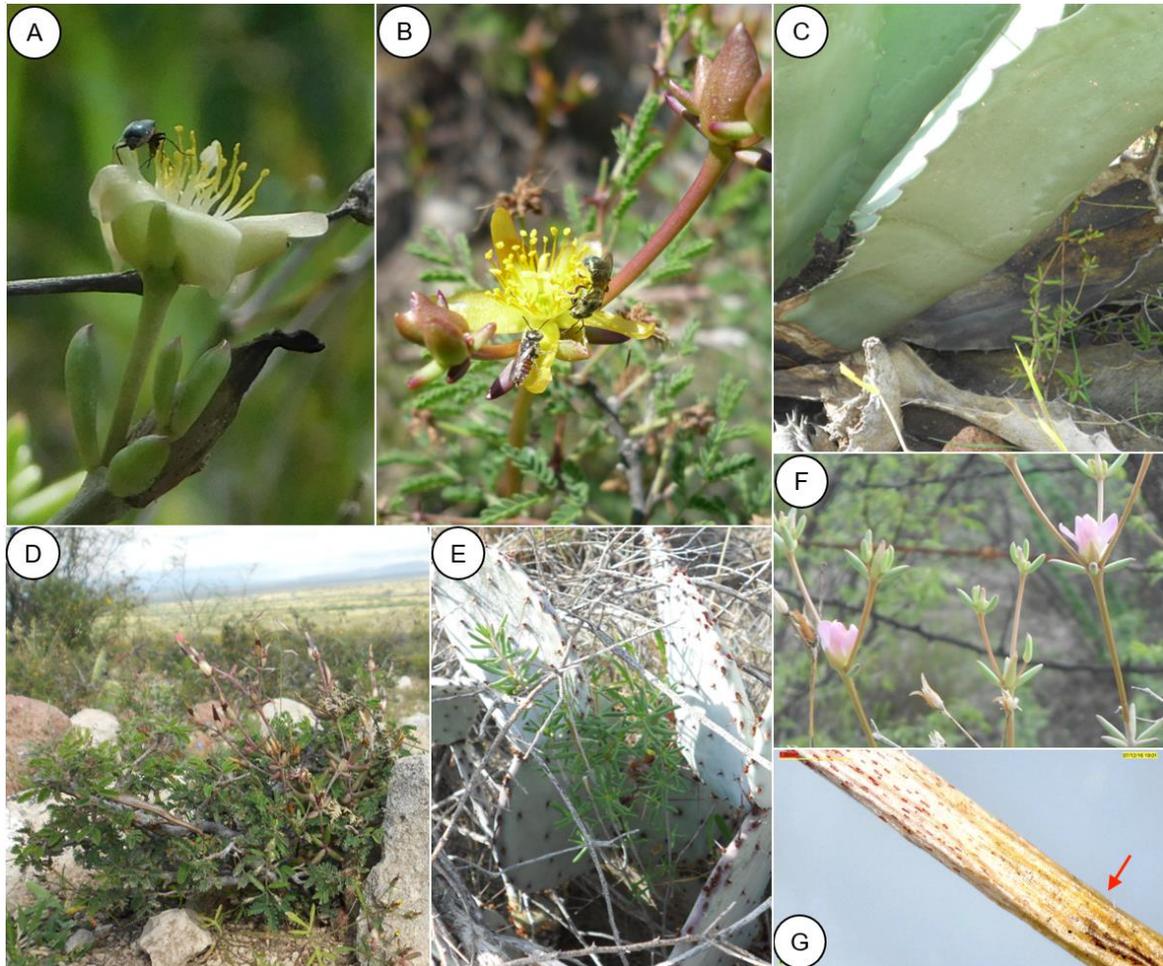


Figura 7. Asociaciones y características relevantes de *Talinopsis frutescens*. A-B) Flores con insectos visitantes; *T. frutescens* con otras plantas: C) *Agave salmiana*, D) *Calliandra eriophylla*, E) *Opuntia* sp.; F) Flores rosas de la población de Mezquital, Durango; G) Acercamiento a un tallo con consistencia pegajosa.

### Análisis moleculares

#### Extracción de ADN

Se extrajo ADN de 210 individuos, correspondientes a siete individuos provenientes de 30 poblaciones. La extracción de ADN de algunas de estas muestras se hizo con el kit de extracción Jena Bioscience y la mayoría restante con el método modificado de CTAB 2X. Debido a dificultades en la extracción y

amplificación que a continuación se detallarán, el número de poblaciones empleadas en este proyecto se redujo a 21, con dos a siete individuos por población.

El proceso de estandarización de los protocolos tanto de extracción como de amplificación comprendió varias modificaciones para la obtención de ADN y productos de PCR de buena calidad. Primero, la extracción de ADN se llevó a cabo con el kit Jena Bioscience, confiando en que el ADN que se obtendría contendría la concentración suficiente (mínimo 5 ng/μL) para llevar a cabo los PCR y que estaría limpio de sustancias que pudieran inhibir la función de la Taq polimerasa. Sin embargo, los resultados no fueron los esperados y después de hacer varias modificaciones al protocolo de extracción (Anexo A) y no obtener resultados, se optó realizar las extracciones con el método modificado de CTAB 2X.

Se emplearon varios protocolos, como el modificado por L. M. Prince (inédito), el cual había sido efectivo en la obtención de ADN de especies de *Portulaca* (Portulacaceae) y para algunos ejemplares de *T. frutescens*; sin embargo, al cuantificar el ADN obtenido, los valores de absorbancia 260/280 variaban mucho (0.9 a 3.7). Incluso, hubo casos en que las muestras presentaban valores de absorbancia óptimos (1.8) y sin embargo no se obtenían resultados al intentar amplificarlas. La situación fue similar con la concentración de las muestras, las cuales iban desde 38 hasta 1580 ng/μl, por lo que se hicieron diversas modificaciones al protocolo, como fueron múltiples lavados, uso de RNAsa, Proteinasa, PVP (polivinilpirrolidona), Viscozyme L y periodos de precipitación de al menos 12 horas. También se probó el protocolo modificado por Cota-Sánchez (2006) para plantas con alto contenido de mucílago, entre otros; sin embargo, en la mayoría de los casos, la calidad del ADN obtenido no mejoraba.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos con todos los protocolos empleados, se retomó el modificado por L. M. Prince, y se emplearon tiempos de precipitación de al menos 12 horas; con este protocolo se procesaron todas las muestras ya que fue el más eficaz.

### **Selección de marcadores moleculares y amplificación de las regiones de interés**

Como resultado de la revisión de literatura realizada, se seleccionaron tres marcadores de núcleo (G3PDH, ITS y Tpi) y siete de cloroplasto (intrón *rpL16*; espaciadores intergénicos *ndhF-rpL32*, *petL-psbE*, *psbJ-petA*, *rpL32-trnL*, *trnL-trnF* y *trnS-trnG-trnG*) (Cuadro 1). Se hicieron pruebas para optimizar la concentración y volumen de ADN a incluir en las reacciones de PCR, para lo cual se realizaron PCR empleando diferentes concentraciones, variando desde 10 hasta 100 ng/μl. La concentración de 40 ng/μl tuvo mayor eficacia para amplificar las regiones de interés, en tanto que los volúmenes de ADN por reacción que mayor eficacia mostraron fueron el de 1 y 2 μl. Se estandarizaron las temperaturas de alineamiento para adaptarlos al grupo de estudio, usando gradientes que oscilaran dentro del rango sugerido en el protocolo de la publicación original de los oligos (Anexo E). También se probaron diferentes concentraciones de cada uno de los reactivos para optimizar las reacciones de PCR. El Dimetilsulfóxido (DMSO) y la albúmina de suero bovino (BSA) resultaron indispensables para lograr la amplificación de las regiones (Anexo F).

El primer filtro para descartar marcadores fue la facilidad para amplificar cada una de las regiones, siendo los marcadores Tpi, *ndhF-rpL32*, *rpL32-trnL* los descartados desde el inicio debido a que, a pesar de haber hecho numerosas modificaciones a los protocolos, no se lograron amplificar. Los marcadores que mostraron mayor eficacia para amplificar fueron G3PDH, ITS, *petL-psbE* y el intrón *rpL16*. Sin embargo, al procesar más muestras, para G3PDH no hubo éxito en la mayoría de los casos y para *petL-psbE* se tuvieron problemas de dobles bandas y poca eficacia de amplificación, por lo que ambos marcadores se descartaron.

Durante la estancia realizada de julio-agosto de 2019, en la Iowa State University (E.U.A.) se probaron los marcadores *psbJ-petA*, *trnL-trnF* y *trnS-trnG-trnG*. Se obtuvo buena eficacia de amplificación, pero la calidad de las secuencias de la región de *trnL-trnF* fue mala, por lo que se descartó este marcador. Se obtuvieron secuencias de buena calidad para las otras dos regiones, aunque al tratarse de fragmentos de más de 1000 pares de bases (pb), a partir de las 700 pb la calidad disminuía y la mayoría de las secuencias *forward* y *reverse* no alcanzaban

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

a empalmarse; no obstante, las secuencias mostraron buen porcentaje de variación y se decidió trabajar con el marcador *psbJ-petA*. Los oligos con los que se contaba para amplificar dicha región en las instalaciones de la UAA no dieron resultados favorables, por lo que se decidió volver a solicitarlos junto con los de la región *trnS-trnG*; esta última, a diferencia de la región *trnS-trnG-trnG* que se había probado previamente, únicamente incluye un espaciador intergénico, con una longitud aproximada de 780 pb. Se probaron ambos pares de oligos correspondientes a los dos marcadores antes mencionados y se encontró que la eficacia de amplificación fue buena para ambos; sin embargo, permanecía el problema en cuanto a la calidad de las secuencias, ya que ésta decaía considerablemente después de las 700 pb. Tomando en cuenta lo anterior, así como la longitud de las dos regiones a prueba, se optó por trabajar con el espaciador intergénico *trnS-trnG*, ya que la secuenciación recuperaba la mayor parte de la región con buena calidad y el empalme de las secuencias se realizaba de mejor manera.

Se amplificaron todos los marcadores con los que se obtuvieron resultados positivos, empleando al menos cinco muestras, cada una correspondiente a un individuo, provenientes de diferentes poblaciones; los productos fueron enviados a secuenciar y las secuencias obtenidas fueron analizadas para saber el nivel de variación que ofrecía cada uno de los marcadores, dentro y entre poblaciones.

Tomando en cuenta la facilidad con que cada una de las regiones amplificó, la calidad de las secuencias y la variación que éstas mostraban, se seleccionaron un marcador de núcleo (ITS) y dos de cloroplasto (intrón *rpL16* y el espaciador intergénico *trnS-trnG*) para utilizarlos en este estudio. Todas las muestras extraídas se amplificaron empleando las tres regiones antes mencionadas y se enviaron a secuenciar en una dirección (Cuadro 1).

Cuadro 1. Oligos probados en el proyecto. En negritas se muestran los tres pares de oligos empleados para obtener los productos de PCR en este proyecto. Los oligos marcados con un asterisco (\*) al inicio, se utilizaron para secuenciar en una sola dirección el marcador molecular indicado.

| Marcador              | Genoma de origen | Longitud +/- (pb) | Nombre del oligo              | Secuencia del oligo              | Referencia                       |
|-----------------------|------------------|-------------------|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| G3PDH                 | Núcleo           | 200               | GPDX7F                        | GATAGATTTGGAATTGTTGAGG           | Strand <i>et al.</i> , 1997      |
|                       |                  |                   | GPDX9R                        | AAGCAATTCCAGCCTTGG               |                                  |
| ITS (1)               | Núcleo           | 600               | 18SF                          | CGATTGAATGGTCCGGTGAAG            | Prince, 2010                     |
|                       |                  |                   | 26SR                          | AGGACGCTTCTACAGACTACAA           |                                  |
| ITS (2)               | Núcleo           | 600               | <b>ITS-An5</b>                | <b>CCTTATCATTAGAGGAAGGAG</b>     | <b>Cheng <i>et al.</i>, 2016</b> |
|                       |                  |                   | <b>*ITS-An4</b>               | <b>CCGCTTATTGATATGCTTAAA</b>     |                                  |
| Tpi                   | Núcleo           | 1200              | TPI-F                         | ATGGSCMGWAAGTTCTTCG              |                                  |
|                       |                  |                   | 855R                          | GACAACCAAATTACATAACTC            |                                  |
| intrón <i>rpl16</i>   | Cloroplasto      | 939               | <b>*rpL16F71</b>              | <b>GCTATGCTTAGTGTGTGACTCGTTG</b> | <b>Shaw <i>et al.</i>, 2005</b>  |
|                       |                  |                   | <b>rpL161516</b>              | <b>CCCTTCATTCTTCTCTATGTTG</b>    |                                  |
| <i>ndhF-rpL32</i>     | Cloroplasto      | 959               | ndhF                          | GAAAGGTATKATCCAYGMATATT          | Shaw <i>et al.</i> , 2007        |
|                       |                  |                   | rpL32-R                       | CCAATATCCCTTYTTTTCCAA            |                                  |
| <i>petL-psbE</i>      | Cloroplasto      | 1109              | petL                          | AGTAGAAAACCGAAATAACTAGTTA        | Shaw <i>et al.</i> , 2007        |
|                       |                  |                   | psbE                          | TATCGAATACTGGTAATAATATCAGC       |                                  |
| <i>psbJ-petA</i>      | Cloroplasto      | 1040              | psbJ                          | ATAGGTA CTGTARCYGGTATT           | Shaw <i>et al.</i> , 2007        |
|                       |                  |                   | petA                          | AACARTTYGARAAGGTTCAATT           |                                  |
| <i>rpL32-trnL</i>     | Cloroplasto      | 1018              | trnL(UAG)                     | CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT             | Shaw <i>et al.</i> , 2007        |
|                       |                  |                   | rpL32-F                       | CAGTTCCAAAAAACGTA CTTC           |                                  |
| <i>trnL-trnF</i>      | Cloroplasto      | 1000              | C                             | CGAAATCGGTAGACGCTACG             | Taberlet <i>et al.</i> , 1991    |
|                       |                  |                   | F                             | ATTTGAACTGGTGACACGAG             |                                  |
| <i>trnS-trnG-trnG</i> | Cloroplasto      | 1472              | trnG <sup>(UUC)*</sup>        | GAATCGAACCCGCATCGTTAG            | Shaw <i>et al.</i> , 2007        |
|                       |                  |                   | trnS <sup>(GCU)*</sup>        | AACTCGTACAACGGATTAGCAATC         |                                  |
| trnS-trnG             | Cloroplasto      | 780               | <b>trnG2S</b>                 | <b>TTTTACCACTAACTATAACCCGC</b>   | <b>Shaw <i>et al.</i>, 2005</b>  |
|                       |                  |                   | <b>*trnS<sup>(GCU)*</sup></b> | <b>AACTCGTACAACGGATTAGCAATC</b>  | <b>Shaw <i>et al.</i>, 2007</b>  |

### **Análisis filogenéticos**

La matriz empleada para los análisis de la región de núcleo incluye 130 secuencias y tiene una longitud de 396 pb, mientras que la matriz combinada que incluye los dos marcadores de cloroplasto está compuesta por 86 secuencias y tiene una longitud de 523 pb (Anexo G). Para los análisis hechos con RaxML se utilizó el mismo modelo de evolución (GTR) para ambas matrices. Para los análisis hechos en IQ-TREE y por el método de inferencia Bayesiana, se empleó el modelo de evolución estimado para cada una de las regiones, incluso en la matriz combinada con los dos marcadores de cloroplasto; para ITS y para el espaciador intergénico *trnS-trnG* se empleó GTR+G y para el intrón *rpL16* se usó F81+G. A manera comparativa, también se hicieron inferencias filogenéticas empleando ambos métodos y utilizando una matriz combinada que incluye el marcador de núcleo y los dos marcadores de cloroplasto. A pesar de haber secuenciado al menos siete individuos por población, muchas de las secuencias obtenidas no contaban con buena calidad o no estaban completas, por lo que se recortaron hasta el punto de conservar solo los fragmentos con buena calidad y se descartaron aquellas secuencias que no tuvieran la extensión completa del fragmento a emplear. Por lo anterior, se redujo el número de secuencias que se emplearon en este estudio, así como también se disminuyó la extensión de los fragmentos con el objeto de que todas las muestras tuvieran la misma longitud en pb.

La monofilia de la especie estuvo apoyada empleando ambos métodos, los diferentes programas y los diferentes marcadores (Bootstrap  $\geq 80\%$ , SH\_aLRT  $> 80\%$ , UF\_Boot  $> 95\%$  y probabilidades posteriores  $\geq 0.95$ ). Sin embargo, a nivel infraespecífico no se observaron agrupamientos bien definidos de los individuos empleados por poblaciones o por provincias biogeográficas y en la mayoría de los clados no se obtuvieron valores de apoyo altos. Cabe resaltar que uno de los pocos clados que se recuperó en varias de las filogenias es el conformado por las poblaciones localizadas en el VTC (Fig. 8-13).

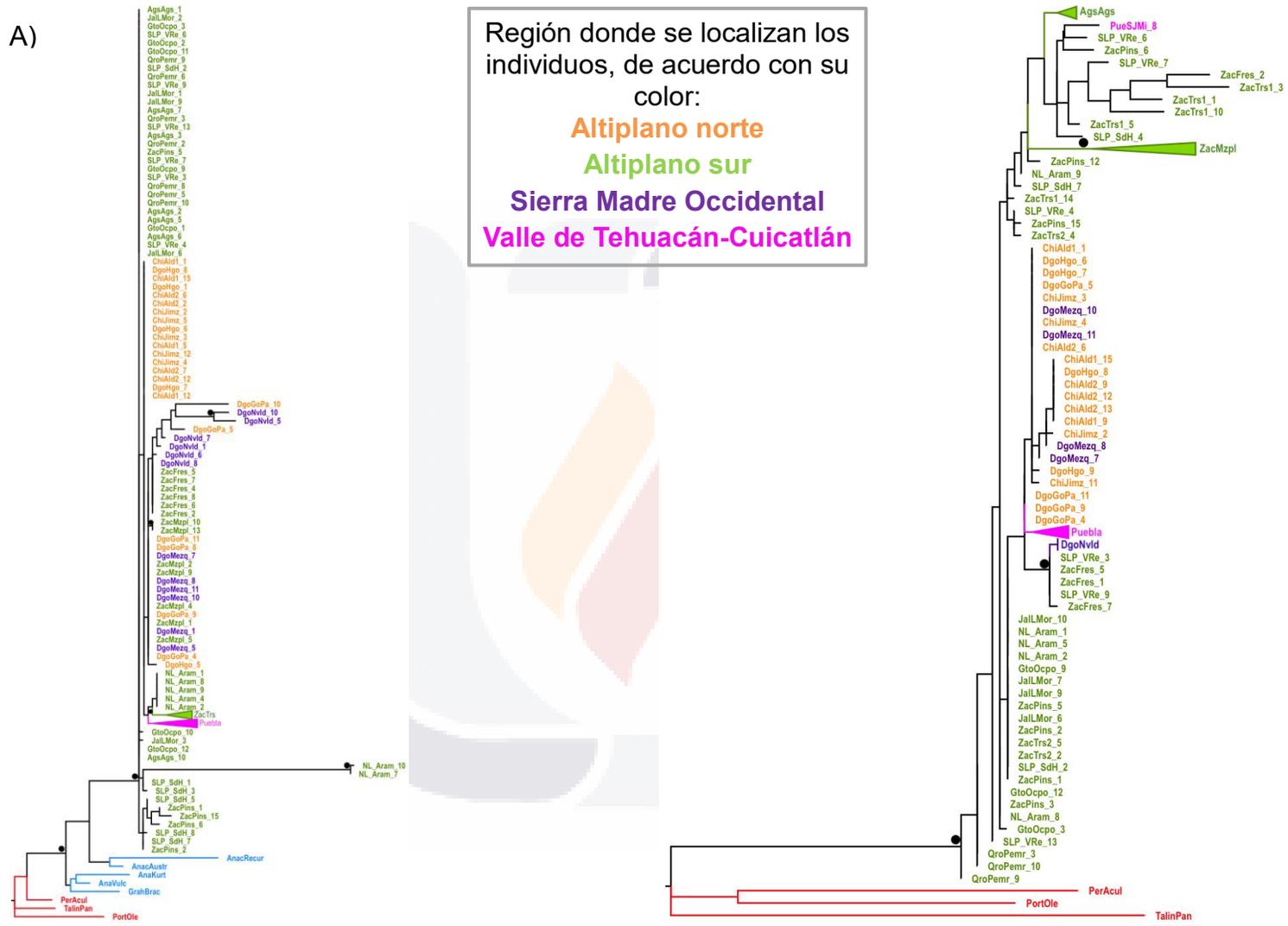


Figura 8. Filogenias obtenidas por el método de máxima verosimilitud con el programa IQ-TREE para la región de núcleo y las de cloroplasto. A) ITS; B) intrón *rpL16*, *trnS-trnG*. En rojo se indican los grupos externos y en azul los individuos del resto de géneros de Anacampserotaceae. Los puntos negros en los nodos indican valores de SH\_aLRT y UF\_Boot  $\geq 80\%$  y  $95\%$ , respectivamente.



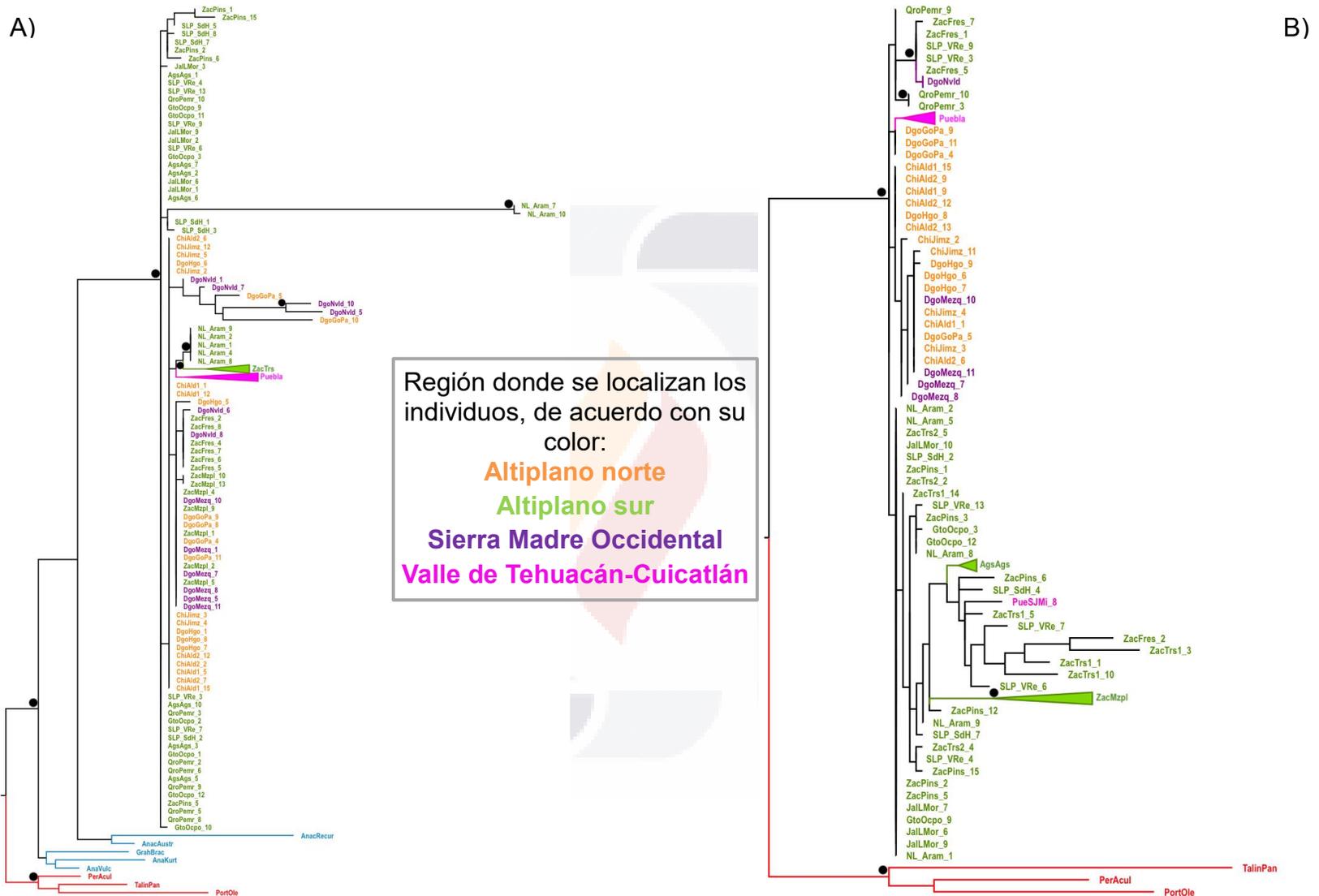
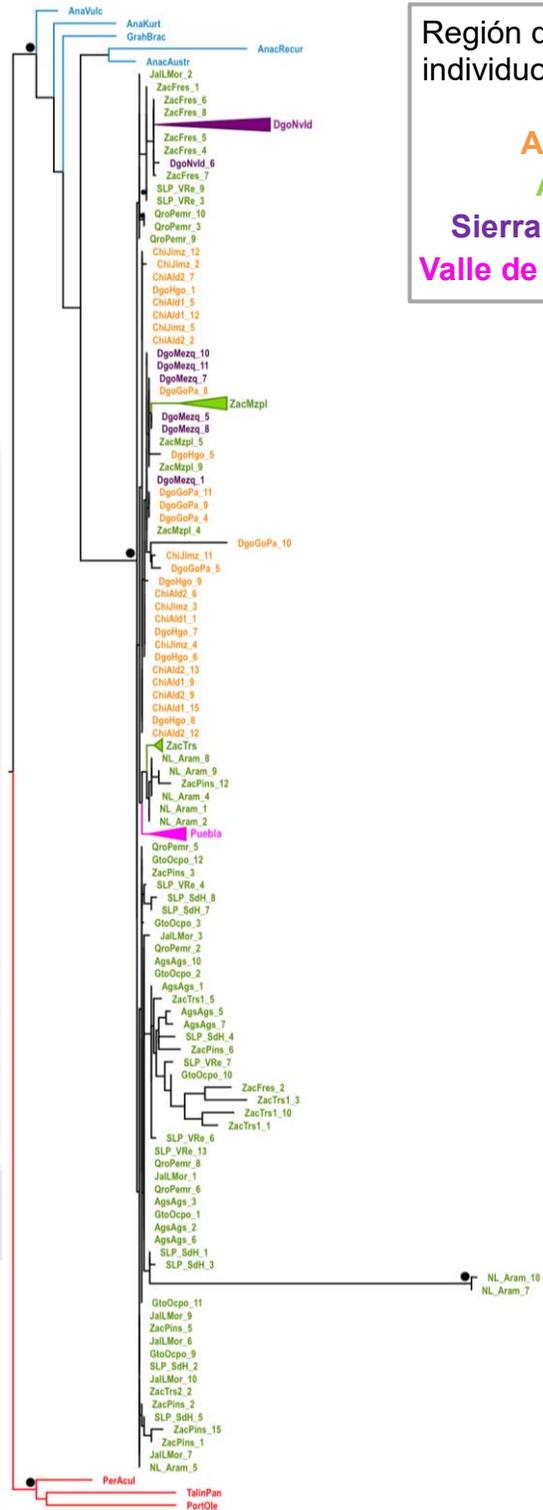


Figura 10. Filogenias obtenidas por el método de máxima verosimilitud con el programa RaxML para la región de núcleo y las de cloroplasto. A) ITS; B) intrón *rpL16*, *trnS-trnG*. En rojo se indican los grupos externos y en azul los individuos del resto de géneros de Anacampserotaceae. Los puntos negros indican valores de Bootstrap  $\geq 80\%$ .



Región donde se localizan los individuos, de acuerdo con su color:  
**Altiplano norte**  
**Altiplano sur**  
**Sierra Madre Occidental**  
**Valle de Tehuacán-Cuicatlán**

Figura 11. Filogenia obtenida por el método de máxima verosimilitud con el programa RaxML, utilizando una matriz combinada que incluye los tres marcadores empleados (ITS, intrón *rpL16*, *trnS-trnG*). En rojo se indican los grupos externos y en azul los individuos del resto de géneros de Anacampserotaceae. Los puntos negros indican valores de Bootstrap  $\geq 80\%$ .

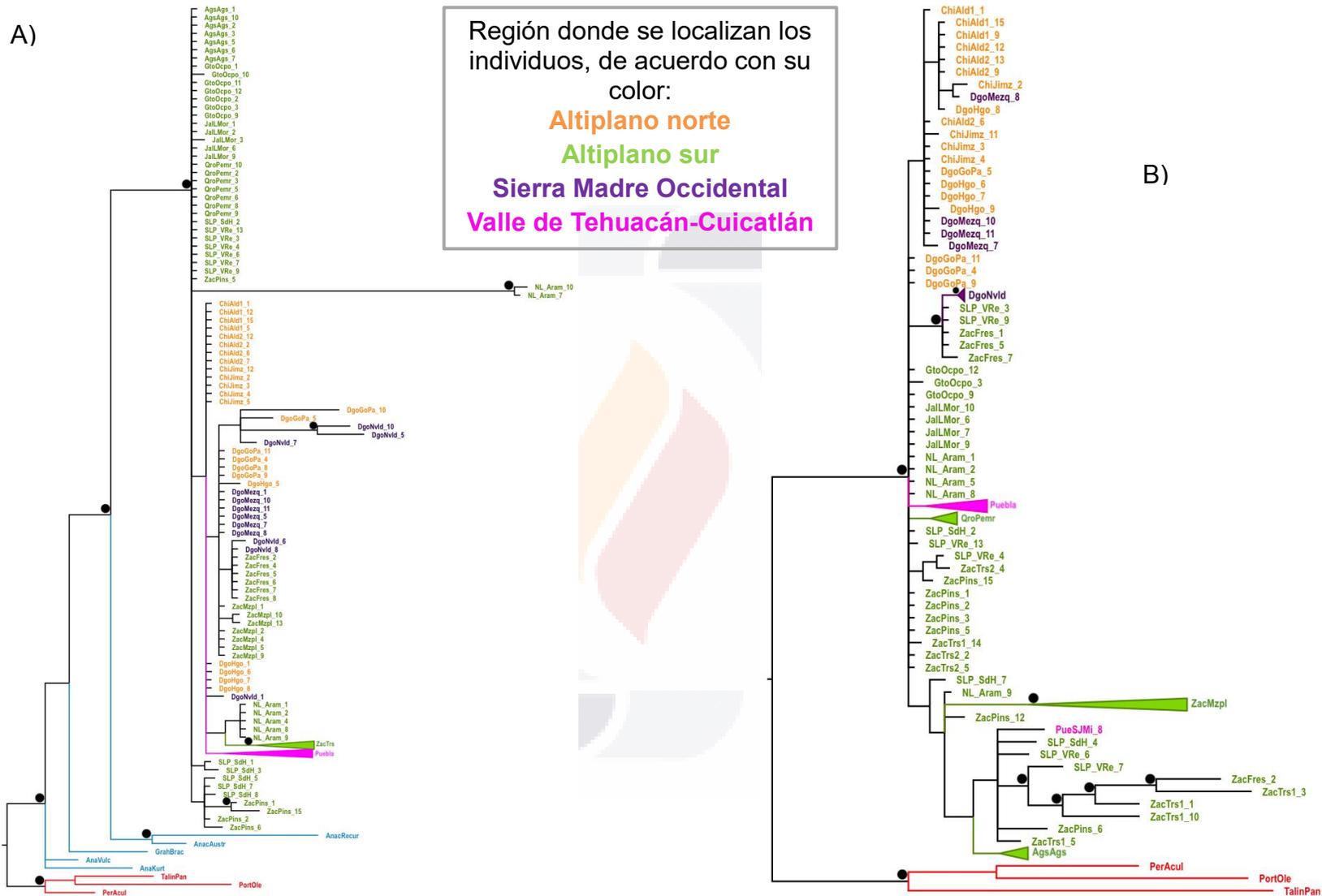
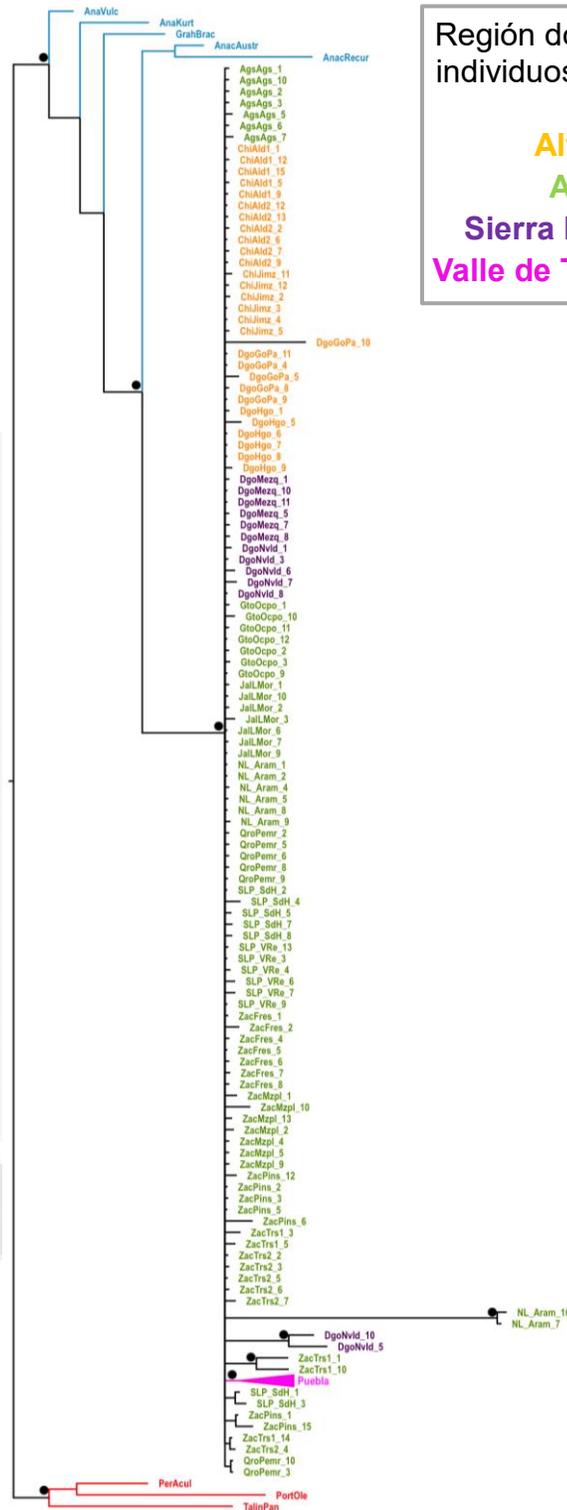


Figura 12. Filogenias obtenidas por el método de inferencia Bayesiana para el marcador de núcleo y para los de cloroplasto. A) ITS; B) intrón *rpl16*, *trnS-trnG*. En rojo se indican los grupos externos y en azul los individuos del resto de géneros de Anacampserotaceae. Los puntos negros en los nodos indican probabilidades posteriores >0.95.



Región donde se localizan los individuos, de acuerdo con su color:

- Altiplano norte
- Altiplano sur
- Sierra Madre Occidental
- Valle de Tehuacán-Cuicatlán

Figura 13. Filogenia obtenida por el método de inferencia Bayesiana utilizando una matriz combinada que incluye los tres marcadores empleados (ITS, intrón *rpL16*, *trnS-trnG*). En rojo se indican los grupos externos y en azul los individuos del resto de géneros de Anacampserotaceae. Los puntos negros en los nodos indican probabilidades posteriores  $\geq 0.95$ .

### **Redes de haplotipos y diversidad genética poblacional**

Se obtuvieron dos redes de haplotipos, una empleando las secuencias de ADN de núcleo y la otra empleando las secuencias de ADN de cloroplasto (Anexo G).

Para la región de núcleo se encontraron 36 haplotipos de las 122 secuencias analizadas. El haplotipo más frecuente fue el H1, presente en siete poblaciones localizadas en el Altiplano Sur, mientras que el segundo haplotipo más frecuente es el H2, presente en cuatro poblaciones localizadas en el Altiplano norte. Los haplotipos encontrados en las poblaciones localizadas en el VTC no se comparten con ninguna otra población. De los 36 haplotipos, 27 fueron haplotipos únicos (Figs. 14 y 15).

Para los marcadores de cloroplasto, se encontraron un total de 44 haplotipos en 83 secuencias analizadas. El haplotipo más frecuente fue el H13, presente en el Altiplano sur, mientras que el segundo más frecuente fue el haplotipo H3, compartido entre poblaciones localizadas en el Altiplano Norte y la SMO. Los haplotipos encontrados en las dos poblaciones ubicadas en el VTC no se comparten con ninguna de las otras poblaciones. De los 44 haplotipos, 34 resultaron haplotipos únicos (Figs. 16 y 17).

Para los indicadores de variación genética, el valor total de  $H_d$  para ITS fue de 0.88823, el de  $\pi$  de 0.01455, mientras que para las regiones de cloroplasto fue de 0.95239 y 0.01827 respectivamente; los valores para cada una de las poblaciones se pueden consultar en el Cuadro 2.

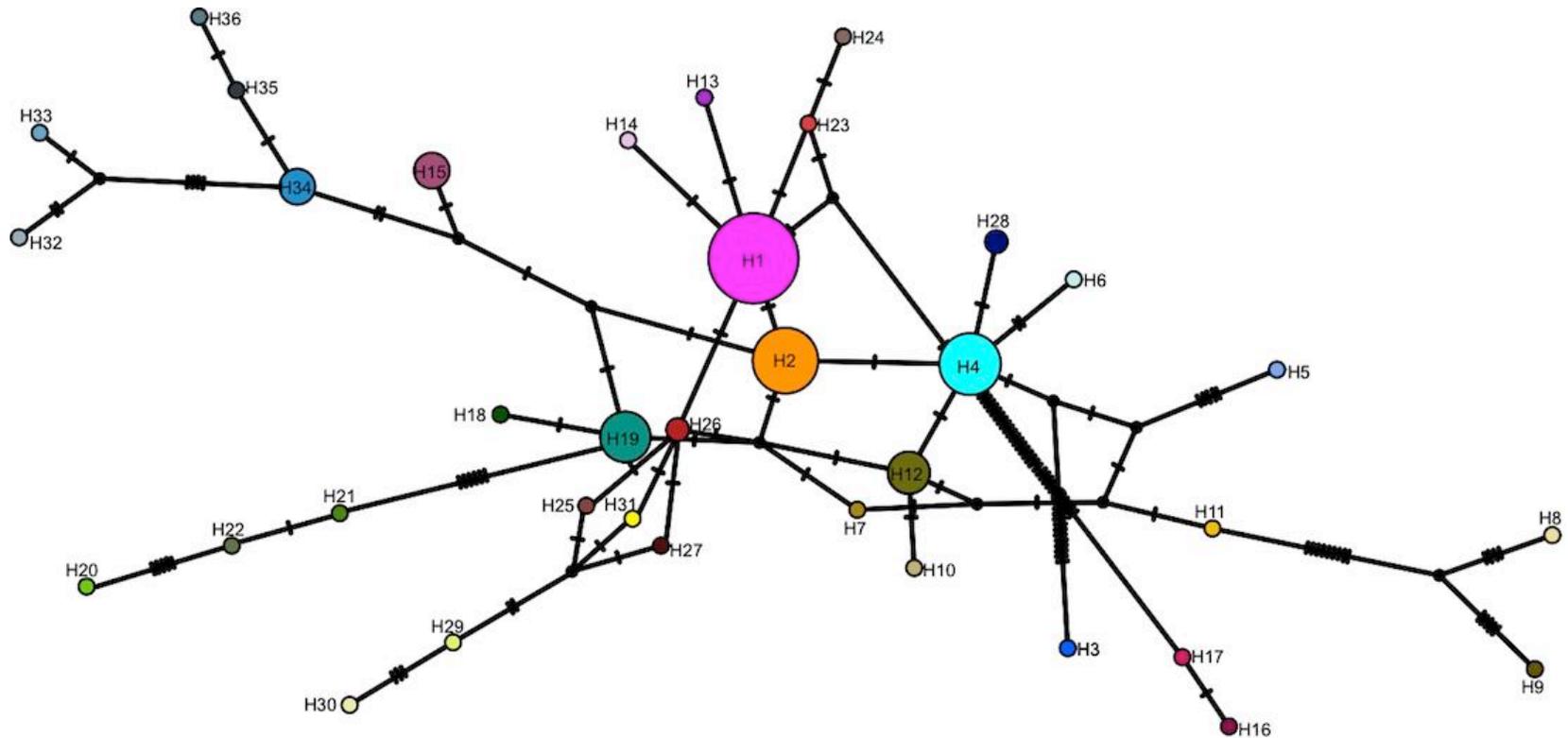


Figura 14. Red de los haplotipos de núcleo elaborada en PopART. Cada círculo representa un haplotipo y el tamaño de estos representa la proporción de dicho haplotipo en las diferentes poblaciones. El código asignado a cada haplotipo está indicado dentro o a un costado de los círculos; las líneas cortas perpendiculares a las líneas conectoras entre haplotipos representan pasos mutacionales.

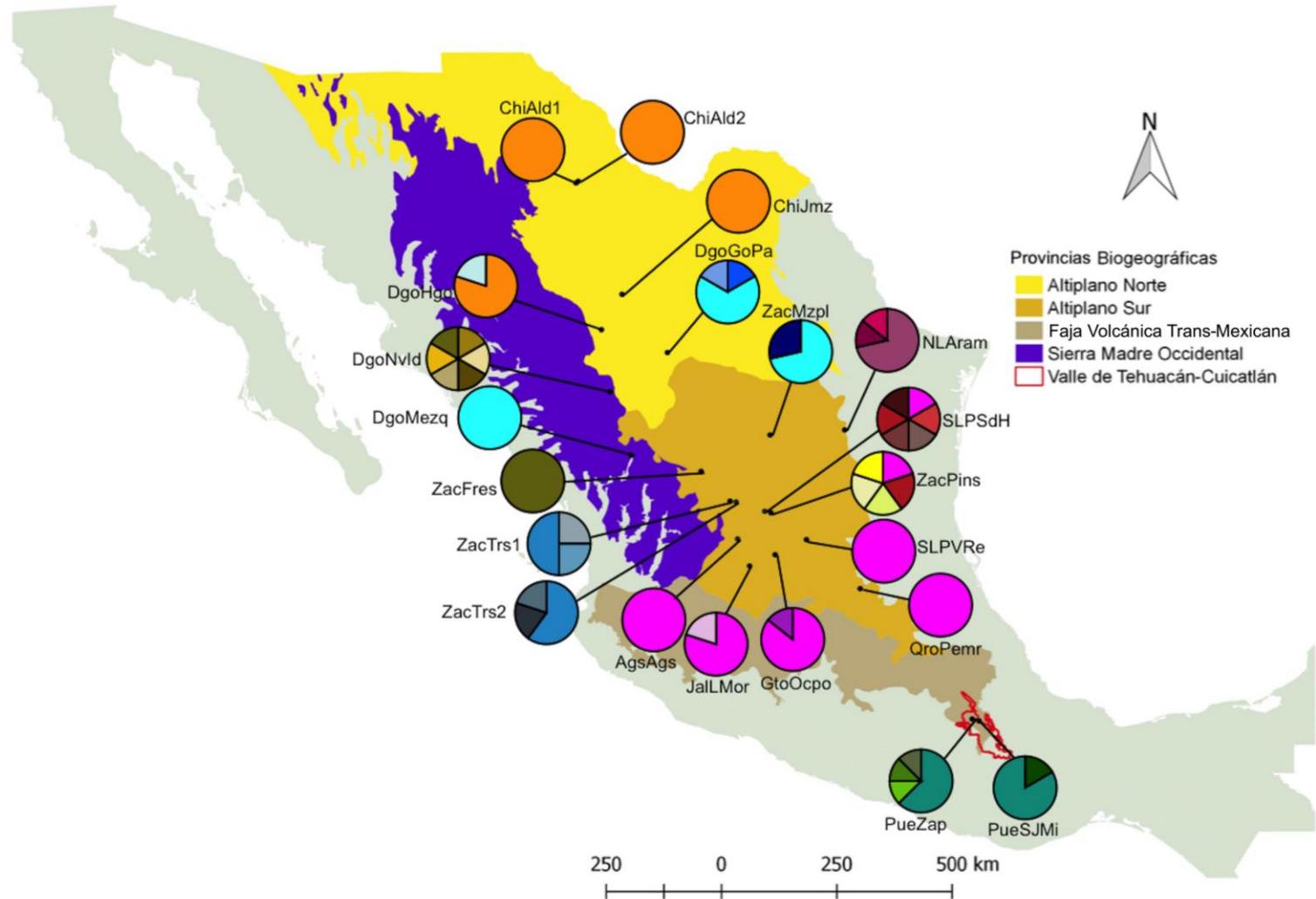


Figura 15. A) Distribución geográfica de los haplotipos de núcleo (ITS) de *Talinopsis frutescens* (ver Tabla 1 para códigos de las poblaciones). Los colores en el mapa delimitan las provincias biogeográficas (CONABIO, 1997) relevantes para este trabajo, así como el área natural protegida del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Los colores en los gráficos de pastel indican la proporción de haplotipos encontrada en cada población.



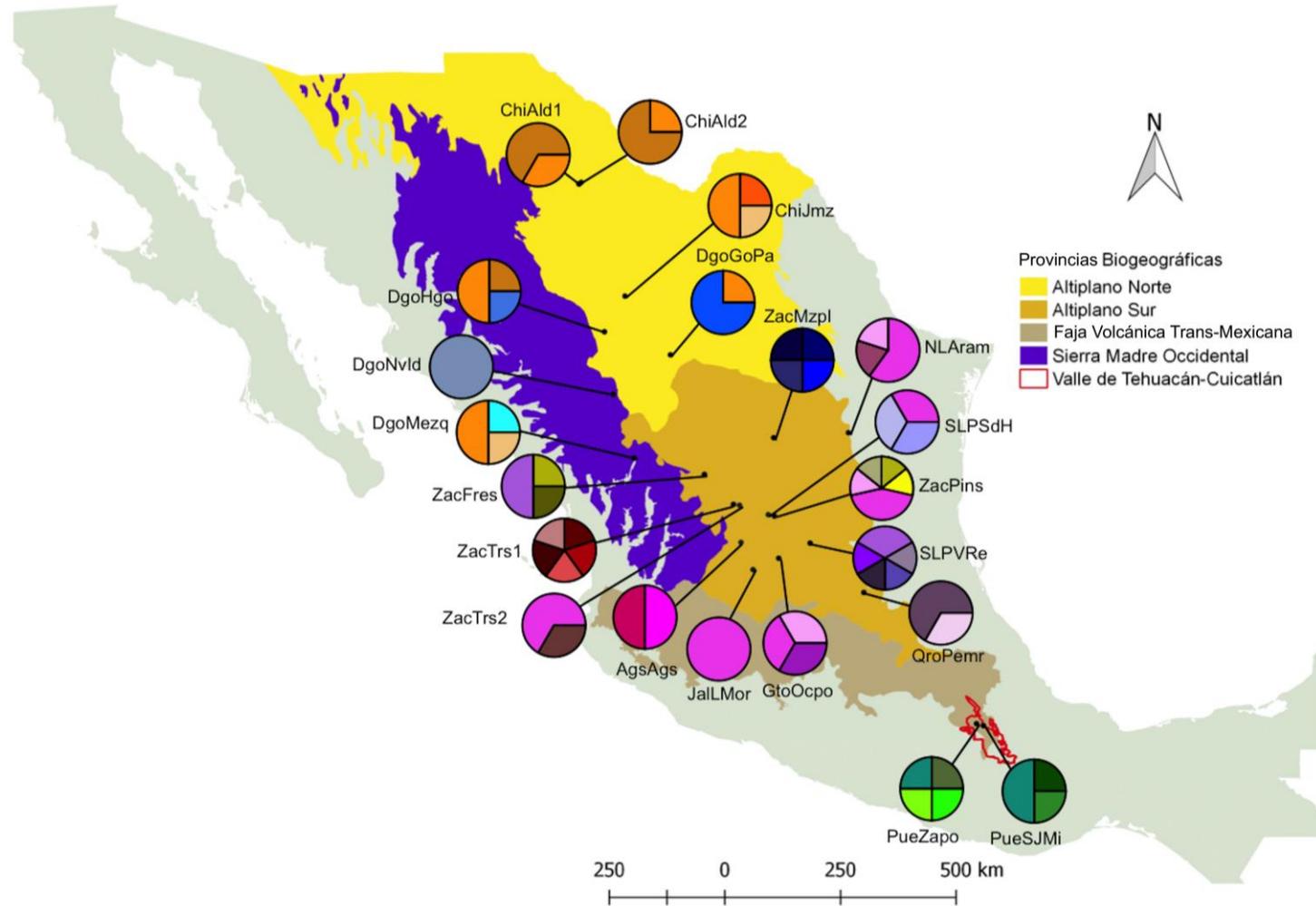
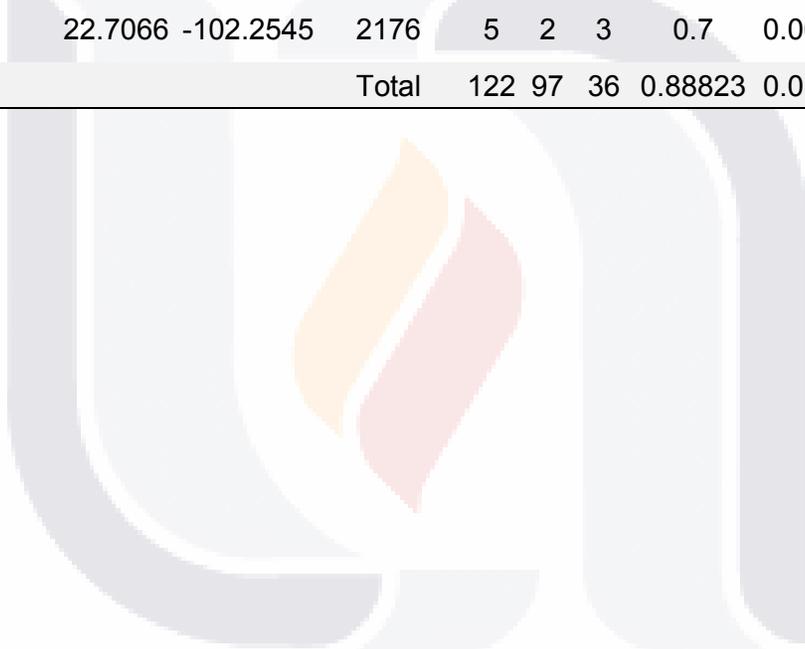


Figura 17. A) Distribución geográfica de los haplotipos de los marcadores de cloroplasto (intrón *rpL16* y espaciador intergénico *trnS-trnG*) de *Talinopsis frutescens* (ver Tabla 1 para códigos de las poblaciones). Los colores en el mapa delimitan las provincias biogeográficas relevantes para este trabajo, así como el área natural protegida del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Los colores en los gráficos de pastel indican la proporción de haplotipos encontrada en cada población.

Cuadro 2. Poblaciones, localidades, coordenadas, número de individuos y haplotipos empleados para la elaboración de las redes de haplotipos e índices poblacionales. *n*: número de secuencias; *S*: número de sitios polimórficos; *h*: número de haplotipos; *Hd*: diversidad haplotípica;  $\pi$ : diversidad nucleotídica.

| Código de la población | Localidad                           | Latitud (N) | Longitud (W) | Altitud (m s.n.m.) | Núcleo   |          |          |           |         | Cloroplasto |          |          |           |         |         |
|------------------------|-------------------------------------|-------------|--------------|--------------------|----------|----------|----------|-----------|---------|-------------|----------|----------|-----------|---------|---------|
|                        |                                     |             |              |                    | <i>n</i> | <i>S</i> | <i>h</i> | <i>Hd</i> | $\pi$   | <i>n</i>    | <i>S</i> | <i>h</i> | <i>Hd</i> | $\pi$   |         |
| AgsAgs                 | Aguascalientes, Aguascalientes      | 21.9614     | -102.2242    | 2175               | 7        | 0        | 1        | 0         | 0       | 0           | 2        | 5        | 2         | 1       | 0.01089 |
| ChiAld1                | Aldama, Chihuahua                   | 29.149      | -105.487     | 1365               | 4        | 0        | 1        | 0         | 0       | 0           | 3        | 1        | 2         | 0.66667 | 0.00145 |
| ChiAld2                | Aldama, Chihuahua                   | 29.183      | -105.4419    | 1447               | 4        | 0        | 1        | 0         | 0       | 0           | 4        | 1        | 2         | 0.5     | 0.00109 |
| ChiJimz                | Jiménez, Chihuahua                  | 26.9012     | -104.5585    | 1385               | 5        | 0        | 1        | 0         | 0       | 0           | 4        | 3        | 3         | 0.83333 | 0.00327 |
| DgoGoPa                | Gómez Palacio, Durango              | 25.7244     | -103.6423    | 1206               | 6        | 19       | 3        | 0.6       | 0.01844 | 0           | 4        | 1        | 2         | 0.5     | 0.00109 |
| DgoHgo                 | Hidalgo, Durango                    | 26.1862     | -104.9746    | 1772               | 5        | 3        | 2        | 0.4       | 0.00319 | 0           | 4        | 2        | 3         | 0.83333 | 0.00218 |
| DgoMezq                | Mezquital, Durango                  | 23.4867     | -104.3758    | 1609               | 6        | 0        | 1        | 0         | 0       | 0           | 4        | 2        | 3         | 0.83333 | 0.00254 |
| DgoNvld                | Nuevo Ideal, Durango                | 24.9321     | -104.7998    | 2115               | 6        | 24       | 6        | 1         | 0.02855 | 0           | 3        | 0        | 1         | 0       | 0       |
| GtoOcpo                | Ocampo, Guanajuato                  | 21.6437     | -101.4660    | 2226               | 7        | 1        | 2        | 0.28571   | 0.00076 | 0           | 3        | 2        | 3         | 1       | 0.00290 |
| JalLMor                | Lagos de Moreno, Jalisco            | 21.41586    | -101.9817    | 1984               | 5        | 1        | 2        | 0.4       | 0.00106 | 0           | 4        | 0        | 1         | 0       | 0       |
| NLAram                 | Aramberri, Nuevo León               | 24.1627     | -100.0624    | 1586               | 7        | 47       | 3        | 0.52381   | 0.05902 | 0           | 5        | 4        | 3         | 0.7     | 0.00392 |
| PueSJM                 | San José Miahuatlán, Puebla         | 18.2945     | -97.3451     | 1233               | 6        | 1        | 2        | 0.33333   | 0.00089 | 0           | 4        | 8        | 3         | 0.83333 | 0.00908 |
| PueZap                 | Zapotitlán, Puebla                  | 18.3265     | -97.4840     | 1545               | 8        | 10       | 4        | 0.64286   | 0.01111 | 0           | 4        | 7        | 4         | 1       | 0.00835 |
| QroPemr                | Peñamiller, Querétaro               | 20.9578     | -99.7492     | 1467               | 7        | 0        | 1        | 0         | 0       | 0           | 3        | 2        | 2         | 0.66667 | 0.00290 |
| SLPSdH                 | Salinas de Hidalgo, San Luis Potosí | 22.5187     | -101.6762    | 2748               | 6        | 5        | 6        | 1         | 0.00567 | 0           | 3        | 11       | 3         | 1       | 0.01598 |

|         |                                    |         |           |       |     |    |    |          |         |    |    |    |          |         |
|---------|------------------------------------|---------|-----------|-------|-----|----|----|----------|---------|----|----|----|----------|---------|
| SLPVRe  | Villa de Reyes, San<br>Luís Potosí | 21.9472 | -100.835  | 1819  | 6   | 0  | 1  | 0        | 0       | 6  | 19 | 5  | 0.933333 | 0.01917 |
| ZacFres | Fresnillo, Zacatecas               | 23.3245 | -102.9601 | 2064  | 6   | 0  | 1  | 0        | 0       | 4  | 25 | 3  | 0.833333 | 0.02723 |
| ZacMzpl | Mazapil, Zacatecas                 | 24.0608 | -101.5671 | 2019  | 7   | 1  | 2  | 0.47619  | 0.00127 | 4  | 24 | 4  | 1        | 0.02869 |
| ZacPins | Pinos, Zacatecas                   | 22.4884 | -101.5508 | 2175  | 5   | 8  | 5  | 1        | 0.01064 | 7  | 16 | 5  | 0.85714  | 0.01224 |
| ZacTrs1 | Trancoso,<br>Zacatecas             | 22.7244 | -102.3754 | 2242  | 4   | 7  | 3  | 0.833333 | 0.01108 | 5  | 41 | 5  | 1        | 0.04423 |
| ZacTrs2 | Trancoso,<br>Zacatecas             | 22.7066 | -102.2545 | 2176  | 5   | 2  | 3  | 0.7      | 0.00266 | 3  | 2  | 2  | 0.66667  | 0.0029  |
|         |                                    |         |           | Total | 122 | 97 | 36 | 0.88823  | 0.01455 | 83 | 66 | 44 | 0.95239  | 0.01827 |



**AMOVA**

El mayor porcentaje de variación fue explicado de mejor manera cuando no se hizo ninguna agrupación con las poblaciones. De igual forma, se obtuvo un valor considerablemente alto de estructura genética tanto para la región de núcleo ( $F_{ST}= 0.59980$ ), como para las de cloroplasto ( $F_{ST}= 0.68333$ ) (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resultados del análisis de varianza molecular (AMOVA) de las poblaciones de *Talinopsis frutescens*. a) Sin grupos definidos previamente; b) dos grupos (Altiplano Norte y Sur + Sierra Madre Occidental vs. Valle de Tehuacán-Cuicatlán); c) cuatro grupos (Altiplano Norte, Altiplano Sur, Sierra Madre Occidental y Valle de Tehuacán Cuicatlán). *gl*= grados de libertad,  $F_{ST}$ = índice de diferenciación entre poblaciones,  $F_{CT}$ = índice de diferenciación entre grupos,  $F_{SC}$ = índice de diferenciación entre poblaciones dentro de grupos; \* $p < 0.01$ , \*\* $p < 0.001$ , \*\*\* $p < 0.0001$ .

|                                        | ITS       |                   |                   |       |                            | Cloroplasto (intrón <i>rpL16</i> + <i>trnS-trnG</i> ) |                   |                   |         |                        |
|----------------------------------------|-----------|-------------------|-------------------|-------|----------------------------|-------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|---------|------------------------|
|                                        | <i>gl</i> | Suma de cuadrados | Varianza estimada | %     | Índice de fijación         | <i>gl</i>                                             | Suma de cuadrados | Varianza estimada | %       | Índice de fijación     |
| a) Sin grupos                          |           |                   |                   |       |                            |                                                       |                   |                   |         |                        |
| Entre poblaciones                      | 20        | 327.255           | 2.53042           | 59.98 | $F_{ST}=0.59980^{**}$<br>* | 20                                                    | 506.043           | 5.74947           | 68.33   | $F_{ST}=0.68333^{***}$ |
| Dentro de las poblaciones              | 101       | 170.524           | 1.68835           | 40.02 |                            | 62                                                    | 165.198           | 2.66448           | 31.67   |                        |
| Total                                  | 121       | 497.779           | 4.21878           |       |                            | 82                                                    | 671.241           | 8.41395           |         |                        |
| b) Dos grupos                          |           |                   |                   |       |                            |                                                       |                   |                   |         |                        |
| Entre grupos                           | 1         | 60.929            | 1.78331           | 31.73 | $F_{CT}=0.31726^*$         | 1                                                     | 35.964            | 0.73964           | 8.20    | $F_{CT}=0.08202$       |
| Entre poblaciones dentro de los grupos | 19        | 266.325           | 2.14931           | 38.24 | $F_{SC}=0.56006^{**}$<br>* | 19                                                    | 470.079           | 5.61368           | 62.25   | $F_{SC}=0.67813^{***}$ |
| Dentro de poblaciones                  | 101       | 170.524           | 1.68835           | 30.04 |                            | $F_{ST}=0.24^{***}$                                   | 62                | 165.198           | 2.66448 |                        |
| Total                                  | 121       | 497.779           | 5.62098           |       |                            | 82                                                    | 671.241           | 9.01780           |         |                        |
| c) Cuatro grupos                       |           |                   |                   |       |                            |                                                       |                   |                   |         |                        |
| Entre grupos                           | 3         | 122.43            | 1.17471           | 25.19 | $F_{CT}=0.25185^{**}$      | 3                                                     | 273.911           | 4.82361           | 46.94   | $F_{CT}=0.46944^{***}$ |
| Entre poblaciones dentro de los grupos | 17        | 204.812           | 1.80119           | 38.62 | $F_{SC}=0.51617^{**}$<br>* | 17                                                    | 232.132           | 2.78712           | 27.12   | $F_{SC}=0.51125^{***}$ |
| Dentro de poblaciones                  | 101       | 170.524           | 1.68835           | 36.20 |                            | $F_{ST}=0.63802^{**}$<br>*                            | 62                | 165.198           | 2.66448 |                        |
| Total                                  | 121       | 497.779           | 4.66426           |       |                            | 82                                                    | 671.241           | 10.27520          |         |                        |

**SAMOVA**

Los valores de  $F_{CT}$  obtenidos fueron significativos para ambos marcadores (Anexo H). El valor más alto antes de alcanzar la asíntota se obtuvo con una  $K$  (número de grupos) = 14 para el marcador de núcleo, mientras que para cloroplasto el mayor valor de  $F_{CT}$  se obtuvo con la  $K = 12$  (Fig. 18). Sin embargo, en ambos casos solo dos de los grupos consistían de más de una población; uno de estos está formado por poblaciones localizadas en el Altiplano norte y el otro por las poblaciones de la parte centro-sur del Altiplano sur (Fig. 19 A-B). Alternativamente para ambos tipos de marcadores, el primer valor más alto de  $F_{CT}$  se obtuvo con una de  $K = 3$ ; dicho valor descendió al incrementar el número de  $K$  a 4 (Fig. 18), propiciando la disolución de la estructura del grupo. Con lo anterior, se formaron grupos de una sola población, fenómeno observado con los subsecuentes valores de  $K$  (5-20) (Fig. 19 C-D).

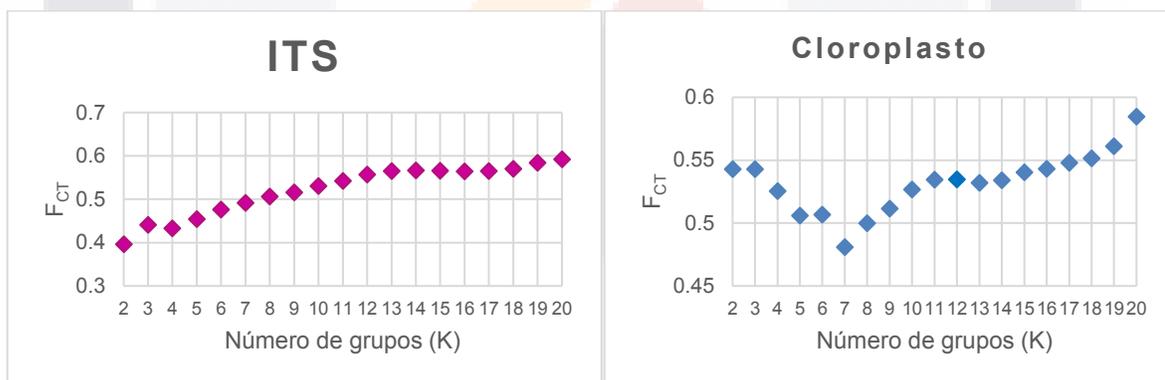


Figura 18. Valores de  $F_{CT}$  obtenidos para cada uno de los  $K$  (agrupaciones) propuestos. En rosa los valores del marcador de núcleo (ITS) y en azul los de cloroplasto (intrón *rpL16*, *trnS-trnG*).

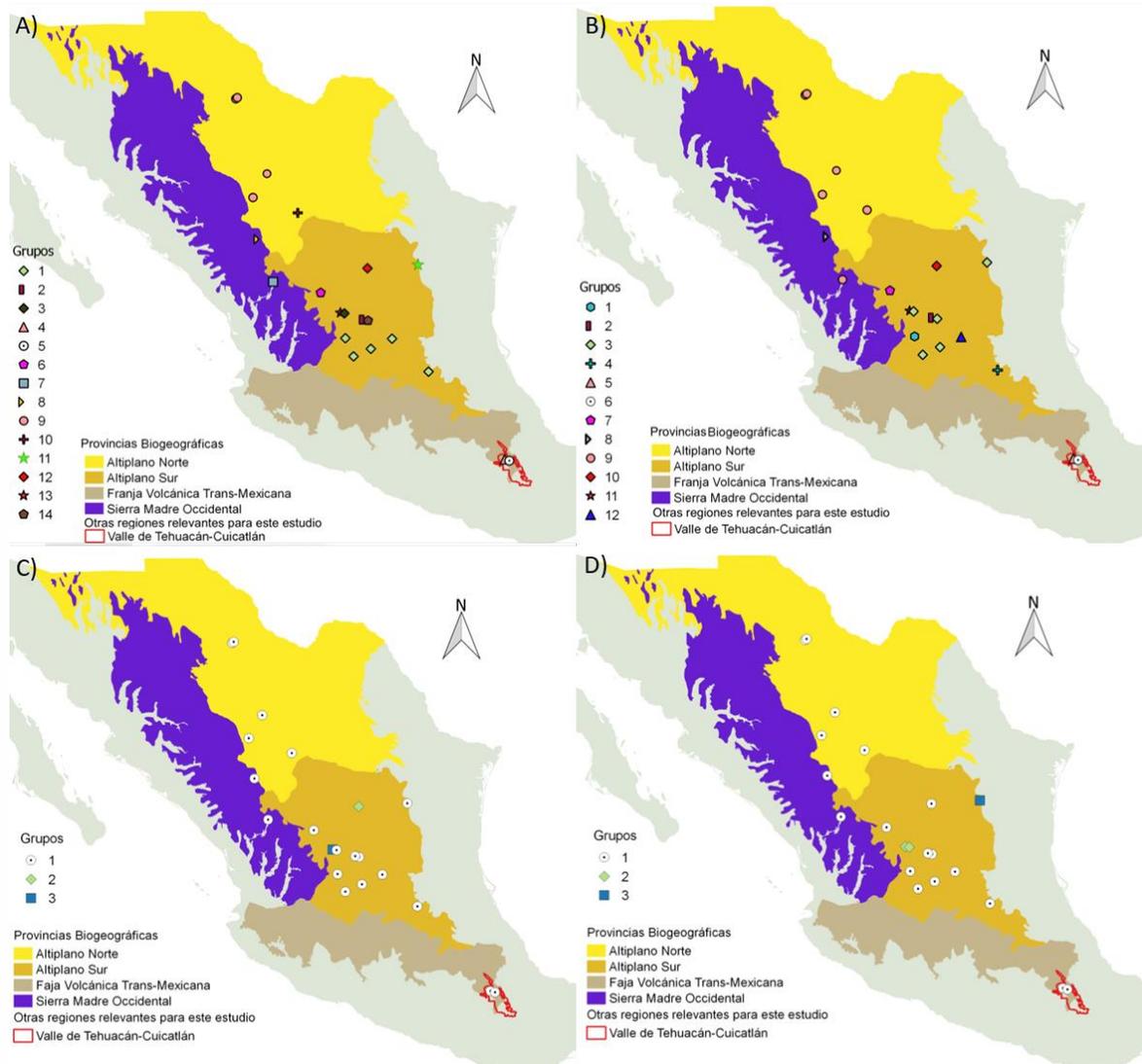


Figura 19. Agrupamientos con mayor valor de  $F_{CT}$  obtenidos con el análisis de SAMOVA. A, C) Núcleo (ITS); B, D) Cloroplasto (intrón *rpL16*, *trnS-trnG*).

### Permut

Para la región de núcleo, el análisis no mostró diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los valores de los parámetros de diferenciación genética  $N_{ST}$  (0.483) y  $G_{ST}$  (0.572). Esto contrasta con lo obtenido para las regiones de cloroplasto ( $p > 0.05$ ), donde el valor de  $N_{ST}$  (0.468) fue significativamente mayor al valor de  $G_{ST}$  (0.224), lo que indica que existe estructura filogeográfica (concordancia entre los haplotipos encontrados y su distribución geográfica).

**Análisis de coalescencia**

El análisis de coalescencia confirmó la monofilia de la especie y en general los valores de probabilidades posteriores fueron bajos para la mayoría de los nodos; sin embargo, la agrupación de las poblaciones en la topología obtenida mostró congruencia con su distribución geográfica e incluso con la regionalización de provincias biogeográficas, a excepción de las poblaciones localizadas en la SMO. Las poblaciones se agruparon en cuatro clados principales. Uno de ellos incluye a las poblaciones de la parte suroeste, centro y noreste del Altiplano sur, mientras que el segundo incluye dos poblaciones de la parte sureste y tres del oeste del Altiplano sur y una población ubicada en la SMO. El tercer clado está conformado por las cinco poblaciones localizadas en el Altiplano norte y una población de la SMO. El último clado, incluye las dos poblaciones ubicadas en el lado sur de la FVTM (i.e., VTC). Estos dos últimos clados presentaron valores de apoyo altos (probabilidades posteriores  $>0.95$ ). La población de Mazapil (Zacatecas), localizada en la parte central-norte del Altiplano sur, parece ser la más temprana divergente de este taxón (Figura 20).

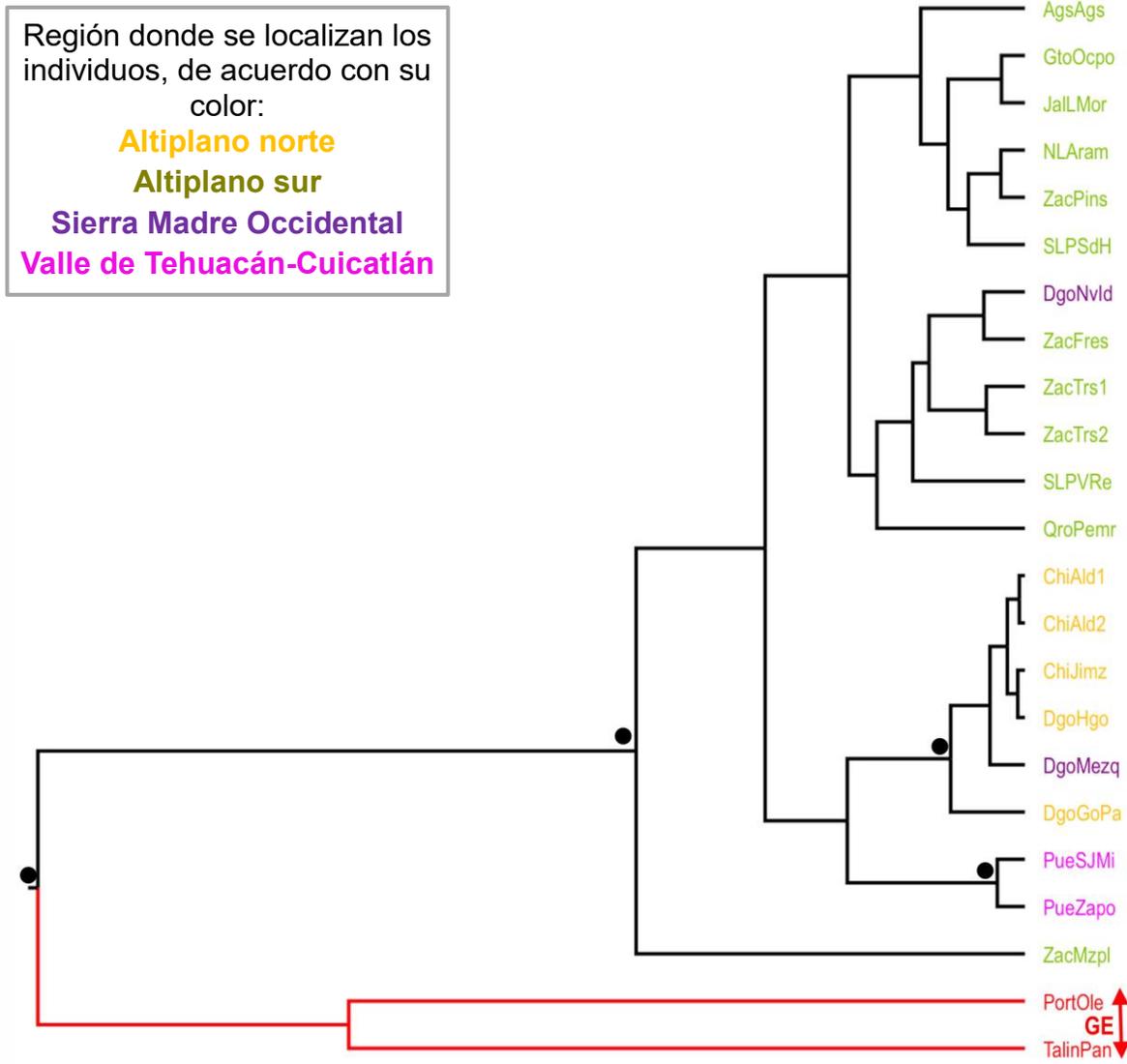


Figura 20. Topología obtenida del análisis de coalescencia hecho en \*BEAST (StarBeast), empleando los tres marcadores moleculares (ITS, intrón *rpL16* y *trnS-trnG*) en un análisis particionado. La flecha roja indica el grupo externo (GE). Los puntos negros indican valores de probabilidades posteriores  $\geq 0.95$ .

**Estimación de tiempos de divergencia**

La estimación de tiempos de divergencia se realizó en el programa programa PATHd8 (Britton *et al.*, 2007), empleando la topología obtenida por el método de coalescencia en el programa \*BEAST (StarBeast) y utilizando las tres regiones consideradas en el presente estudio. El análisis arrojó una edad estimada de la especie de 15.24 Ma, en tanto que para el clado conformado por las poblaciones del VTC se estimó una edad de 0.99 Ma (Fig. 21).

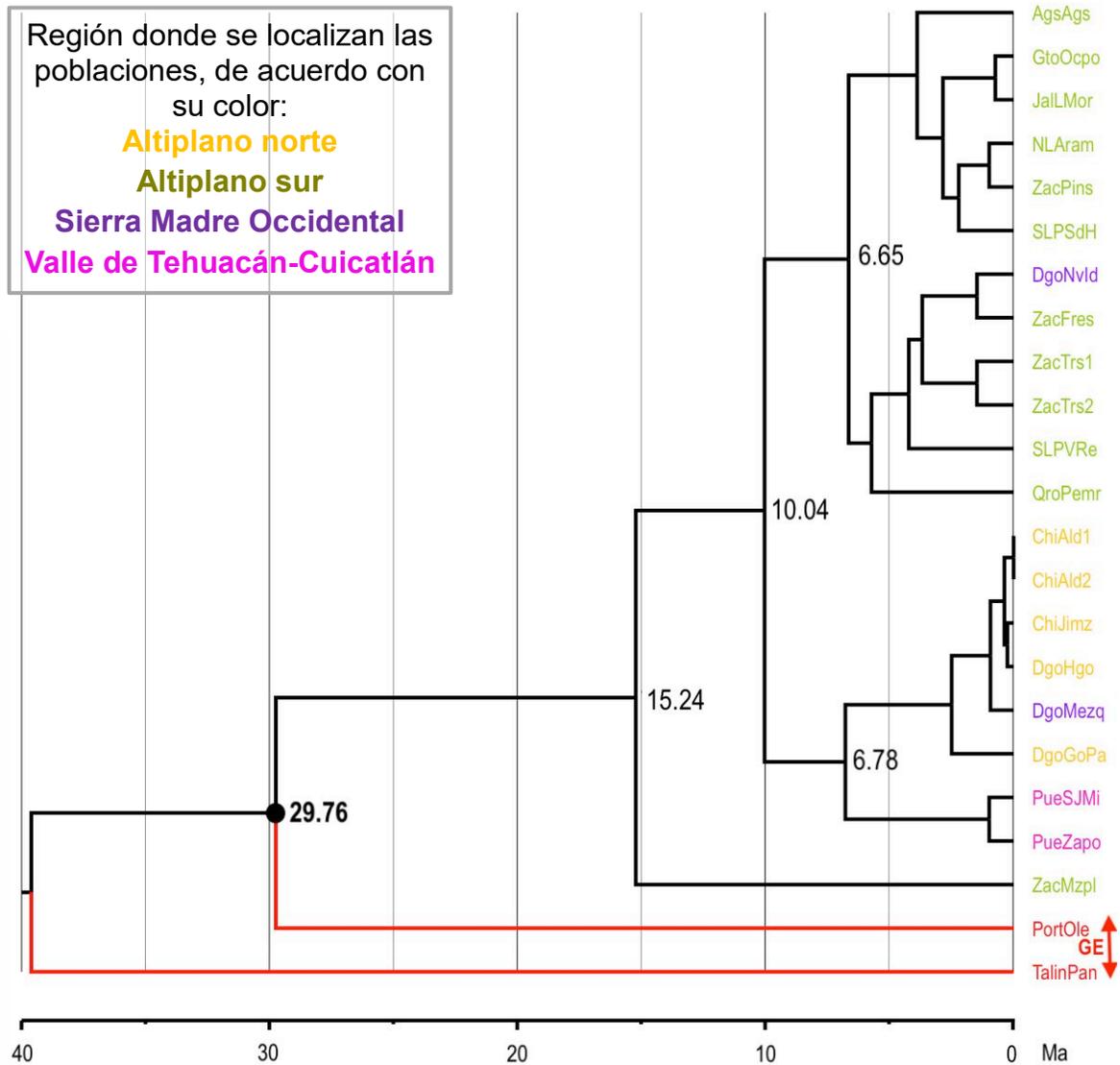


Figura 21. Cronograma generado por el programa PATHd8, tomando en cuenta el árbol resultado del análisis de coalescencia. El círculo negro indica el nodo que se usó como calibración secundaria (edad del clado *Talinopsis* + *Portulaca* estimado por Ocampo y Columbus (2012)); en los nodos aparecen las edades estimadas para los clados principales. La flecha roja indica el grupo externo (GE).

### Biogeografía histórica

#### S-DIVA

De acuerdo con la reconstrucción elaborada con este método, el área ancestral para *Talinopsis frutescens* fue estimada en el Altiplano sur con una probabilidad de 0.93 y una frecuencia del nodo de 100%. Para los dos clados formados por poblaciones localizadas en el Altiplano sur y una de la SMO, el área ancestral estimada también

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

fue el Altiplano sur, mientras que el área ancestral recuperada para el clado más meridional y para el más septentrional fue la del Altiplano norte + VTC (probabilidad 0.94, frecuencia del nodo 47%) (Fig. 22A).

***DEC (Lagrange)***

Los resultados colocan el área ancestral de la especie en el área ancestral conformada por Altiplano norte + Altiplano sur + VTC + SMO, con un valor de apoyo muy bajo (probabilidad 0.22), similar al obtenido para el área ancestral alternativa correspondiente al Altiplano sur (probabilidad 0.20, frecuencia del nodo 100%). El área ancestral estimada para los clados conformados por poblaciones distribuidas en el Altiplano sur corresponde a esta misma provincia en la que se distribuyen actualmente. Para las poblaciones localizadas en los extremos norte y sur de la distribución conocida de la especie, el área ancestral fue estimada en el Altiplano norte + VTC + SMO; sin embargo, el valor de apoyo para ésta no fue alto (probabilidad 0.53, frecuencia del nodo 47%) (Fig. 22B).



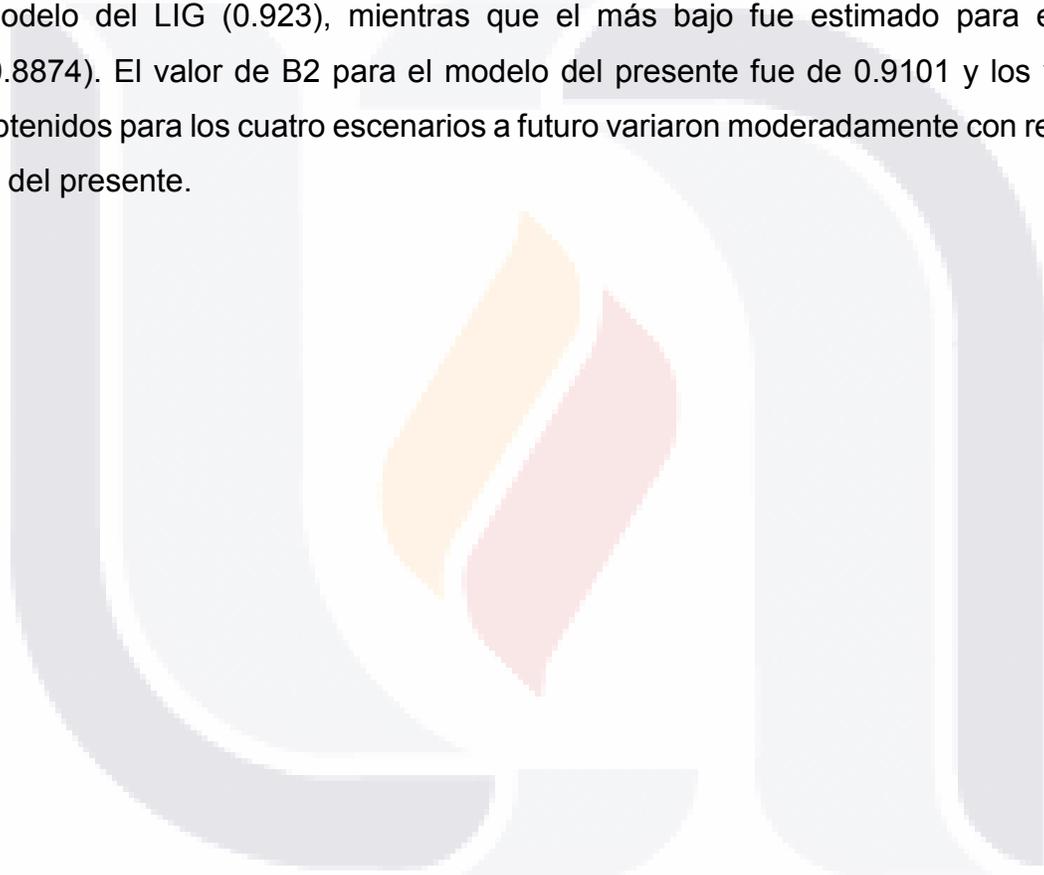
Cuadro 4. Contribuciones relativas de las variables ambientales al modelo de MaxEnt bajo diferentes escenarios. Únicamente se muestran los valores > 1. Los escenarios a futuro corresponden al año 2070. LIG= Último interglaciario; LGM= Último máximo glacial; RCP= Representative Concentration Pathways.

| Variable | Contribución (%) |      |          |         |         |         |         |
|----------|------------------|------|----------|---------|---------|---------|---------|
|          | LIG              | LGM  | Presente | Futuro  |         |         |         |
|          |                  |      |          | RCP 2.6 | RCP 4.5 | RCP 6.0 | RCP 8.5 |
| BIO 1    | 3.8              |      |          |         |         |         |         |
| BIO 2    |                  | 4.8  | 8.6      | 1.4     | 3       | 5.4     | 7.7     |
| BIO 3    |                  | 32.9 | 9.2      | 33.5    | 27.8    | 29.2    | 25.7    |
| BIO 4    | 24.7             | 8.5  | 22.4     | 9.4     | 9.4     | 9       | 13.1    |
| BIO 5    | 1.3              | 2    | 1.1      |         |         |         |         |
| BIO 6    | 7.5              |      |          |         |         |         |         |
| BIO 7    |                  |      | 2.7      | 2.8     | 4.9     | 4.9     | 2.2     |
| BIO 8    |                  |      |          |         |         | 1.2     |         |
| BIO 9    |                  | 9    | 15.3     | 12.3    | 12.2    | 11.1    | 11      |
| BIO 10   | 11.3             | 6.8  |          | 1.2     |         |         |         |
| BIO 11   |                  | 1.9  |          |         |         |         |         |
| BIO 12   |                  | 1.1  | 2.8      |         |         |         |         |
| BIO 13   | 6.7              | 2.5  |          |         | 4.3     | 1.1     |         |
| BIO 14   | 10.5             | 2.8  | 1.8      | 5.4     | 6.9     |         | 2.8     |
| BIO 15   | 9.3              | 1.5  | 13.4     | 5.9     | 8.5     | 6.9     | 6.4     |
| BIO 16   |                  | 1.9  | 1.5      | 3.6     | 1.6     |         | 3.2     |
| BIO 17   | 11               | 2    |          |         |         | 3.9     | 2       |
| BIO 18   | 9.2              |      |          |         |         |         |         |
| BIO 19   | 1.2              | 18.7 | 18.9     | 21.4    | 19.4    | 23.9    | 23      |

El área con las probabilidades de presencia más altas para el LIG se concentra en la parte central-sur del Altiplano Mexicano y en una muy pequeña área ubicada en la parte norte del DC, mientras que la probabilidad de presencia en el VTC es muy baja (Fig. 23A). Para el LGM, el modelado estimó una expansión hacia el sur de México, mostrando probabilidades altas en tres zonas bien definidas: la parte sur del Altiplano Mexicano, el VTC y la parte sur de la Sierra Madre Sur (Fig. 23B). El modelo hecho para el presente predijo correctamente la distribución conocida de la especie, asignando probabilidades altas de presencia principalmente a la parte sur-central de Estados Unidos, al Altiplano Mexicano, a una parte de la SMO y al VTC, excluyendo la región montañosa de la FVTM (Fig. 23C). Todos los escenarios a futuro muestran un patrón general de contracción y fragmentación en el rango de distribución de la especie comparándolos con la proyección hecha al presente. Las

probabilidades altas de presencia se concentran en la parte central y sur del Altiplano Mexicano, mientras que un área muy reducida y aislada fue predicha en tres escenarios con diferente RCP (4.5, 6.0 y 8.5; Fig. 23E-G). En todas las proyecciones a futuro se observó un patrón de contracción en el área del VTC, donde las zonas con altas probabilidades de presencia de la especie estuvieron casi ausentes.

En la prueba de amplitud de nicho el valor más alto de B2 fue obtenido por el modelo del LIG (0.923), mientras que el más bajo fue estimado para el LGM (0.8874). El valor de B2 para el modelo del presente fue de 0.9101 y los valores obtenidos para los cuatro escenarios a futuro variaron moderadamente con respecto al del presente.



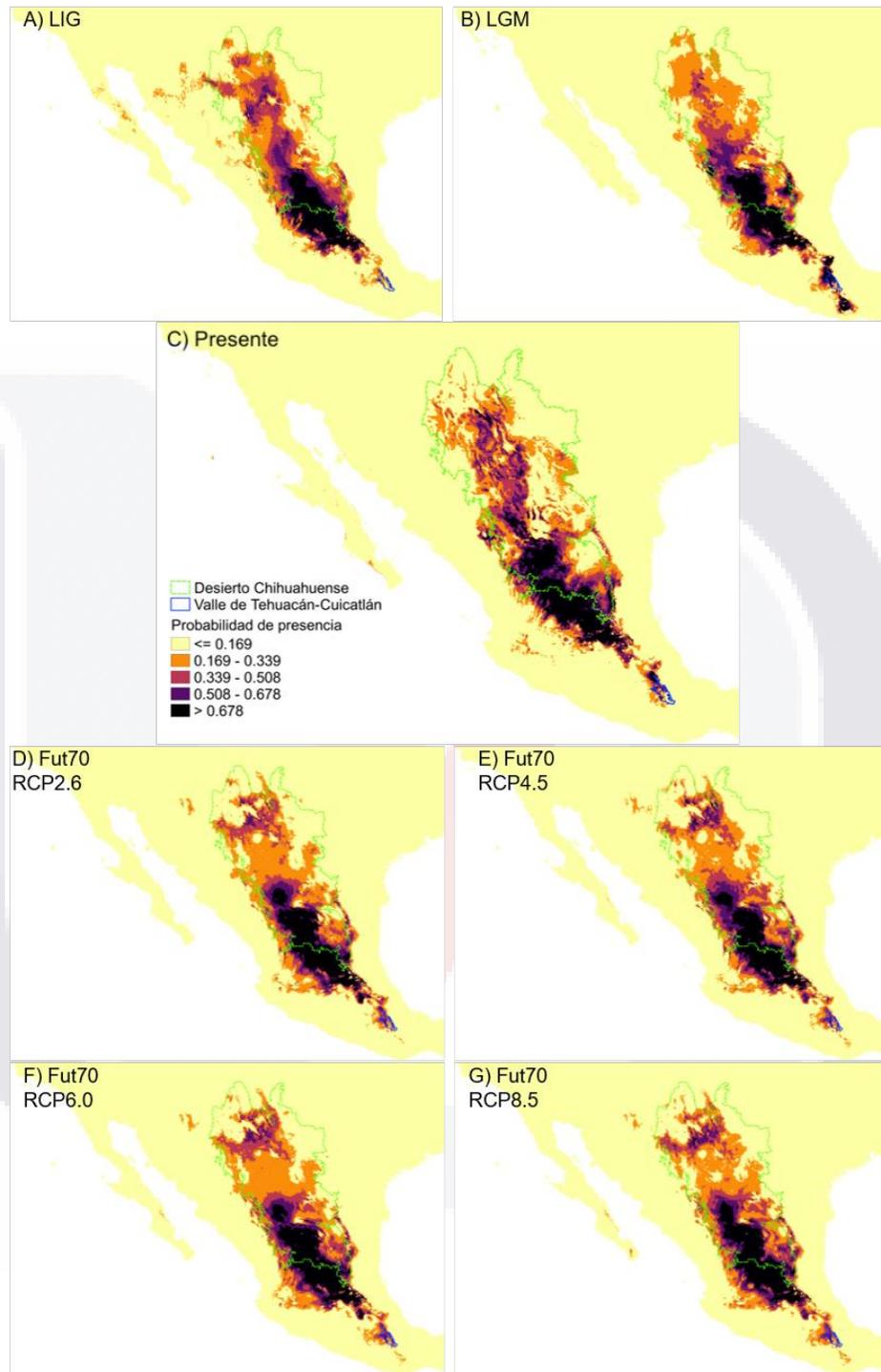


Figura 23. Modelado de nicho ecológico de *Talinopsis frutescens* elaborado en MaxEnt. El polígono en color verde delimita el Desierto Chihuahuense y el azul el Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Las áreas en color negro tienen la probabilidad más alta de presencia de la especie. A-B) Proyecciones al pasado; C) Presente; D-G) Proyecciones al futuro (año 2070). LIG: Último interglacial; LGM: Último máximo glacial; RCP: Representative concentration pathway.

## DISCUSIÓN

*Talinopsis frutescens* es una especie poco evidente durante la mayor parte del año, lo que ha sido factor importante para que la especie reciba poca atención y por consecuencia, la información de este taxón era escasa hasta antes de este trabajo. La aportación de conocimiento sobre la especie en estudio es en diversas áreas, comenzando por la información obtenida con el trabajo de campo, con el cual se pudo verificar algunas localidades donde se distribuye la especie y ampliar el área de su distribución conocida.

En campo fue posible observar las asociaciones que *T. frutescens* entabla con otras especies de plantas y/o sirviéndose de piedras para germinar debajo de estas. Parece ser que, en zonas de ambientes áridos, donde la intensa radiación solar y la escasez de agua son una constante, la asociación en la que una planta actúa como nodriza de otra, proporcionando sombra, protección para germinar y otras facilidades, como generación de microclimas, es un hecho común (Jankju, 2013; Soliveres y Maestre, 2014). Uno de los grupos de plantas que se sabe se beneficia de dicha interacción, cuyas asociaciones han sido bien documentadas y que además es una de las familias más cercanamente emparentadas con *T. frutescens*, es la de las cactáceas (Valiente-Vanuet y Ezcurra, 1991; Miranda-Jácome y Flores, 2018). Otro taxa que actúa como nodriza es *Larrea tridentata* (Samour-Nieva, 2012), que es una especie que se distribuye ampliamente en el Altiplano mexicano y se asocia con *T. frutescens* (Miguel-Vázquez y Ocampo, 2017). Resulta interesante que *L. tridentata* parece haber sufrido contracciones y expansiones en su rango de distribución a lo largo del tiempo (Duran *et al.*, 2005), patrón que coincide con lo observado en el modelado de nicho ecológico de *T. frutescens*.

A partir de las observaciones en campo, se registró información sobre los posibles polinizadores de *T. frutescens*, los cuales incluyen arañas, escarabajos y moscas; estos datos podrían complementar la información sobre la floración peculiar de la especie, donde las flores únicamente abren durante pocas horas y después se cierran para siempre. Esto también se ha observado en taxa cercanamente emparentados con *T. frutescens*, tales como algunas especies de

*Grahamia* (Anacampserotaceae; Court, 2000), *Talinum* (Talinaceae; Valerio y Ramírez, 2003) y *Portulaca* (Portulacaceae; Ichimura y Suto, 1998). El comportamiento de las flores de *T. frutescens*, junto con la morfología de los frutos (forma de canasta) y de las semillas (ambos a simple vista no muestran ninguna estructura que faciliten su dispersión), dieron pauta para indagar acerca del nivel de flujo génico que pudiera existir dentro y entre las poblaciones, el cual está determinado por la dispersión de semillas y polen (Schmitt, 1983; Rasmussen y BrØdsgaard, 1992; Arnold y Ems, 1998). Un posible efecto de la limitación de dispersión de las semillas se evidenció con los resultados obtenidos de la comparación de haplotipos ordenados y sin ordenar ( $N_{ST}$  vs  $G_{ST}$ ), donde se encontró estructura filogeográfica únicamente en los marcadores de cloroplasto, apoyando la idea de que las semillas caen muy cerca de la planta madre propiciando estructura en las poblaciones. Este patrón diferenciado de estructura filogeográfica no se ha reportado en otros estudios de taxa de zonas áridas de México; uno de los pocos trabajos en los que se encontró estructura filogeográfica en marcadores de cloroplasto, es en el enfocado en *Ephedra compacta* (Ephedraceae), aunque dicho patrón no describió a todas las poblaciones, ya que varias de ellas compartían haplotipos y no había limitación en la dispersión de semillas, la cual se da por medio de aves (Loera *et al.*, 2017), esta última característica contrasta con otros grupos de zonas áridas, como *Agave lechuguilla* (Scheinvar *et al.*, 2017), *Lindleya mespiloides* (Vásquez-Cruz y Sosa, 2016) y muy probablemente *T. frutescens*, donde la dispersión se da por factores abióticos.

Los valores obtenidos en el análisis de AMOVA indican que el mayor porcentaje de la variación se explica cuando no se hace ninguna agrupación de las poblaciones. La mayor variación se obtiene al comparar cada población con cada una de las demás de manera individual, lo cual coincide con lo observado en otros estudios (e.g., Angulo *et al.*, 2017; Loera *et al.*, 2017); los valores de  $F_{ST}$  fueron altos ( $>0.5$ ) para ambos tipos de marcadores, siendo mayor el de cloroplasto (0.6833) lo que indica que también hay estructura genética. Los valores de referencia para determinar si el valor de este índice es alto o bajo fue la escala proporcionada por Hartl y Clark (1997), para quienes un valor de  $F_{ST} >0.25$  implica una gran

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

diferenciación genética; sin embargo, al igual que con otros índices, hay opiniones encontradas al respecto. El que la mayor parte de variación sea explicada tratando a cada población de manera individual concuerda con los resultados obtenidos en el análisis de SAMOVA, donde las  $K$  con valor más alto de  $F_{CT}$  fueron de 14 para núcleo y de 12 para cloroplasto y, en ambos casos, solo dos de los grupos estaba conformado por más de una población. Aunque en la publicación original de SAMOVA (Dupanloup *et al.*, 2002) se indica que la configuración con el valor más alto de  $F_{CT}$  se considera como el mejor agrupamiento de las poblaciones, parece ser que no siempre es posible seguir esta indicación al pie de la letra, ya que algunos trabajos similares al presente han acotado sus resultados debido a ciertas inconsistencias observadas durante el análisis. Por ejemplo, Vásquez-Cruz y Sosa (2016) originalmente plantearon evaluar de 2-4 grupos ( $K$ ), aunque debido a que los valores de  $F_{CT}$  continuaban incrementándose sobre el rango de los posibles grupos, decidieron acotar el análisis a un valor de  $K=10$ . Otros autores, como Pérez-Crespo *et al.*, (2017), consideraron otros parámetros aparte del sugerido en la publicación original; estos autores tomaron en cuenta además del valor más alto de  $F_{CT}$ , aquel que alcanzara una asíntota y descartaron las configuraciones con uno o más grupos con una sola población, argumentando que dicho resultado es un indicador de que la estructura grupal está desapareciendo. Este último escenario se observó en los resultados obtenidos para *T. frutescens*, por lo que se presentaron dos propuestas de agrupamientos ( $K$ ) (Figura 19)

Por otro lado, todos los análisis filogenéticos apoyaron la monofilia de la especie. Sin embargo, no se apreció un patrón de agrupamiento en clados que corresponda con la distribución geográfica de las poblaciones empleadas; únicamente el clado conformado por los individuos de las poblaciones del VTC se recuperó de manera constante y con valores altos de apoyo. Un resultado similar fue obtenido por Angulo *et al.*, (2017), quienes emplearon dos marcadores de cloroplasto y aunque recuperaron el clado conformado por todos los haplotipos de *Berberis trifoliolata* con un valor de apoyo alto, las relaciones entre poblaciones no fueron resueltas y solo un clado que incluía poblaciones del noreste de México y del Altiplano mexicano, fue recuperado con un valor modesto de apoyo (0.9), lo anterior,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

aunado a la buena señal mostrada por el otro tipo de marcador que emplearon (AFLPs; polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados), evidenció una inconsistencia en cuanto a la señal que dio cada tipo de marcador, la cual fue explicada como resultado de dos procesos poblacionales: variación en el flujo génico mediado por el polen (AFLPs) y la dispersión a larga distancia de las semillas (ADN de cloroplasto), además de señal a diferentes escalas de tiempo.

La ausencia de un patrón de agrupamiento bien definido contrasta con lo observado en otros trabajos enfocados en la filogeografía de taxa de zonas áridas (e.g. Ruíz-Sánchez *et al.*, 2012; Vásquez-Cruz y Sosa, 2016), en donde las inferencias filogenéticas muestran dicho patrón de manera clara y correlacionado con la distribución geográfica de los taxa en estudio.

Los resultados obtenidos de los análisis filogenéticos en contraste con la correspondencia geográfica de los haplotipos observado en las redes, podría indicar que las poblaciones aún se encuentran en un sorteo incompleto de linajes, que a la larga reflejará una diferenciación genética más evidente, como en el caso de las poblaciones del VTC, cuyo clado se recuperó con valores altos de apoyo en todos los análisis realizados.

Tomando en cuenta que los análisis filogenéticos no recuperaron a las distintas poblaciones como grupos monofiléticos, se realizó un análisis de coalescencia para tener un panorama más claro acerca de las relaciones entre las poblaciones muestreadas de *T. frutescens*. El programa empleado para este análisis fue \*BEAST (StarBeast), el cual fue pensado para coestimar árboles multigenes incorporados en un árbol de especies compartidas, junto con el tamaño poblacional efectivo de las especies existentes y las ancestrales; esta inferencia es posible gracias a los datos de múltiples locus y de múltiples individuos por especie (Heled y Drummond, 2010). Esta última característica es la clave por la que se utilizó este método, con la variante de emplear múltiples individuos de diferentes poblaciones en lugar de especies. En el árbol resultante de este análisis, la mayoría de los clados no obtuvo valores altos de apoyo; sin embargo, esta topología sí mostró concordancia con la distribución geográfica de las poblaciones, recuperando nuevamente el clado formado por las poblaciones del VTC con un valor de apoyo

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

alto, lo cual refuerza lo observado en las redes de haplotipos, donde los haplotipos encontrados en las poblaciones de esa región no se comparten con ninguna otra. Este árbol, además, agrupó en un clado todas las poblaciones del Altiplano norte y uno más con las del Altiplano sur. La población localizada en Mazapil, Zacatecas (Altiplano sur) parece ser la más tempranamente divergente; esta población se localiza en la provincia biogeográfica del Altiplano sur, la cual fue estimada como el área ancestral de la especie; esta estimación también es apoyada por el haplotipo más abundante, el cual se distribuye en dicha provincia. Parece ser que esta región también pudo haber sido centro de origen de otras taxa de zonas áridas, como en el caso de *Lindleya* (Vásquez-Cruz y Sosa, 2016).

La edad estimada para la especie fue de 15.24 Ma y de acuerdo con la estimación de biogeografía histórica, durante el Mioceno (10-6.78 Ma) habrían ocurrido dos eventos de expansión, producto de los cuales la especie habría llegado al Altiplano norte y al VTC. Este periodo concuerda con eventos importantes de radiación de los principales grupos de suculentas en todo el mundo, los cuales coinciden también con el auge global de pastizales con especies que utilizan fotosíntesis tipo C<sub>4</sub> (Arakaki *et al.*, 2011). Recientemente, Sosa *et al.* (2018) también señalaron a este periodo como un lapso de diversificación de taxa de zonas áridas. Al parecer, las poblaciones que actualmente se localizan en la SMO habrían llegado ahí como resultado de dos eventos independientes de expansión, uno proveniente de las poblaciones del Altiplano sur y otro de las del Altiplano norte; estas poblaciones (Durango; SMO) son las únicas en las que se observaron flores de color rosa, el resto de las observadas durante el trabajo de campo eran amarillas. La coloración rosa de las flores ha sido reportada para poblaciones del norte de México y sur de E. U. A. (Kiger, 2003), mientras que para la parte meridional de la distribución conocida de la especie, el único color que se tiene registrado es amarillo (Ocampo 2010; 2011). Si se toma en cuenta que dichas poblaciones tuvieron dos diferentes orígenes, probablemente las condiciones abióticas de la SMO y de la parte norte del DC podrían estar influyendo en la coloración de las flores de *T. frutescens*, como ya se ha observado en otras taxa (Koski y Ashman, 2016). Cabe mencionar que los haplotipos encontrados en una de estas poblaciones, no se

comparte con ninguna otra población por lo que posiblemente estén en proceso de diferenciación.

Los valores de  $H_d$  obtenidos para ambos tipos de marcadores fueron altos y contrastan con los valores de  $\pi$ , que fueron bajos y podrían ser indicio de una reciente expansión demográfica (Hamilton, 2009). Esta puede estar relacionada con los efectos de los periodos del LIG y el LGM sucedidos en el Pleistoceno, los cuales provocaron cambios en el rango de distribución de *T. frutescens*; al parecer las poblaciones que actualmente se encuentran en la parte septentrional de la distribución conocida de la especie habrían llegado después del LGM. Aunque el valor más alto de  $B_2$  se estimó para el periodo del LIG, para esta proyección el área con probabilidades más altas de presencia se concentra únicamente en la parte meridional del DC, mientras que las probabilidades en el VTC son muy bajas; esto sugiere que durante ese periodo hubo un evento de contracción en el rango de distribución de la especie. Diversos trabajos han elucidado el efecto de estos periodos glaciales e interglaciales en la estructura genética y distribución de algunos taxa de zonas áridas, encontrando generalmente patrones de contracción y expansión de los rangos de distribución durante dichos periodos (Hunter *et al.*, 2001; Vásquez-Cruz y Sosa, 2016; Angulo *et al.*, 2017; Loera *et al.*, 2017).

Los resultados obtenidos nos permitieron inferir que la aparición de la FVTM tuvo un efecto sobre la distribución actual de *T. frutescens*, ya que la división del clado conformado por las poblaciones del Altiplano norte + SMO y las del VTC comenzó hace 6.78 Ma, lo que coincide con el periodo de vulcanismo silíceo de la FVTM ocurrida en el Mioceno tardío (Gómez-Tuena *et al.*, 2007). La diferenciación genética de las poblaciones localizadas en el VTC, observada en las redes de haplotipos, nos hace reflexionar sobre el futuro de dichas poblaciones, ya que, aunque su valor promedio de  $H_d$  en general es alto para ambos marcadores (0.48 núcleo, 0.91 cloroplasto), el valor de  $\pi$  es muy bajo (0.005 núcleo, 0.008 cloroplasto), lo que en conjunto podrían indicar que las poblaciones estuvieron sujetas a cuellos de botella en el pasado, posiblemente asociados a los periodos interglacial y glacial del Pleistoceno, y después tuvieron un crecimiento relativamente rápido a partir de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

poblaciones pequeñas. Aunado a esto, las proyecciones a futuro hechas con el modelado de nicho ecológico muestran un panorama poco alentador, en el cual el rango de distribución de *T. frutescens* se vería afectado por el cambio climático, como ya se ha observado en otros grupos de plantas (Kelly y Goulden, 2008); este fenómeno provocaría fragmentación en el rango de distribución de la especie, siendo la región del VTC una de las zonas en las que la especie podría extinguirse de manera local. Otros estudios enfocados en esta área apoyan estas predicciones, como el elaborado por Dávila *et al.*, (2013), quienes modelaron el nicho ecológico a futuro de una cactácea endémica del VTC, *Neobuxbaumia tetetzo*, y también observaron contracciones en el rango de distribución de dicha especie.

## CONCLUSIÓN

La información obtenida en este estudio confirma la hipótesis de que existe variación genética entre las poblaciones de *T. frutescens*, evidenciando la diferenciación de las poblaciones del VTC con respecto a las demás; estas poblaciones se localizan al otro lado de la FVTM, en la parte meridional discontinua del rango de distribución de la especie y aisladas del resto. Este aislamiento, en conjunto con el tiempo de divergencia estimado para esas poblaciones, apoya la segunda y la tercer hipótesis planteadas en este trabajo, puesto que la aparición de la FVTM coincide con la divergencia de las poblaciones del VTC con respecto a las ubicadas en la parte septentrional de la distribución conocida de la especie, evidenciando un evento de vicarianza. La información haplotípica y de biogeografía histórica sugieren que el Altiplano sur es el centro de origen de la especie, lo que resulta interesante, ya que se trata del linaje más tempranamente divergente dentro de Anacampserotaceae, en donde la mayoría de las especies se distribuyen en otros continentes. Por otra parte, el modelado de nicho ecológico permitió elucidar los cambios en el rango de distribución que sufrió *T. frutescens* debido a factores climáticos históricos y de igual forma obtener una perspectiva de los efectos del cambio climático a futuro, el cual señala un panorama desalentador para las poblaciones del VTC, sugiriendo una posible extinción local.

Las regiones áridas del país poseen una historia evolutiva sorprendente; las especies de plantas que ahí se distribuyen incluyen una proporción considerable de endemismos, con características fisiológicas y morfológicas muy interesantes. Desafortunadamente, la mayor parte del territorio de la zona centro-norte del país con este tipo de hábitats (e.g., DC) no cuenta con criterios de protección y la vegetación que ahí se encuentra corre el riesgo de perderse. Se espera que la información generada en este trabajo aporte al conocimiento no solo de la especie, sino de las plantas suculentas en general, así como al entendimiento de la historia evolutiva de los taxa de zonas áridas, con la finalidad de que estos datos puedan apoyar el desarrollo de estrategias efectivas de conservación.

## LITERATURA CITADA

- Altukhov, Y. P. 2006. Intraspecific Genetic Diversity. Springer-Verlag Berlin.
- Angulo, D. F., L. D. Amarilla, A. M. Anton y V. Sosa. 2017. Colonization in North American Arid Lands: The Journey of Agarito (*Berberis trifoliolata*) Revealed by Multilocus Molecular Data and Packrat Midden Fossil Remains. PLoS ONE 12(2): e0168933.
- Applequist, W. L. y R. S. Wallace. 2001. Phylogeny of the Portulacaceae cohort based on *ndhF* sequence data. Systematic Botany 26: 406-419.
- Arakaki, M., P.A. Christin, R. Nyffeler, A. Lendel, U. Eggli, R.M. Ogburn, E. Spriggs, M.J. Moore y E.J. Edwards. 2011. Contemporaneous and recent radiations of the world's major succulent plant lineages. Proceedings of the National Academy of Sciences (USA) 108: 8379-8384.
- Arnold, M. L. y S. K. Emms. 1998. Molecular markers, gene flow and natural selection, 442-458 pp. En Soltis, D. E., P. S. Soltis y J. J. Doyle (Eds.), Molecular Systematics of Plants II, DNA sequencing. Kluwer Academic Publishers, New York, USA.
- Avice, J.C. 2000. Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press, Harvard.

- Avise, J.C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* 36: 3-15.
- Avise, J.C., J. Arnold, R.M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J.E. Niegel, C.A. Reeb y N.C. Saunders. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.
- Beck, J. B., P. J. Alexander, L. Allphin, I. Al-Shehbaz, C. Rushworth, C. Donovan B y M. Windham. 2012. Does hibridizatio drive the transition to asexuality in diploid *Boechea*? *Evolution* 66 (4): 985-995.
- Bonatelli, I. A. S., M. F. Perez, A. T. Peterson, N. P. Taylor, D. C. Zappi, M. C. Machado, I. Koch, A. H. C. Pires y E. M. Moraes. 2014. Interglacial microrefugia and diversification of a cactus species complex: phylogeography and palaeodistributional reconstructions for *Pilosocereus aurisetus* and allies. *Molecular Ecology* 23(12): 3044–3063.
- Bouckaert R. R., J. Heled, D. Kuehnert, T. G. Vaughan, C.-H. Wu, D. Xie, M. A. Suchard, A. Rambaut, A. J. Drummond. 2014. BEAST 2: A software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Computational Biology* 10(4): e1003537.
- Britton, T., C. L. Anderson, D. Jaquet, S. Lundqvist y K. Bremer. 2007. Estimating divergence times in large phylogenetic trees. *Systematic Biology* 56: 74-752.
- Byrne M., M. Hankinson. 2012. Testing the variability of chloroplast sequences for plant phylogeography. *Australian Journal of Botany* 60:569-574.
- Casas-Andreu, G. y T. Reyna-Trujillo. 1990. 'Provincias herpetofaunísticas' en Herpetofauna (Anfibios y reptiles). IV.8.6. Atlas Nacional de México. Vol II. Instituto de Geografía, UNAM. México.
- Cheng, T., C. Xu, L. Lei, C. Li, Y. Zhang y S. Zhou. 2016. Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. *Molecular Ecology* 16: 138-149.
- Clement, M., Q. Snell, P. Walke, D. Posada y K. Crandall. 2002. TCS: estimating gene genealogies. *Proc 16th Int Parallel Distrib Process Symp* 2:184.

- Cohen, K. M., S. C. Finney, P. L. Gibbard, y J. Fan. J. -X. (2013; updated) The ICS International Chronostratigraphic Chart. Episodes 36: 199-204.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). 1997. 'Provincias biogeográficas de México'. Escala 1:4 000 000. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México, D. F.
- Cornejo-Romero, A., C. F. Vargas-Mendoza, G. F. Aguilar-Martínez, J. Medina-Sánchez, B. Rendón-Aguilar, P. L. Valverde, J. A. Zavala-Hurtado, A. Serrato, S. Rivas-Arancibia, M. A. Pérez-Hernández, Gerardo López-Ortega y C. Jiménez-Sierra. 2017. Alternative glacial-interglacial refugia demographic hypotheses tested on *Cephalocereus columna-trajani* (Cactaceae) in the intertropical Mexican drylands. PLOS ONE 12(4): e0175905.
- Cota-Sánchez, J. H., K. Remarchuk y K. Ubayasena. 2006. Ready-to-Use DNA Extracted with a CTAB Method Adapted for Herbarium Specimens and Mucilaginous Plant Tissue. Plant Molecular Biology Reporter 24: 161-167.
- Court, D. 2000. Succulent Flora of South Africa. Balkema, Rotterdam. <https://books.google.com.mx/books?id=W6ZfOBb-QdsC>
- Cruzan, M.B. y A.R. Templeton. 2000. Paleogeography and coalescence: phylogeographic analysis of hypotheses from the fossil record. Trends in Ecology and Evolution 15:491-496.
- Darriba, D., G. L. Taboada, R. Doallo y D. Posada. D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods 9(8): 772.
- Dávila, P., M. del C. Arizmendi, A. Valiente-Banuet, J.L. Villaseñor, A. Casas y R. Lira. 2002. Biological diversity in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico. Biodiversity and Conservation 11: 421-442.
- Dávila, P, O. Téllez y R. Lira. 2013. Impact of climate change on the distribution of populations of an endemic Mexican columnar cactus in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, Mexico. Plant Biosystems 147(2): 376-386.
- Doyle, J.J. y J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19: 11-15.
- Dupanloup, I., S. Schneider y L. Excoffier. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. Molecular Ecology 11: 2571-2581.

- Duran, K. L., T. K. Lowrey, R. R. Parmenter y P. O. Lewis. 2005. Genetic diversity in Chihuahuan Desert populations of creosotebush (Zygophyllaceae: *Larrea tridentata*). *American Journal of Botany*, 92 (4): 722-729.
- Ebach, M. C. y Humphries, C. J. 2003. Ontology of Biogeography. *Journal of biogeography* 30(6): 959-962.
- Excoffier, L., G. Laval y S. Schneider. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47–50.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32: 1792–1797.
- Eguiarte, L. E., J. A. Aguirre-León, L. Jardón-Barbolla, E. Aguirre-Planter y V. Souza. 2013. Genómica de poblaciones: Nada en evolución va a tener sentido si no es a la luz de la genómica, y nada en genómica tendrá sentido si no es a la luz de la evolución. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 16 (1): 42-56.
- Ewens, W.J. 1979. *Mathematical Population Genetics*. Springer-Verlag, Berlin.
- Felsenstein, J. 1973. Maximum likelihood and minimum-steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. *Systematic Zoology* 22: 240–249.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783–791.
- Ferrusquía-Villafranca, I. 1990. 'Provincias Bióticas (con énfasis en criterios morfotectónicos)' en *Regionalización Biogeográfica*, IV.8.10. Atlas Nacional de México. Vol. II. Instituto de Geografía, UNAM. México.
- GBIF.org (Acceso continuo durante 2017) GBIF Occurrence Download <https://doi.org/10.15468/dl.example-donotcite>
- GeneStudio (TM) Professional Edition, Versión 2.2.0.0. Copyright © 1999-2011 GeneStudio, Inc. [www.genestudio.com](http://www.genestudio.com)
- Gent, P. R., G. Danabasoglu, L. J. Donner, M. M. Holland, E. C. Hunke, S. R. Jayne, D. M. Lawrence, R. B. Neale, [P. J. Rasch](#), [M. Vertenstein](#), [P. H. Worley](#), [Z. L.](#)

- [Yang](#) y [M. Zhang](#). 2011. The Community Climate System Model Version 4. *Journal of Climate* 24(19): 4973–4991.
- Gómez-Tuena, A., M. T. Orozco-Esquivel y L. Ferrari. 2007. Igneous petrogenesis of the Trans-Mexican Volcanic Belt. *Geological Society of America* 422: 129–181.
- Gonzalez-Rodriguez, A., J.F. Bain, J. L. Golden y K. Oyama. 2004. Chloroplast DNA variation in the *Quercus affinis*-*Q. laurina* complex in Mexico: geographical structure and associations with nuclear and morphological variation. *Molecular Ecology* 13: 3467–3476.
- Granados-Sánchez, D., A. Sánchez-González, R. L. Granados V. y A. Borja de la R. 2011. Ecología de la vegetación del desierto Chihuahuense. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente. Edición especial* 17: 111-130.
- Guindon, S., J. F. Dufayard, V. Lefort, M. Anisimova, W. Hordijk y O. Gascuel. 2010. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* 59 (3): 307-321.
- Hamilton, M. B. 2009. *Populations genetics*. Wiley-Blackwell, Oxford.
- Hartl, D.L. y G.C. Clark. 1997. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Heled, J. y A. J. Drummond. 2010. Bayesian Inference of Species Trees from Multilocus Data. *Molecular Biology and Evolution* 27(3): 570-580.
- Hernández-Ledesma P., W. G. Berendsohn, T. Borsch, S. V. Mering, H. Akhani, S. Arias, I. Castañeda-Noa, U. Eggli, R. Eriksson, H. Flores- Olvera, S. Fuentes-Bazán, G. Kadereit, C. Klak, N.Korotkova, R. Nyffeler, G. Ocampo, H. Ochoterena, B. Oxelman, R. K. Rabeler, A.Sanchez, B. O. Schlumpberger y P. Uotila. 2015. A taxonomic backbone for the global synthesis of species diversity in the angiosperm order *Caryophyllales*. *Willdenowia* 45(3): 281-383.
- Hershkovitz, M. A. y E. A. Zimmer. 2000. Ribosomal DNA evidence and disjunctions of western American Portulacaceae. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 15: 419–439.
- Hershkovitz, M. A. y E. A. Zimmer. 1997. On the evolutionary origins of the cacti. *Taxon* 46: 217–232.

- Hickerson, M. J., B.C. Carstens, J. Cavender-Bares, K.A. Crandall, C.H. Graham, J.B. Johnson, L. Rissler, P.F. Victoriano y A.D. Yoder. 2010. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 91-301.
- Hijmans, R. J., S. E. Cameron, J. L. Parra, P. G. Jones y A. Jarvis. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25: 1965–1978.
- Hoang, D.T., O. Chernomor, A. von Haeseler, B.Q. Minh, y L.S. Vinh. 2018. UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Molecular Biology and Evolution*, in press. DOI: 10.1093/molbev/msx281
- Hoyt, C. 2002. The Chihuahuan Desert: Diversity at Risk. *Endangered species Bulletin* 27 (2): 16-17.
- Hunter, K. L., J. L. Betancourt, B. R. Riddle, T. R. Van Devender, K. L. Cole y W. G. Spaulding. 2001. Ploidy race distributions since the Last Glacial Maximum in the North American desert shrub, *Larrea tridentata*. *Global Ecology and Biogeography* 10 (5): 521-533.
- Ichimura, K. y K. Suto. 1998. Environmental Factors Controlling Flower Opening and Closing in a *Portulaca* Hybrid. *Annals of Botany* 82: 67-70.
- Jankju, M. 2013. Role of nurse shrubs in restoration of an arid rangeland: Effects of microclimate on grass establishment. *Journal of Arid Environments* 89: 103-109.
- Jarvis, A., H.I. Reuter, A. Nelson, E. Guevara. 2008. Hole-filled seamless SRTM data V4, International Centre for Tropical Agriculture (CIAT). Available from <http://srtm.csi.cgiar.org>.
- Katoh, K., J. Rozewicki y K. D. Yamada. 2017. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics* 1-7.
- Kelly, A. E. y M. L. Goulden. 2008. Rapid shifts in plant distribution with recent climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(33): 11823-11826.

- Kiger, R. W. 2003. *Talinopsis*. In: Flora of North America Editorial Committee, Eds. Flora of North America North of Mexico, Vol. 4. Magnoliophyta: Caryophyllidae, Pt. 1. Pp. 501–502. Oxford University Press, New York.
- Klak, C., A. Khunou, G. Reeves y T. Hedderson. 2003. A phylogenetic hypothesis for the Aizoaceae (Caryophyllales) based on four plastid DNA regions. *American Journal of Botany* 90(10): 1433-1455.
- Koski, M. H. y T.-L. Ashman. 2016. Macroevolutionary patterns of ultraviolet floral pigmentation explained by geography and associated bioclimatic factors. *New Phytologist* 2011: 708-718.
- Kubatko, L., B.C., Carstens y L.L. Knowles. 2009. Species tree estimation using maximum likelihood for gene trees under coalescence. *Bioinformatics* 25(7): 971-3.
- Levins, R. 1968. *Evolution in changing environments*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Loera, I., S. M. Ickert-Bond y V. Sosa. 2017. Pleistocene refugia in the Chihuahuan Desert: the phylogeographic and demographic history of the gymnosperm *Ephedra compacta*. *Journal of Biogeography* 44(12): 2706-2716.
- Martin, P. S. y B. E. Harrell. 1957. The Pleistocene History of Temperate Biotas in Mexico and Eastern United States. *Ecology* 38(3): 468-48.
- Miguel-Vázquez M. I. y G. Ocampo. 2017. Knowing more about *Talinopsis frutescens* (arroyo fameflower). *Cactus and Succulent Journal*, 89 (2): 88-91.
- Miller M. A., W. Pfeiffer y T. Schwartz. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*. 1 – 8 p.
- Milstead, W. W. 1960. Relict species of the Chihuahuan Desert. *The Southwestern Naturalist* 5 (2): 75-88.
- Miranda-Jácome, A, y J. Flores. 2018. Effects of nurse plants and the granivore guild in the associational susceptibility of seeds from the columnar cactus *Pilosocereus leucocephalus*. *Journal of Arid Environments* 151: 9-14.
- Morafka, D. J. 1977. *A biogeographical analysis of the Chihuahuan desert through its herpetofauna*. Dr. W. Junk B. V. Publishers. La Haya. 313 p.

- Moreno-Letelier, A., A. Mastretta-Yanes y T. G. Barraclough. 2014. Late Miocene lineage divergence and ecological differentiation of rare endemic *Juniperus blancoi*: clues for the diversification of North American conifers. *New Phytologist* 203(1): 335-347.
- Müller, K., J. Müller, C. Neinhuis y D. Quandt. 2010. Phylde ®. <http://www.phylde.de/>
- Nakazato, T., D. L. Warren y L. C. Moyle. 2010. Ecological and geographic modes of species divergence in wild tomatoes. *American Journal of Botany*, 97:680-693.
- Nason, J. D., J. L. Hamrick y T. H. Fleming. 2002. Historical vicariance and postglacial colonization effects on the evolution of genetic structure in *Lophocereus*, a Sonoran Desert columnar cactus. *Evolution* 56(1): 2214-2226.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nyffeler, R. y U. Eggli. 2010. Disintegrating Portulacaceae: A new familial classification of the suborder Portulacineae (Caryophyllales) based on molecular and morphological data. *Taxon* 59: 227–240.
- Ocampo, G. 2010. Anacampserotaceae. *Flora del Bajío y Regiones Adyacentes*. Fascículo 167. 22 pp.
- Ocampo, G. 2011. Anacampserotaceae. *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*. Fascículo 84. Universidad Autónoma de México. Instituto de Biología. Departamento de Botánica. 12 pp.
- Ocampo, G. y J.T. Columbus. 2010. Molecular phylogenetics of suborder Cactineae (Caryophyllales), including insights into photosynthetic diversification and historical biogeography. *American Journal of Botany* 97: 1827–1847.
- Ocampo, G. y J.T. Columbus. 2012. Molecular phylogenetics, historical biogeography, and chromosome number evolution of *Portulaca* (Portulacaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63: 97-112.
- Otto-Bliesner, B. L., S. J. Marshall, J. T. Overpeck, G. H. Miller y A. Hu. 2008. Simulating Arctic Climate Warmth and Icefield Retreat in the Last Interglaciación. *Science* 311: 1751-1753.
- Oxelman, B., M. Lidén y D. Berglund. 1997. Chloroplast *rps16* intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). *Plant Systematics and Evolution* 206(1/4): 393-410.

- Perez, M. F., B. C. Carstens, G. L. Rodrigues y E. M. Moraes. 2015. Anonymous nuclear markers data supporting species tree phylogeny and divergence time estimates in a cactus species complex in South America. *Data in Brief* 6: 456-60.
- Pérez-Crespo, M. J., J. F. Ornelas, A. González-Rodríguez, E. Ruíz-Sánchez, A. A. Vásquez-Aguilar y S. Ramírez-Barahona. 2017. Phylogeography and population differentiation in the *Psittacanthus calyculatus* (Loranthaceae) mistletoe: a complex scenario of climate–volcanism interaction along the Trans- Mexican Volcanic Belt. *Journal of Biogeography* 44: 2501-2514.
- Phillips, S. J., M. Dudík y R. E. Schapire. [Internet] Maxent software for modeling species niches and distributions (Version 3.4.1). Available from url: [http://biodiversityinformatics.amnh.org/open\\_source/maxent/](http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/maxent/). Accessed on 20-2-18.
- Piñero, D., A. Barahona, L. Eguiarte, A. Rocha O. y R. Salas L. 2008. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México, en *Capital natural de México*. Vol. I: *Conocimiento actual de la biodiversidad*. CONABIO.
- Pons, O. y R.J. Petit. 1996. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics* 144: 1237–1245.
- Prince, L. M. 2015. Plastid primers for angiosperm phylogenetics and phylogeography. *Applications in Plant Sciences* 3(6): 1400085.
- Prince, L. M. 2010. Phylogenetic relationships and species delimitation in *Canna* (Cannaceae). In: Seberg, O., G. Petersen, A. S. Barfod y J. I. Davis. (Eds.), *Diversity, Phylogeny, and Evolution in the Monocotyledons – Proceedings of the Fourth International Conference on the Comparative Biology of the Monocotyledons and the Fifth International Symposium on Grass Systematics and Evolution*. Aarhus University Press, Aarhus, 307–331 pp.
- Rambaut, A. y A. J. Drummond. 2002-2017. LogCombiner v2.4.7. <http://beast2.cs.auckland.ac.nz/>
- Rambaut, A. y A. J. Drummond. 2002-2017. TreeAnnotator v2.4.7. <http://beast.bio.ed.ac.uk/>

- Rambaut, A., A. J. Drummond y M. Suchard. 2013. Tracer v1.6 2003-2013 MCMC Trace Analysis Package. <https://code.google.com/archive/p/beast-mcmc/issues>
- Ramírez-Pulido, J. y A. Castro-Campillo. 1990. 'Regiones y Provincias Mastogeográficas'. Extraído de Regionalización Mastofaunística, IV.8.8. Atlas Nacional de México. Vol. III. Instituto de Geografía, UNAM. México.
- Rannala, B. y Z.H. Yang. 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution* 43: 304-311.
- Rasmussen, I. R. y B. Brødsgaard. 1992. Gene flow inferred from seed dispersal and pollinator behaviour compared to DNA analysis of restriction site variation in a patchy population of *Lotus corniculatus* L. *Oecologia* 89: 277-283.
- Rebernik, C. A., G. M. Schneeweiss, K. E. Bardy, P. Schönschwetter, J. L. Villaseñor, R. Obermayer, T. F. Stuessy y H. Weiss-Schneeweiss. 2010. Multiple Pleistocene refugia and Holocene range expansion of an abundant southwestern American desert plant species (*Melampodium leucanthum*, Asteraceae). *Molecular Ecology* 19: 3421-3443.
- Ree, R. H. y S. A. Smith. 2008. Maximum likelihood inference of geographic range evolution by dispersal, local extinction, and cladogenesis. *Systematic Biology*. 57(1): 4-14.
- Romero-Brito, M., E. M. Morales, N. P. Taylor, D. C. Zappi y F. F. Franco. 2016. Lineage-specific evolutionary rate in plants: contributions of a screening for *Cereus* (Cactaceae). *Applications in Plant Sciences* 4(1): 1500074.
- Ronquist, F., M. Teslenko, P. van der Mark, D. L. Ayres, A. Darling, S. Höhna, B. Larget, L. Liu, M. A. Suchard y J. P. Huelsenbeck. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* 61: 539–542.
- Rozas, J., A. Ferrer-Mata, J.C. Sánchez-Del Barrio, S. Guirao-Rico, P. Librado, S.E. Ramos-Onsins y A. Sánchez-García. 2017. DnaSP v6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 34: 3299-3302.

- Ruíz-Sánchez, E., F. Rodríguez-Gómez y V. Sosa. 2012. Refugia and geographic barriers of populations of the desert poppy, *Hunnemannia fumariifolia* (Papaveraceae). *Organisms, Diversity & Evolution* 12: 133-143.
- Rzedowski, J. 2006. Vegetación de México. 1<sup>er</sup> edición digital. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 504 p.
- Rzedowski, J. y T. Reyna-Trujillo. 1990. 'Divisiones florísticas' en Tópicos fitogeográficos (provincias, matorral xerófilo y cactáceas). IV.8.3. Atlas Nacional de México. Vol. II. Instituto de Geografía, UNAM. México.
- Rzedowski, J. 1993. Diversity and origins of the phanerogamic flora of Mexico. *Biological diversity of Mexico: origins and distribution*. Editores: T.P. Ramamoorthy, R. Bye y A. Lot and J. Fa. Oxford University Press, New York. 129–144 pp.
- Salas-Lizana, R. 2013. Estructura genética y recombinación en *Lophodermium*, un hongo endófito de pinos. Tesis de doctorado. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. 155 p.
- Samour-Nieva, O.R., 2012. Efecto nodriza de *Larrea tridentata* y su impacto en la diversidad de especies vegetales perennes en la región del altiplano Potosino, México. Tesis de Maestría. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.
- Scheinvar, E., N. Gámez, G. Castellanos-Morales, E. Aguirre-Planter y L. E. Eguiarte. 2017. Neogene and Pleistocene history of *Agave lechuguilla* in the Chihuahuan Desert. *Journal of Biogeography* 44(2): 322-334.
- Schmitt, J. 1983. Density-dependent pollinator foraging, flowering phenology, and temporal pollen dispersal patterns in *Linanthus bicolor*. *Evolution* 37(6): 1247-1257.
- Shaw, J., E. B. Lickey, J. T. Beck, S. B. Farmer, W. Liu, J. Miller, K. C. Siripun, C. T. Winder, E. E. Schilling y R. L. Small. 2005. The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92(1): 142-166.
- Shaw, J., E. B. Lickey, E. E. Schilling y R. L. Small. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic

- studies in Angiosperms: The tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94(3): 275-288.
- Shaw, J., H. L. Shafer, O. R. Leonard, M. J. Kovach, M. Schorr y A. B. Morris. 2014. Chloroplast DNA sequence utility for the lowest phylogenetic and phylogeographic inferences in Angiosperms: The tortoise and the hare IV. *American Journal of Botany* 101(11): 1987-2004.
- Silva-Montellano, A. y L.E. Eguiarte. 2003. Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. I. Floral characteristics, visitors, and fecundity. *American Journal of Botany* 90(3): 377-387.
- Singh, P. 2015. Population Genetics: An Introduction. In: *Evolutionary Population Genetics of Drosophila ananassae*. Springer, New Delhi. 117 p.
- Soliveres, S. y F. T. Maestre. 2014. Plant-plant interactions, environmental gradients and plant diversity: A global synthesis of community-level studies. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 16: 154-163.
- Sosa, V., E. Ruiz-Sanchez y F. C. Rodriguez-Gomez. 2009. Hidden phylogeographic complexity in the Sierra Madre Oriental: the case of the Mexican tulip poppy *Hunnemannia fumariifolia* (Papaveraceae). *Journal of Biogeography* 36: 18-27.
- Sosa, V., J. A. De-Nova y M. Vásquez-Cruz. 2018. Evolutionary history of the flora of Mexico: Dry forests cradles and museums of endemism. *Journal of Systematics and Evolution* 56 (5): 523-536.
- Stamatakis, A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30(9):1312–1313. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>.
- Strand, A. E., J. Leebens-Mack y G. Miligan. 1997. Nuclear DNA-based markers for plant evolutionary biology. *Molecular Ecology* 6:113-118.
- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou y J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17:1109-1991.

- Tavaré, S. 1986. Some probabilistic and statistical problems on the analysis of DNA sequences. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences* 17: 57–86.
- Templeton, A. R. 2004. Statistical phylogeography: methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology* 13: 789-809.
- Valerio, R. y N, Ramírez. 2003. Depresión exogámica y biológica reproductiva de *Talinum paniculatum* (Jacq.) Gaertner (Portulacaceae). *Acta Botánica Venezuelica* 26(2): 111-124.
- Valiente-Banuet, A. y E. Ezcurra. 1991. Shade as a cause of the association between the cactus *Neobuxbaumia tetetzo* and the nurse plant *Mimosa luisiana* in the Tehuacán valley, Mexico. *Journal of Ecology* 79: 961-971.
- Valiente-Banuet, A., L. Solis-Rojas, P. Dávila, M. Arizmendi, C. Silva P., J. Ortega R., J. Treviño C., S. Rangel-Landa y A. Casas. 2009. Guía de la Vegetación del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. 1<sup>er</sup> edición. México. 208 p.
- Vásquez-Cruz, M. y V. Sosa. 2016. New insights on the origin of the woody flora of the Chihuahuan Desert: The case of *Lindleya*. *American Journal of Botany* 103(9): 1694–1707.
- Vázquez-Domínguez, E. 2007a. ¿Cuál es el enfoque de la ecología molecular? Ejemplos con un ratón espinoso. En: Sánchez-Rojas G. y A. E. Rojas-Martínez (eds). *Tópicos en sistemática, biogeografía, ecología y conservación de mamíferos*: 59-70. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Serie Ciencia al día 1, México.
- Vázquez-Domínguez, E. 2007b. Capítulo 14. Filogeografía de vertebrados. En: Eguiarte L. E., V. Souza y X. Aguirre. *Ecología molecular*. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT. 1er edición. México D.F. 441-461.
- Wakeley, J. 2008. *Coalescent Theory: An Introduction*. Roberts and Company Publishers, Greenwood Village, CO.
- Walker, J. F., Y. Yang, T. Feng, A. Timoneda, J. Mikenas, V. Hutchison, C. Edwards, N. Wang, S. Ahluwalia, J. Olivieri, N. Walker-Hale, L. C. Majure, R. Puente, G. Kadereit, M. Lauterbach, U. Eggli, H. Flores-Olvera, H. Ocheterena, S. F. Brockington, M. J. Moore y S. A. Smith. 2018. *From cacti to carnivores*:

Improved phylotranscriptomic sampling and hierarchical homology inference provide further insight into the evolution of Caryophyllales, *American Journal of Botany* 105(3): 446–462.

Warren, D. L., R. E. Glor y M. Turelli. 2008. Environmental niche equivalency versus conservatism: quantitative approaches to niche evolution. *Evolution*, 62:2868-2883.

Weir, B.S. y C.C Cockerham. 1984 Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.

Wells, P.V. 1966. Late Pleistocene vegetation and degree of pluvial climatic change in the Chihuahuan desert. *Science* 153: 970-975.

Wilson, J. S. y J. P. Pitts. 2010. Illuminating the lack of consensus among descriptions of earth history data in the North American deserts: A resource for biologists. *Progress in Physical Geography: Earth and Environment* 34(4): 419–441.

Yang, Z. y B. Rannala. 1997. Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov chain Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution* 14: 717–724.

Yu, Y., A. J. Harris y X. J. He. 2010. S-DIVA (statistical dispersal-vicariance analysis): a tool for inferring biogeographic histories. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 56(2): 848-850.

Yu, Y., A. J. Harris, C. Blair y X. J. He. 2015. RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies): a tool for historical biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 87:46-49.



**Portada de Anexos**

## **Anexo A. Protocolos empleados para la extracción de ADN**

*Kit de extracción Blood-Animal-Plant DNA Preparation Kit (Jena Bioscience)*

Moler con nitrógeno líquido máximo 0.08 mg de material y ponerlo en un tubo frío.

### **A) Lisis celular**

- Añadir 300  $\mu$ l de Lysis Buffer y 2  $\mu$ l de RNAsa al tejido molido.
- Mezclar en el vortex vigorosamente durante 30-60 segundos.
- Añadir 8 de  $\mu$ l Proteinasa K y mezclar por pipeteo.
- Incubar a 60°C durante 20 minutos y enfriar durante 5 minutos.
- Añadir 300  $\mu$ l de Binding Buffer y mezclar brevemente en el vortex.
- Colocar los tubos en hielo durante 5 minutos.
- Centrifugar durante 5 minutos a 10, 000 g.

### **B) Activación de la columna**

- Colocar una columna en un tubo de ml.
- Agregar 100  $\mu$ l de Activation Buffer en la columna.
- Centrifugar a 10, 000 g durante 30 segundos e inmediatamente proseguir con el siguiente paso.
- Descartar el residuo.

### **C) Cargando la columna**

- Pipetear el sobrenadante directamente en la columna.
- Centrifugar durante 1 minuto a 10, 000 g.
- Descartar los residuos.

### **D) Lavado primario**

- Agregar 500  $\mu$ l de Washing Buffer en la columna.
- Centrifugar durante 30 segundos a 10, 000 g.
- Descartar el sobrenadante.

### **E) Lavado secundario**

- Agregar 500  $\mu$ l de Washing Buffer en la columna.
- Centrifugar durante 30 segundos a 10, 000 g.
- Descartar el sobrenadante.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Centrifugar de nuevo a 10, 000 g durante 2 minutos para remover residuos de Washing Buffer.
  - Descartar el tubo de lavado de 2 ml y colocar la columna en un tubo de elución.

#### F) Elución del ADN

- Agregar 40-50  $\mu$ l de Elution Buffer en el centro de la columna.
- Incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.
- Centrifugar a 10, 000 g por dos minutos.
- Almacenar el ADN a 4°C o -20°C.

#### *CTAB 2X Modificado por L. M. Prince*

#### Extracción

1. Moler 1 x 2 cm (0.01 g de material seco o 0.02 mg de material fresco) en nitrógeno líquido hasta que quede finamente molido.
2. Transferir a un tubo de 1.5 mL (almacenar a -80°C si es necesario).
3. En campana de extracción: Añadir 500  $\mu$ l del buffer de extracción 2X CTAB\* (con 2  $\mu$ l de proteinasa K, 2  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol) y mezclar en el vortex suavemente hasta mezclar bien. Descartar cualquier residuo de CTAB (con o sin  $\beta$ -mercaptoetanol) en el recipiente de residuos peligrosos.
4. Incubar de 20-30 minutos en el baño María a 50°C, invertir cada 5 minutos.
5. Transferir a baño María a 65 °C e incubar otros 15 minutos.
6. Sacar del baño María y dejar que se enfríen las muestras lentamente.
7. En campana de extracción, añadir 500  $\mu$ l 24:1 cloroformo alcohol isoamílico (SEVAG) e invertir para mezclar. Destapar para eliminar gases y volver a tapar.
8. En campana de extracción, Agitar o balancear las muestras por 15 minutos a temperatura ambiente.
9. Centrifugar 10 minutos a 12 500 rpm.
10. En campana de extracción, transferir 400  $\mu$ l del sobrenadante a un tubo nuevo de 2 mL.

## Precipitación

1. Agregar a cada tubo 800-1000  $\mu$ l de Etanol 95% frío, invertir suavemente para precipitar DNA – dejar precipitando hasta 1 hr a  $-20^{\circ}\text{C}$  (si es necesario puede ser más tiempo; para material de herbario precipitar 2-3 semanas).
2. Centrifugar 10 minutos a 12 500 rpm para empastillar el precipitado.
3. Descartar el sobrenadante.
4. Lavar la pastilla agregando 500  $\mu$ l de buffer de lavado o Etanol 80% y agitando por 10 minutos.
5. Centrifugar 5 minutos a 12 500 rpm y descartar el sobrenadante.
6. Colocar los tubos con la tapa abierta en la incubadora de 10-20 minutos (con 5 minutos de calor) para secarlos (si es necesario, más tiempo).
7. Re suspender en 100  $\mu$ l de buffer TE (incubar 10 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  en baño María).

*CTAB 2X Modificado por Cota-Sánchez et al., 2006*

## Reactivos y soluciones

- CTAB buffer de extracción (2 $\times$  CTAB: 50 mL of 1.0 tris-HCl, pH 8, 140 mL of 5 M NaCl, 50 mL of 0.25 M EDTA pH 8, 10 g of CTAB, agua destilada to 500 mL)
- 2-mercaptoethanol
- Cloroformo:isoamílico alcohol (SEVAG), 24:1
- Isopropanol
- Tris-EDTA (TE)
- RNasa, 10 mg/ml
- Oxalacetato de sodio (NaOAc), 2.5 M
- Etanol al 70% y 95%

- 1) Agregar 750  $\mu$ l de buffer 2X CTAB y 3  $\mu$ l de 2-mercaptoetanol a tubos Eppendorf.
- 2) Moler 0.5-1 g de tejido con nitrógeno líquido y sal estéril hasta moler finamente.
- 3) Añadir una punta de espátula de tejido molido a cada tubo y mezclar bien.

- 4) Incubar en baño María a 55-60 °C durante 1-5 hrs, mezclando cada 15 minutos.
- 5) Añadir 700 µl de SEVAG a cada tubo y mezclar rigurosamente. Centrifugar a 9240 g durante 10-15 minutos. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo.
- 6) Agregar 0.33 vol de isopropanol frío y almacenar a -30°C durante al menos 1 hr.
- 7) Centrifugar a 9, 240-13, 305 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Descartar sobrenadante sin perturbar la pastilla. Secar al vacío. Repetir los pasos 6 y 7 dos o cuatro veces si la fase acuosa es viscosa.
- 8) Re suspender la pastilla en 100-200 µl de TE. Agregar 1-2 µl de RNAsa a 10 mg/ml. Mezclar bien e incubar durante 30 minutos a 37 °C.
- 9) Agregar 20 µl (0.1 vol) de 2.5 M NaOAc y 500 µl (2-2.5 vol) de etanol frío al 95% y almacenar a -20 °C durante ≥30 minutos. Centrifugar a 9240 – 13305 g durante 5 minutos. Descartar sobrenadante.
- 10) Lavar la pastilla con 1 ml de etanol al 70%. No perturbar la pastilla. Centrifugar a 9240 g durante 4 minutos y remover el etanol. Secar al vacío la pastilla. No muy seca.
- 11) Re suspender la pastilla en ~100-200 µl de TE. Almacenar a -20°C.
- 12) Correr el DNA en gel de agarosa al 1%.

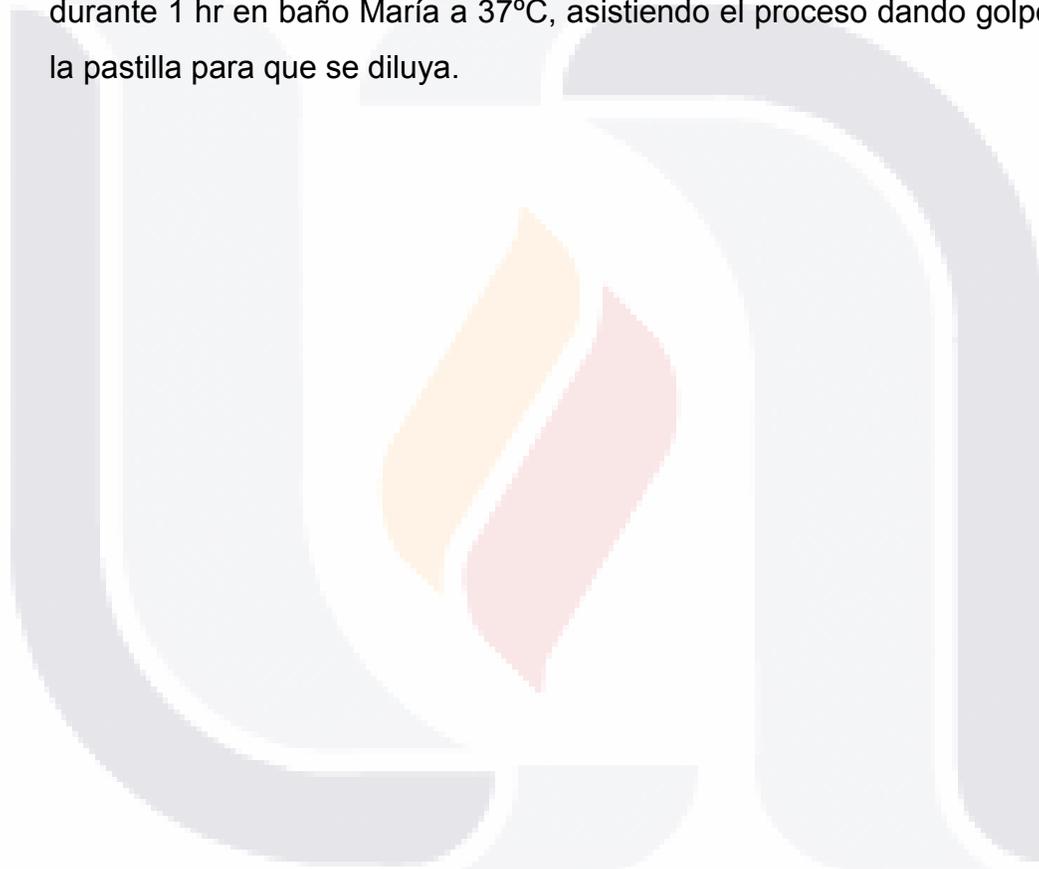
*CTAB 2X Beck et al., 2012, modificado por M. Miguel y B. Park*

#### Reactivos y soluciones

- CTAB buffer (20 ml): (6 ml CTAB 10% en H<sub>2</sub>O o 0.2 g de CTAB, 5.6 ml 5M NaCl, 0.8 ml 0.5M EDTA (pH 8), 2 ml 1M Tris Cl (pH 8), 4.96 µl H<sub>2</sub>O grado molecular (o dd), 40 µl β-mercaptoetanol).
- Viscozyme L
- PVP
- RNAsa

- 1) Moler de 0.01-0.04 g, en un Disruptor o en un mortero empleando nitrógeno líquido; si la muestra se pulveriza fácilmente, no es necesario el nitrógeno líquido.
- 2) Agregar a cada muestra 300 µl de Buffer de digestión (5% Viscozyme L + 95% Buffer TE). Mezclar en el vortex. Incubar a 37 °C durante 2-3 hrs.
- 3) Retirar del baño maría y añadir 500 µl de CTAB buffer + β-mercaptoetanol + PVP; mezclar en el vortex.
- 4) Incubar a 65 °C durante 1 hr, invirtiendo las muestras de vez en cuando. Después de la incubación dejar enfriar las muestras a temperatura ambiente durante 15 minutos.
- 5) Agregar 3 µl de RNAsa (100ng/µl) a cada tubo. Incubar a 37°C durante 1 hora, invirtiendo las muestras de vez en cuando.
- 6) En campana de flujo, añadir 500 µl de (24:1) cloroformo: alcohol isoamílico. Agitar vigorosamente con la mano durante algunos minutos para formar una emulsión.
- 7) Centrifugar 20 minutos a 14, 000 rpm.
- 8) Recuperar la fase acuosa (superior) y transferir a un tubo nuevo previamente etiquetado. Desechar los tubos con restos de cloroformo en el recipiente de residuos peligrosos.
- 9) Añadir un volumen igual al recuperado de isopropanol frío.
- 10) Mezclar/invertir los tubos para precipitar.
- 11) Incubar a -20°C toda la noche. \*Para algunos taxa basta con precipitar durante 2-4 horas, pero para otras, como *Talinopsis* o material de herbario, es necesario al menos de una noche a varios días.
- 12) Centrifugar durante 20 minutos a 14,000 rpm (de preferencia a -4°C).
- 13) Descartar el isopropanol, tratando de que quede lo menos posible en el interior del tubo. Se puede emplear una toalla de papel para absorber lo que quede en el borde.
- 14) Lavar las pastillas que debieron de formarse en el fondo del tubo añadiendo 500 µl de etanol frío al 80%; invertir/agitar los tubos para desprender la pastilla del fondo.

- 15) Centrifugar durante 10 minutos a 14, 000 rpm.
- 16) Descartar el etanol mediante el mismo procedimiento que en el paso 13.
- 17) Repetir los pasos 14-16.
- 18) Después del segundo lavado con etanol al 80%, destapar los tubos y dejarlos dentro de la campana de flujo durante 45-60 minutos, para que se evaporen los restos de etanol y secar la pastilla.
- 19) Re suspender la pastilla en 50-60  $\mu$ l de TE o dd H<sup>2</sup>O y encubar la solución durante 1 hr en baño María a 37°C, asistiendo el proceso dando golpecitos a la pastilla para que se diluya.



**Anexo B. Registros de GenBank de las secuencias usadas como grupos externos en los diferentes análisis.**

| <b>Especie</b>                  | <b>ITS</b> | <b>Intrón <i>rpL16</i></b> | <b><i>trnS-trnG</i></b> |
|---------------------------------|------------|----------------------------|-------------------------|
| <i>Anacampseros australiana</i> | L78013.1   | -                          | -                       |
| <i>Anacampseros recurvata</i>   | L78014.1   | -                          | -                       |
| <i>Anacampseros kurtzii</i>     | L78063.1   | -                          | -                       |
| <i>Anacampseros vulcanensis</i> | L78060.1   | -                          | -                       |
| <i>Grahamia bracteata</i>       | L78028.1   | -                          | -                       |
| <i>Pereskia aculeata</i>        | JF508526.1 | HM041494.1                 | -                       |
| <i>Portulaca oleracea</i>       | L78047.1   | NC_036236.1                | NC_036236.1             |
| <i>Portulaca oleracea</i>       | HM116408.1 | -                          | -                       |
| <i>Portulaca oleracea</i>       | HM116407.1 | -                          | -                       |
| <i>Talinum paniculatum</i>      | JF508608.1 | MG7100385                  | MG7100385               |
| <i>Talinum paniculatum</i>      | L78094.1   | -                          | -                       |
| <i>Talinum paniculatum</i>      | EU410357.1 | -                          | -                       |

## **Anexo C. Fuentes de datos.**

*Bases de datos de biodiversidad:* GBIF= Global Biodiversity Information Facility (<https://www.gbif.org>); REMIB= Red Mundial de Información sobre Biodiversidad-Conabio ([http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/remib\\_esp.html](http://www.conabio.gob.mx/remib/doctos/remib_esp.html)); SP= Sernece Portal (<http://serneceportal.org/portal/>); UNIBIO= Unidad de Informática para la Biodiversidad, Universidad Nacional Autónoma de México (<http://unibio.unam.mx>).  
*Herbarios:* ANSM (Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Mexico); CIIDIR (Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR Unidad Durango, Mexico); HUAA (Universidad Autónoma de Aguascalientes, Mexico); IEB (Instituto de Ecología, A.C., Centro Regional del Bajío, Mexico); INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, Mexico); MEXU (Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico); RSA (Rancho Santa Ana Botanic Garden, U.S.A.); UAZ (Universidad Autónoma de Zacatecas, Mexico). *Otros:* s.n.= sin número; \* = los números precedidos por un asterisco corresponden a los números de folio de los ejemplares de herbario.

### ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

**Nuevo Mexico.** *Doña Ana:* P. J. Alexander 941 (SP); F. R. Fosberg 53581 (RSA); R. D. Worthington 14310, 17204, 17214 (SP). *Otero:* E. Ward and R. Soreng 81/545 (SP). **Texas.** *Brewster:* A. M. Powell and B. Turner 6457 (SP); Sherman et al. 123 (GBIF). *Culberson:* Y. Chauvin 07YC027-DS11 (SP); R. D. Worthington 23377 (SP). *El Paso:* R. D. Worthington 19892 (SP); R. D. Worthington 18335 (SP); R. D. Worthington 18345 (SP); R. D. Worthington 25171 (SP). *Hudspeth:* R. D. Worthington s.n. (SP). *Presidio:* W. R. Carr 31783 (SP); E. J. Lott et al. 4717 (SP); A. C. Sanders 4169 (SP); R. D. Worthington 22592 (RSA).

### MÉXICO

**Aguascalientes.** *Aguascalientes:* M. de la Cerda 1216 (HUAA); G. García 4516 (HUAA); G. González A. 310 (HUAA); G. Ocampo A. 1949 (HUAA). *Asientos:* G. García 5490a (HUAA). *Calvillo:* M. de la Cerda and G. García 1119 (HUAA); G. González A. 1073 (HUAA); M. C. Macías 311 (HUAA). *Cosío:* M. E. Siqueiros D. 2510 (HUAA). *Jesús María:* M. de la Cerda 6232 (HUAA); G. García 5453 (HUAA). *Rincón de Romos:* M. de la Cerda 1608 (HUAA); G. García 5526 (HUAA). *San José*

de Gracia: M. de la Cerda and G. García 1058 (HUAA). **Chihuahua.** *Ahuamada:* E. Lehto et al. L-21487 (S. P.). *Aldama:* M. Miguel V. et al. 771, 772 (HUAA); C. Yen and E. Estrada 8693 (ANSM). *Allende:* E. Aldrete M. s.n. (INEGI). *Aquiles Serdán:* E. Lehto et al. L-21555 (SP). *Ascención:* V. M. López S. V5.4 (INEGI). *Camargo:* R. Aguirre C. s.n. (INEGI). *Jiménez:* J. Henrickson 5954b (MEXU); M. Miguel V. et al. 773 (HUAA). **Coahuila.** *Múzquiz:* R. Morán 6264 (MEXU). *Ramos Arizpe:* J. A. Villarreal and M. A. Carranza 4526 (ANSM). *Torreón:* E. Estrada 20689 (ANSM). **Durango.** *Gómez Palacio:* H. S. Gentry and R. G. Engard 23096 (GBIF); M. Miguel V. et al. 774 (HUAA). *Guadalupe Victoria:* H. S. Gentry 8401 (RSA). *Hidalgo:* M. Miguel V. et al. 770 (HUAA); E. Morales 14 (CIIDIR). *Lerdo:* H. H. Iltis 101 (UNIBIO); M. C. Johnston et al.\*258619 LL (REMIB); J. A. Villarreal\*258615 TEX (REMIB). *Mezquital:* M. C. González G. 652 (CIIDIR); Y. Herrera 137 (CIIDIR); M. Miguel V. et al. 768 (HUAA). *Nuevo Ideal:* N. Almaraz A. 39 (CIIDIR); M. Miguel V. et al. 769 (HUAA). *Santiago Papasquiaro:* R. Corral D. and R. D. Worthington 500 (GBIF). *Tlahualilo:* A. García A. 3009, 3048, 3255, 3340, 3737 (CIIDIR). **Guanajuato.** *Comonfort:* S. Zamudio 5663 (RSA). *Dolores Hidalgo:* M. Miguel V. et al. 756 (HUAA); R. Ocampo 51 (IEB); E. Ventura and E. López 6068 (IEB). *Ocampo:* E. Carranza and L. Torres R. 4107 (IEB); M. Miguel V. et al. 755 (HUAA); J. Rzedowski 52260 (IEB). *San Diego de la Unión:* J. Rzedowski 52110 (IEB). *San Felipe:* J. Rzedowski 38658, 43650 (IEB). *San José Iturbide:* J. Gutiérrez G. and A. Ramírez 152, 386 (IEB). *San Luis de la Paz:* J. N. Labat and E. Carranza G. 2525 (GBIF); M. Miguel V. et al. 757 (HUAA); E. Ventura 9372 (IEB); S. Zamudio R. et al. 11599 (IEB). *San Miguel de Allende:* G. Ocampo A. and N. Sandoval 1937 (HUAA). *Tarimoro:* J. Rzedowski 40538 (IEB). *Victoria:* M. Miguel V. et al. 758 (HUAA). **Hidalgo.** *Ajacuba:* M. Miguel V. et al. 762 (HUAA). *Epazoyucan:* J. Rzedowski S.N. (REMIB). *Tizayuca:* M. E. Castilla and D. Tejero s.n. (REMIB). **Jalisco.** *Lagos de Moreno:* R. McVaugh s.n. (REMIB); M. Miguel V. et al. 754 (HUAA). *Ojuelos de Jalisco:* P. Carrillo-Reyes et al. 465, 505 (IEB); G. López D. et al. 17 (IEB). **Nuevo León.** *Aramberri:* GSH s.n.(GBIF); M. Miguel V. et al. 775 (HUAA). *Galeana:* Hinton et al. 25675 (IEB); s.n. (REMIB). *Rayones:* Hinton et al. 20816 (GBIF). *Santa Catarina:* J. A. Villarreal and D. Jasso 9055 (GBIF). **Puebla.** *San José Miahuatlán:* F. Chiang C. F-2236 (MEXU);

M. Miguel V. et al. 764 (HUAA); A. Salinas T. 4070 (MEXU). *Zapotitlán*: M. Miguel V. et al. 763 (HUAA). **Querétaro**. *Cadereyta de Montes*: M. Miguel V. et al. 760 (HUAA); O. Rubio G. 329 (IEB); S. Zamudio R. 3183 (IEB). *Colón*: J. Rzedowski 48818 (IEB); S. Zamudio R. 7383 (IEB). *El Marqués*: G. Ocampo and D. García 1003 (IEB). *Peñamiller*: M. Miguel V. et al. 759 (HUAA); G. Ocampo A. and E. Pérez C. 1024 (RSA); S. Zamudio R. 3689 (IEB). *San Juan del Río*: M. Miguel V. et al. 765 (HUAA). *Tequisquiapan*: M. Miguel V. et al. 761 (HUAA). *Tolimán*: G. Ocampo A. and E. Pérez C. 1218 (RSA); S. Zamudio R. 12200 (IEB). **San Luis Potosí**. *Ciudad Fernández*: F. Chiang et al. 8205 (GBIF). *Guadalcázar*: McGill et al. P-13527 (SP); O. J. Soto A. s.n. (INEGI). *Salinas de Hidalgo*: G. Ocampo A. et al. 1943 (HUAA). *Santa María del Río*: V. W. Steinmann et al. 3777 (IEB). *Villa de Reyes*: J. A. Villarreal and J. Zavala B. 8449 (GBIF); J. García et al. 1277 (GBIF). *Zaragoza*: T. Reeves R-6274 (GBIF). **Zacatecas**. *Cañitas de Felipe Pescador*: J. J. Balleza and M. Adame G. 13557 (GBIF). *Cuauhtémoc*: M. Miguel V. et al. 766 (HUAA). *Fresnillo*: M. Miguel V. et al. 767 (HUAA); E. J. Rodríguez-Pérez 1610 (UAZ). *Guadalupe*: E. J. Rodríguez-Pérez 894 (UAZ). *Loreto*: J. J. Balleza and M. Adame G. 13944 (GBIF). *Luis Moya*: E. J. Rodríguez-Pérez 1603 (UAZ). *Mazapil*: F. Chiang C. et al. 7911 (GBIF); M. Miguel V. et al. 776 (HUAA); E. J. Rodríguez-Pérez 1641 (UAZ). *Melchor Ocampo*: M. C. Johnson et al. 11536-B (GBIF). *Ojocaliente*: E. J. Rodríguez-Pérez 1604 (UAZ). *Pinos*: M. Miguel V. et al. 778 (HUAA). *Río Grande*: F. Chiang C. et al. 10422-A (GBIF); E. J. Rodríguez-Pérez 1606, 1607 (UAZ). *Trancoso*: G. Ocampo A. et al. 1948 (HUAA). *Villa de Cos*: McGill et al. P-13505 (SP). *Villa García*: J. J. Balleza and M. Adame G. 14051 (GBIF). *Villa Hidalgo*: E. J. Rodríguez-Pérez 1608, 1609 (UAZ).

ANEXO D. Otros productos del proyecto. Artículo de divulgación científica.

MÓNICA I. MIGUEL-VÁZQUEZ<sup>1</sup> & GILBERTO OCAMPO<sup>1,\*</sup>

## Knowing more about *Talinopsis frutescens* (arroyo fameflower)

a North American endemic succulent species

**S**pring is coming in Mexico and in many arid areas of the country a small, woody succulent shrub can be found that usually escapes the eye. Before the rainy season, it looks like a bunch of dry stems with some old fruit at their tips. A limited number of people have observed its flowers in the field. We are talking about *Talinopsis frutescens* A. Gray, the arroyo fameflower, a succulent plant that belongs to Anacampserotaceae (Fig. 1), the only known species of the genus. *Talinopsis frutescens* inhabits arid regions of North America and represents the earliest-divergent lineage of this spectacular flowering plant family that has its highest species richness in South Africa (Nyffeler & Eggli 2010; Ocampo & Columbus 2010).

This peculiar species is distributed from southern United States to the Tehuacán-Cuicatlán Valley in Mexico. Although it is a relatively widespread species, there is scarce information about this plant, especially limited to the taxonomic field (e.g., Correll & Johnston 1970; Rzedowski 2005; Kiger 2003; Ocampo 2010, 2011). Now, after two collection trips (ca. 20 days in total) during the summer of 2016 in 10 Mexican states (Fig. 2), we obtained additional information about this species.

*Talinopsis frutescens* exhibits specific associations with other plants, and also with rocks, which seem to promote germination and growth of seedlings. Some of its associated plants are shrubs, mainly creosote bushes (*Larrea tridentata* (DC.) Coville), *Opuntia* spp., and/or feverfew (*Parthenium* sp.) bushes (Fig. 3). These plants seem to provide shade and protection against herbivory, which is extremely important in environments where *T. frutescens*



1. Individual of *Talinopsis frutescens* in flower.

<sup>1</sup>Departamento de Biología, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Avenida Universidad 940, Ciudad Universitaria, C.P. 20131, Aguascalientes, Ags., Mexico. Corresponding author: email: gocompo@correo.uaa.mx

**ANEXO E. Condiciones de los programas de termociclador empleados para amplificar los marcadores probados y empleados en el presente estudio. En negritas los marcadores que se emplearon para amplificar todas las muestras.**

| Genoma de origen | Marcador                  | Condiciones del termociclador |                  |                    |                                                         |                         |                     |
|------------------|---------------------------|-------------------------------|------------------|--------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------|
|                  |                           | Desnaturalización inicial     | Número de ciclos | Desnaturalización  | Alineamiento                                            | Extensión               | Extensión final     |
| Núcleo           | G3PDH                     | 95°C, 2 min                   | 35               | 95°C, 1 min        | 56°C, 1 min 30 s                                        | 72°C, 2 min             | 72°C, 9 min         |
|                  | ITS (1)                   | 94°C, 4 min                   | 35               | 94°C, 1 min        | 52°C, 1 min                                             | 72°C, 1 min 30s         | 72°C, 7 min         |
|                  | <b>ITS (2)</b>            | <b>94°C, 4 min</b>            | <b>34</b>        | <b>94°C, 30 s</b>  | <b>55°C, 40 s</b>                                       | <b>72°C, 1 min</b>      | <b>72°C, 10 min</b> |
|                  | Tpi                       | 94°C, 10 min                  | 35               | 94°C, 1 min        | 50-58 °C, 1 min                                         | 72°C, 1 min             | 72°C, 10 min        |
| Cloroplasto      | <b>intrón <i>rp16</i></b> | <b>80°C, 4 min</b>            | <b>30</b>        | <b>95°C, 1 min</b> | <b>50°C, 1 min con una rampa de 0.3 °C/s hasta 65°C</b> | <b>65°C, 2 min 15 s</b> | <b>65°C, 5 min</b>  |
|                  | <i>ndhF-rpL32</i>         | 80°C, 5 min                   | 35               | 95°C, 1 min        | 55°C, 1 min con una rampa de 0.3 °C/s hasta 65°C        | 65°C, 5 min             | 65°C, 4 min         |
|                  | <i>petL-psbE</i>          | 80°C, 5 min                   | 35               | 95°C, 1 min        | 55°C, 1 min con una rampa de 0.3 °C/s hasta 65°C        | 65°C, 5 min             | 65°C, 4 min         |
|                  | <i>psbJ-petA</i>          | 80°C, 5 min                   | 30               | 95°C, 1 min        | 50°C, 1 min con una rampa de 0.3 °C/s hasta 65°C        | 65°C, 4 min             | 65°C, 5 min         |
|                  | <i>rpL32-trnL</i>         | 80°C, 5 min                   | 35               | 95°C, 1 min        | 55°C, 1 min con una rampa de 0.3 °C/s hasta 65°C        | 65°C, 5 min             | 65°C, 4 min         |
|                  | <i>trnL-trnF</i>          | 94°C, 4 min                   | 35               | 94°C, 1 min        | 52°C, 1 min                                             | 72°C, 2 min             | 72°C, 10 min        |
|                  | <i>trnS-trnG-trnG</i>     | 80°C, 5 min                   | 30               | 95°C, 1 min        | 50°C, 1 min con una rampa de 0.3 °C/s hasta 65°C        | 65°C, 4 min             | 65°C, 5 min         |
|                  | <b><i>trnS-trnG</i></b>   | <b>80°C, 4 min</b>            | <b>30</b>        | <b>95°C, 1 min</b> | <b>50°C, 1 min con una rampa de 0.3 °C/s hasta 65°C</b> | <b>65°C, 2 min 15 s</b> | <b>65°C, 5 min</b>  |

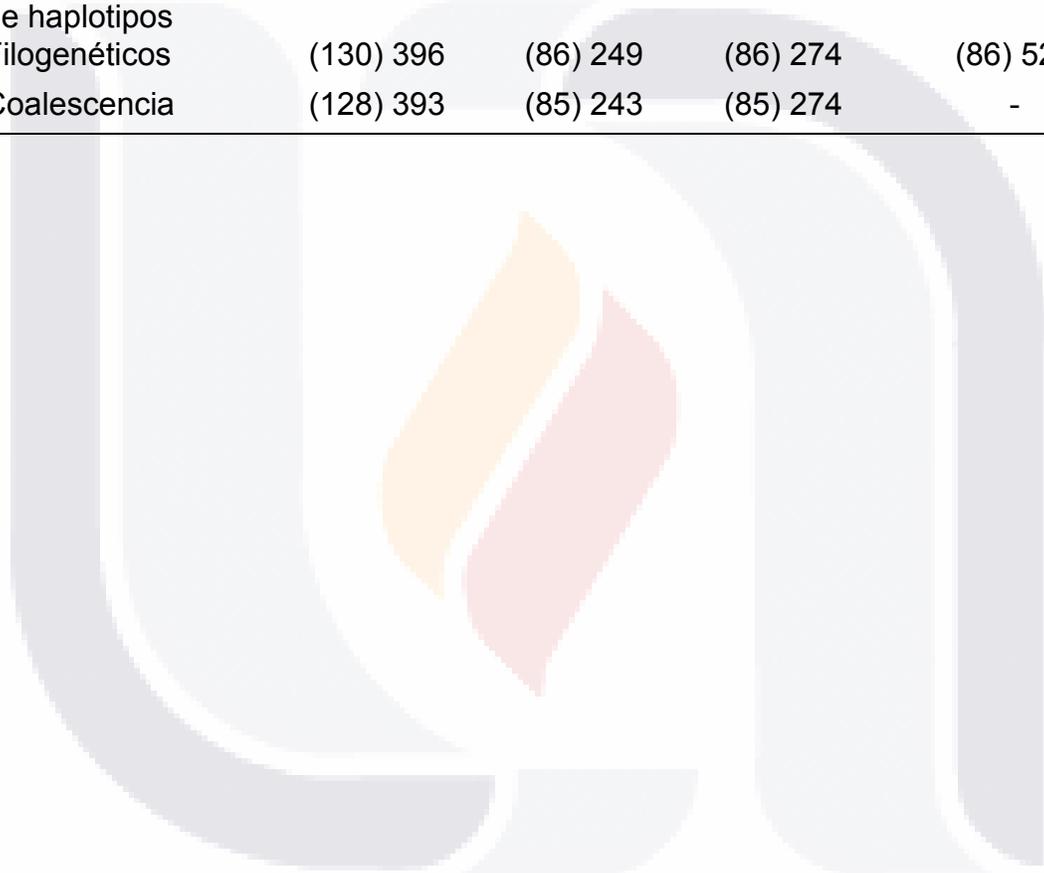
**ANEXO F. Kits de PCR y volúmenes de reactivos empleados para amplificar las regiones de interés en este estudio.**

| Reactivos ( $\mu$ l) | Kits de PCR                                |                              |                                   |                                |
|----------------------|--------------------------------------------|------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|
|                      | High Fidelity Polymerase (Jena Bioscience) | PCR direct (Jena Bioscience) | PCR Master Mix 2X (Thermo Fisher) | Taq Core kit (Jena Bioscience) |
| Buffer               | 1.25                                       | -                            | -                                 | 1.25                           |
| Mix                  | -                                          | 6.25                         | 6.25                              | -                              |
| dNTP's               | 0.25                                       | -                            | -                                 | 0.25                           |
| Oligo F              | 0.625                                      | 0.625                        | 0.625                             | 0.625                          |
| Oligo R              | 0.625                                      | 0.625                        | 0.625                             | 0.625                          |
| MgCl                 | 0.25                                       | -                            | -                                 | 0.25                           |
| BSA                  | 0.5                                        | 0.5                          | 0.5                               | 0.5                            |
| DMSO                 | 0.625                                      | 0.625                        | 0.625                             | 0.625                          |
| Agua                 | 6.25                                       | 2.8756                       | 1.875                             | 6.325                          |
| Taq                  | 0.1225                                     | -                            | -                                 | 0.05                           |
| ADN                  | 2                                          | 1                            | 2                                 | 2                              |
| Volumen final=       | 12.5 $\mu$ l                               |                              |                                   |                                |

NOTA: Los reactivos y volúmenes incluidos en la tabla fueron empleados para amplificar la región de núcleo (ITS); para amplificar las regiones de cloroplasto (intrón *rpL16* y espaciador intergénico *trnS-trnG*) no se utilizó DMSO y dicho volumen se sustituyó con agua.

**Anexo G. Longitud de las matrices empleadas para cada tipo de análisis realizado en este estudio.** Dentro de los paréntesis se indica el número de secuencias incluidas en cada una de las matrices.

| Análisis                                              | Longitud de las matrices empleadas (pb) |                     |                  |                                                    |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------|------------------|----------------------------------------------------|
|                                                       | ITS                                     | intrón <i>rpL16</i> | <i>trnS-trnG</i> | Cloroplasto<br>(intrón<br><i>rpL16+trnS-trnG</i> ) |
| Diversidad genética poblacional / Redes de haplotipos | (122) 390                               | (83) 213            | (83) 268         | (83) 481                                           |
| Filogenéticos                                         | (130) 396                               | (86) 249            | (86) 274         | (86) 523                                           |
| Coalescencia                                          | (128) 393                               | (85) 243            | (85) 274         | -                                                  |



Anexo H. Valores obtenidos para cada uno de los *K* propuesto en el análisis de SAMOVA.

| <i>K</i> | ITS         |                              |                 |                       |                       |                       | Cloroplasto |                              |                 |                       |                       |                       |
|----------|-------------|------------------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-------------|------------------------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
|          | Entre pobl. | Entre pobl. dentro de grupos | Dentro de pobl. | <i>F<sub>SC</sub></i> | <i>F<sub>ST</sub></i> | <i>F<sub>CT</sub></i> | Entre pobl. | Entre pobl. dentro de grupos | Dentro de pobl. | <i>F<sub>SC</sub></i> | <i>F<sub>ST</sub></i> | <i>F<sub>CT</sub></i> |
| 2        | 39.63       | 25.06                        | 35.31           | 0.41506***            | 0.64687***            | 0.39631*              | 52.48       | 15.81                        | 29.9            | 0.34586***            | 0.70096***            | 0.54284*              |
| 3        | 44.10       | 19.51                        | 36.39           | 0.34896***            | 0.63606***            | 0.44099***            | 54.29       | 12.2                         | 33.51           | 0.26697***            | 0.6649***             | 0.54286**             |
| 4        | 42.28       | 17.99                        | 38.73           | 0.31724***            | 0.61273***            | 0.43279***            | 52.54       | 11.78                        | 35.68           | 0.24825***            | 0.64323***            | 0.52541***            |
| 5        | 45.42       | 12.42                        | 42.16           | 0.22758***            | 0.57844***            | 0.45423***            | 50.59       | 10.41                        | 39              | 0.21063***            | 0.60998***            | 0.50591**             |
| 6        | 47.60       | 5.25                         | 47.15           | 0.10019***            | 0.52847***            | 0.47597***            | 50.67       | 8.58                         | 40.74           | 0.17401***            | 0.59256***            | 0.50672***            |
| 7        | 49.14       | 1.02                         | 49.84           | 0.02003***            | 0.50157***            | 0.49138***            | 48.07       | 8.16                         | 43.77           | 0.15711***            | 0.56229***            | 0.48071***            |
| 8        | 50.58       | -1.03                        | 50.45           | -0.02088***           | 0.49552***            | 0.50584***            | 49.99       | -4                           | 54.01           | -0.07994              | 0.4599***             | 0.49988***            |
| 9        | 51.54       | -2.36                        | 50.82           | -0.04875***           | 0.49175***            | 0.51538***            | 51.14       | -5.15                        | 54.01           | -0.10535              | 0.45987***            | 0.51135***            |
| 10       | 53.00       | -4.04                        | 51.04           | -0.08605*             | 0.4896***             | 0.53004***            | 52.66       | -6.7                         | 54.04           | -0.14157              | 0.45956***            | 0.52658***            |
| 11       | 54.21       | -5.26                        | 51.05           | -0.11477 ns           | 0.48953***            | 0.54209***            | 53.45       | -8.06                        | 54.61           | -0.17304              | 0.45392***            | 0.53447***            |
| 12       | 55.66       | -6.83                        | 51.16           | -0.15397**            | 0.48839***            | 0.55665***            | 53.45       | -8.21                        | 54.76           | -0.17646              | 0.45239***            | <b>0.53453***</b>     |
| 13       | 56.47       | -8.42                        | 51.95           | -0.19332 ns           | 0.48052***            | 0.56467***            | 53.18       | -9.11                        | 55.93           | -0.19452              | 0.44073***            | 0.53181***            |
| 14       | 56.61       | -8.74                        | 52.12           | -0.20144 ns           | 0.47875***            | <b>0.56615***</b>     | 53.41       | -9.91                        | 56.5            | -0.21263*             | 0.435***              | 0.53407***            |
| 15       | 56.52       | -8.93                        | 52.41           | -0.20548 ns           | 0.47589***            | 0.56523***            | 54.03       | -11.47                       | 57.44           | -0.24954              | 0.42555***            | 0.54027***            |
| 16       | 56.37       | -9.55                        | 53.18           | -0.21889 ns           | 0.46825***            | 0.56374***            | 54.3        | -11.9                        | 57.59           | -0.26032              | 0.42405***            | 0.54302***            |
| 17       | 56.51       | -10.23                       | 53.72           | -0.23524 ns           | 0.4628***             | 0.5651***             | 54.77       | -12.52                       | 57.74           | -0.27677              | 0.42258***            | 0.54775***            |
| 18       | 56.98       | -10.88                       | 53.90           | -0.25298 ns           | 0.46102***            | 0.56984***            | 55.13       | -13.39                       | 58.25           | -0.29835              | 0.41749***            | 0.55134***            |
| 19       | 58.40       | -12.58                       | 54.18           | -0.30233 ns           | 0.45823***            | 0.584***              | 56.11       | -14.51                       | 58.39           | -0.3305               | 0.41605***            | 0.56111**             |
| 20       | 59.23       | -13.59                       | 54.36           | -0.33333 ns           | 0.45644***            | 0.59233**             | 58.45       | -17                          | 58.55           | -0.409                | 0.41449***            | 0.58445**             |

\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.0001; ns= no significativo.

**Anexo I. Comparaciones pareadas entre las variables climáticas de Bioclim.**

**Último Interglacial (LIG)**

|       | BIO1   | BIO2   | BIO3   | BIO4   | BIO5   | BIO6   | BIO7   | BIO8   | BIO9   | BIO10  | BIO11  | BIO12  | BIO13  | BIO14  | BIO15  | BIO16  | BIO17  | BIO18  | BIO19  |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| BIO1  | 1      | -0.486 | 0.300  | -0.379 | 0.193  | 0.801  | -0.524 | 0.549  | 0.507  | 0.551  | 0.845  | 0.245  | 0.286  | 0.079  | 0.142  | 0.257  | 0.084  | 0.227  | 0.156  |
| BIO2  | -0.486 | 1      | -0.027 | 0.283  | 0.278  | -0.517 | 0.515  | 0.013  | -0.307 | -0.177 | -0.464 | -0.565 | -0.393 | -0.525 | 0.258  | -0.383 | -0.529 | -0.304 | -0.566 |
| BIO3  | 0.300  | -0.027 | 1      | -0.946 | -0.684 | 0.711  | -0.842 | 0.172  | 0.161  | -0.575 | 0.736  | 0.316  | 0.590  | -0.349 | 0.721  | 0.586  | -0.404 | 0.584  | -0.050 |
| BIO4  | -0.379 | 0.283  | -0.946 | 1      | 0.753  | -0.819 | 0.954  | -0.150 | -0.248 | 0.559  | -0.813 | -0.462 | -0.676 | 0.184  | -0.637 | -0.675 | 0.231  | -0.653 | -0.153 |
| BIO5  | 0.193  | 0.278  | -0.684 | 0.753  | 1      | -0.340 | 0.699  | 0.328  | 0.030  | 0.854  | -0.307 | -0.462 | -0.546 | -0.010 | -0.347 | -0.563 | 0.033  | -0.539 | -0.282 |
| BIO6  | 0.801  | -0.517 | 0.711  | -0.819 | -0.340 | 1      | -0.910 | 0.411  | 0.503  | -0.016 | 0.979  | 0.385  | 0.531  | -0.073 | 0.446  | 0.512  | -0.099 | 0.485  | 0.208  |
| BIO7  | -0.524 | 0.515  | -0.842 | 0.954  | 0.699  | -0.910 | 1      | -0.168 | -0.369 | 0.389  | -0.879 | -0.496 | -0.644 | 0.051  | -0.492 | -0.637 | 0.089  | -0.606 | -0.282 |
| BIO8  | 0.549  | 0.013  | 0.172  | -0.150 | 0.328  | 0.411  | -0.168 | 1      | 0.130  | 0.360  | 0.433  | -0.082 | 0.087  | -0.244 | 0.351  | 0.061  | -0.285 | 0.154  | -0.310 |
| BIO9  | 0.507  | -0.307 | 0.161  | -0.248 | 0.030  | 0.503  | -0.369 | 0.130  | 1      | 0.246  | 0.468  | 0.138  | 0.109  | 0.063  | 0.023  | 0.102  | 0.096  | 0.013  | 0.362  |
| BIO10 | 0.551  | -0.177 | -0.575 | 0.559  | 0.854  | -0.016 | 0.389  | 0.360  | 0.246  | 1      | 0.027  | -0.213 | -0.364 | 0.216  | -0.433 | -0.390 | 0.256  | -0.402 | -0.012 |
| BIO11 | 0.845  | -0.464 | 0.736  | -0.813 | -0.307 | 0.979  | -0.879 | 0.433  | 0.468  | 0.027  | 1      | 0.405  | 0.558  | -0.073 | 0.464  | 0.538  | -0.100 | 0.505  | 0.174  |
| BIO12 | 0.245  | -0.565 | 0.316  | -0.462 | -0.462 | 0.385  | -0.496 | -0.082 | 0.138  | -0.213 | 0.405  | 1      | 0.892  | 0.587  | -0.027 | 0.907  | 0.557  | 0.822  | 0.623  |
| BIO13 | 0.286  | -0.393 | 0.590  | -0.676 | -0.546 | 0.531  | -0.644 | 0.087  | 0.109  | -0.364 | 0.558  | 0.892  | 1      | 0.234  | 0.389  | 0.986  | 0.179  | 0.933  | 0.349  |
| BIO14 | 0.079  | -0.525 | -0.349 | 0.184  | -0.010 | -0.073 | 0.051  | -0.244 | 0.063  | 0.216  | -0.073 | 0.587  | 0.234  | 1      | -0.636 | 0.236  | 0.946  | 0.194  | 0.650  |
| BIO15 | 0.142  | 0.258  | 0.721  | -0.637 | -0.347 | 0.446  | -0.492 | 0.351  | 0.023  | -0.433 | 0.464  | -0.027 | 0.389  | -0.636 | 1      | 0.357  | -0.720 | 0.389  | -0.424 |
| BIO16 | 0.257  | -0.383 | 0.586  | -0.675 | -0.563 | 0.512  | -0.637 | 0.061  | 0.102  | -0.390 | 0.538  | 0.907  | 0.986  | 0.236  | 0.357  | 1      | 0.182  | 0.938  | 0.365  |
| BIO17 | 0.084  | -0.529 | -0.404 | 0.231  | 0.033  | -0.099 | 0.089  | -0.285 | 0.096  | 0.256  | -0.100 | 0.557  | 0.179  | 0.946  | -0.720 | 0.182  | 1      | 0.132  | 0.709  |
| BIO18 | 0.227  | -0.304 | 0.584  | -0.653 | -0.539 | 0.485  | -0.606 | 0.154  | 0.013  | -0.402 | 0.505  | 0.822  | 0.933  | 0.194  | 0.389  | 0.938  | 0.132  | 1      | 0.263  |
| BIO19 | 0.156  | -0.566 | -0.050 | -0.153 | -0.282 | 0.208  | -0.282 | -0.310 | 0.362  | -0.012 | 0.174  | 0.623  | 0.349  | 0.650  | -0.424 | 0.365  | 0.709  | 0.263  | 1      |

**Último Máximo Glacial (LGM)**

|       | BIO1   | BIO2   | BIO3   | BIO4   | BIO5   | BIO6   | BIO7   | BIO8   | BIO9   | BIO10  | BIO11  | BIO12  | BIO13  | BIO14  | BIO15  | BIO16  | BIO17  | BIO18  | BIO19  |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| BIO1  | 1      | -0.158 | 0.515  | -0.603 | 0.718  | 0.899  | -0.673 | 0.621  | 0.797  | 0.695  | 0.898  | -0.017 | 0.151  | -0.355 | 0.379  | 0.141  | -0.337 | 0.029  | -0.188 |
| BIO2  | -0.158 | 1      | 0.400  | -0.249 | -0.130 | -0.036 | -0.017 | -0.102 | 0.105  | -0.387 | 0.056  | -0.454 | -0.321 | -0.372 | 0.385  | -0.358 | -0.405 | -0.227 | -0.351 |
| BIO3  | 0.515  | 0.400  | 1      | -0.963 | -0.095 | 0.787  | -0.896 | 0.126  | 0.668  | -0.221 | 0.820  | -0.117 | 0.095  | -0.559 | 0.565  | 0.095  | -0.579 | -0.022 | -0.239 |
| BIO4  | -0.603 | -0.249 | -0.963 | 1      | 0.046  | -0.872 | 0.969  | -0.175 | -0.764 | 0.147  | -0.890 | 0.084  | -0.150 | 0.590  | -0.597 | -0.151 | 0.602  | -0.013 | 0.193  |
| BIO5  | 0.718  | -0.130 | -0.095 | 0.046  | 1      | 0.394  | -0.004 | 0.565  | 0.440  | 0.950  | 0.392  | -0.095 | -0.057 | -0.060 | 0.056  | -0.080 | -0.036 | -0.070 | -0.122 |
| BIO6  | 0.899  | -0.036 | 0.787  | -0.872 | 0.394  | 1      | -0.921 | 0.401  | 0.893  | 0.339  | 0.992  | -0.047 | 0.156  | -0.515 | 0.499  | 0.158  | -0.510 | 0.008  | -0.147 |
| BIO7  | -0.673 | -0.017 | -0.896 | 0.969  | -0.004 | -0.921 | 1      | -0.196 | -0.784 | 0.035  | -0.913 | 0.010  | -0.194 | 0.535  | -0.519 | -0.205 | 0.540  | -0.038 | 0.108  |
| BIO8  | 0.621  | -0.102 | 0.126  | -0.175 | 0.565  | 0.401  | -0.196 | 1      | 0.289  | 0.587  | 0.438  | 0.059  | 0.256  | -0.195 | 0.409  | 0.211  | -0.177 | 0.313  | -0.334 |
| BIO9  | 0.797  | 0.105  | 0.668  | -0.764 | 0.440  | 0.893  | -0.784 | 0.289  | 1      | 0.332  | 0.884  | -0.179 | -0.005 | -0.542 | 0.444  | -0.003 | -0.521 | -0.095 | -0.042 |
| BIO10 | 0.695  | -0.387 | -0.221 | 0.147  | 0.950  | 0.339  | 0.035  | 0.587  | 0.332  | 1      | 0.320  | 0.001  | -0.001 | 0.051  | -0.055 | -0.014 | 0.081  | -0.015 | -0.064 |
| BIO11 | 0.898  | 0.056  | 0.820  | -0.890 | 0.392  | 0.992  | -0.913 | 0.438  | 0.884  | 0.320  | 1      | -0.077 | 0.147  | -0.540 | 0.547  | 0.142  | -0.538 | 0.008  | -0.211 |
| BIO12 | -0.017 | -0.454 | -0.117 | 0.084  | -0.095 | -0.047 | 0.010  | 0.059  | -0.179 | 0.001  | -0.077 | 1      | 0.894  | 0.663  | -0.309 | 0.924  | 0.680  | 0.759  | 0.603  |
| BIO13 | 0.151  | -0.321 | 0.095  | -0.150 | -0.057 | 0.156  | -0.194 | 0.256  | -0.005 | -0.001 | 0.147  | 0.894  | 1      | 0.354  | 0.085  | 0.980  | 0.365  | 0.825  | 0.356  |
| BIO14 | -0.355 | -0.372 | -0.559 | 0.590  | -0.060 | -0.515 | 0.535  | -0.195 | -0.542 | 0.051  | -0.540 | 0.663  | 0.354  | 1      | -0.700 | 0.378  | 0.986  | 0.354  | 0.548  |
| BIO15 | 0.379  | 0.385  | 0.565  | -0.597 | 0.056  | 0.499  | -0.519 | 0.409  | 0.444  | -0.055 | 0.547  | -0.309 | 0.085  | -0.700 | 1      | 0.032  | -0.729 | 0.044  | -0.500 |
| BIO16 | 0.141  | -0.358 | 0.095  | -0.151 | -0.080 | 0.158  | -0.205 | 0.211  | -0.003 | -0.014 | 0.142  | 0.924  | 0.980  | 0.378  | 0.032  | 1      | 0.388  | 0.828  | 0.402  |
| BIO17 | -0.337 | -0.405 | -0.579 | 0.602  | -0.036 | -0.510 | 0.540  | -0.177 | -0.521 | 0.081  | -0.538 | 0.680  | 0.365  | 0.986  | -0.729 | 0.388  | 1      | 0.360  | 0.585  |
| BIO18 | 0.029  | -0.227 | -0.022 | -0.013 | -0.070 | 0.008  | -0.038 | 0.313  | -0.095 | -0.015 | 0.008  | 0.759  | 0.825  | 0.354  | 0.044  | 0.828  | 0.360  | 1      | 0.241  |
| BIO19 | -0.188 | -0.351 | -0.239 | 0.193  | -0.122 | -0.147 | 0.108  | -0.334 | -0.042 | -0.064 | -0.211 | 0.603  | 0.356  | 0.548  | -0.500 | 0.402  | 0.585  | 0.241  | 1      |

**Presente**

|       | BIO1   | BIO2   | BIO3   | BIO4   | BIO5   | BIO6   | BIO7   | BIO8   | BIO9   | BIO10  | BIO11  | BIO12  | BIO13  | BIO14  | BIO15  | BIO16  | BIO17  | BIO18  | BIO19  |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| BIO1  | 1      | -0.406 | 0.191  | -0.351 | 0.560  | 0.863  | -0.454 | 0.593  | 0.651  | 0.722  | 0.877  | 0.256  | 0.327  | -0.006 | 0.192  | 0.310  | -0.008 | 0.215  | -0.040 |
| BIO2  | -0.406 | 1      | 0.113  | 0.231  | 0.120  | -0.559 | 0.557  | -0.022 | -0.089 | -0.217 | -0.384 | -0.617 | -0.455 | -0.535 | 0.277  | -0.434 | -0.535 | -0.323 | -0.418 |
| BIO3  | 0.191  | 0.113  | 1      | -0.918 | -0.492 | 0.538  | -0.742 | -0.103 | 0.346  | -0.477 | 0.609  | 0.180  | 0.459  | -0.482 | 0.774  | 0.494  | -0.482 | 0.354  | -0.357 |
| BIO4  | -0.351 | 0.231  | -0.918 | 1      | 0.520  | -0.741 | 0.935  | 0.083  | -0.398 | 0.390  | -0.754 | -0.387 | -0.602 | 0.266  | -0.667 | -0.624 | 0.264  | -0.464 | 0.158  |
| BIO5  | 0.560  | 0.120  | -0.492 | 0.520  | 1      | 0.075  | 0.480  | 0.614  | 0.308  | 0.939  | 0.136  | -0.252 | -0.299 | 0.021  | -0.238 | -0.322 | 0.018  | -0.268 | -0.037 |
| BIO6  | 0.863  | -0.559 | 0.538  | -0.741 | 0.075  | 1      | -0.839 | 0.318  | 0.625  | 0.303  | 0.979  | 0.458  | 0.576  | -0.035 | 0.392  | 0.574  | -0.036 | 0.416  | -0.008 |
| BIO7  | -0.454 | 0.557  | -0.742 | 0.935  | 0.480  | -0.839 | 1      | 0.055  | -0.382 | 0.246  | -0.787 | -0.540 | -0.670 | 0.043  | -0.475 | -0.681 | 0.042  | -0.513 | -0.013 |
| BIO8  | 0.593  | -0.022 | -0.103 | 0.083  | 0.614  | 0.318  | 0.055  | 1      | 0.207  | 0.628  | 0.362  | 0.008  | 0.070  | -0.038 | 0.067  | 0.040  | -0.052 | 0.141  | -0.214 |
| BIO9  | 0.651  | -0.089 | 0.346  | -0.398 | 0.308  | 0.625  | -0.382 | 0.207  | 1      | 0.372  | 0.684  | 0.119  | 0.213  | -0.156 | 0.283  | 0.224  | -0.136 | 0.078  | 0.117  |
| BIO10 | 0.722  | -0.217 | -0.477 | 0.390  | 0.939  | 0.303  | 0.246  | 0.628  | 0.372  | 1      | 0.311  | -0.048 | -0.131 | 0.166  | -0.288 | -0.161 | 0.162  | -0.153 | 0.075  |
| BIO11 | 0.877  | -0.384 | 0.609  | -0.754 | 0.136  | 0.979  | -0.787 | 0.362  | 0.684  | 0.311  | 1      | 0.358  | 0.524  | -0.165 | 0.488  | 0.525  | -0.166 | 0.371  | -0.110 |
| BIO12 | 0.256  | -0.617 | 0.180  | -0.387 | -0.252 | 0.458  | -0.540 | 0.008  | 0.119  | -0.048 | 0.358  | 1      | 0.901  | 0.606  | -0.026 | 0.896  | 0.613  | 0.766  | 0.585  |
| BIO13 | 0.327  | -0.455 | 0.459  | -0.602 | -0.299 | 0.576  | -0.670 | 0.070  | 0.213  | -0.131 | 0.524  | 0.901  | 1      | 0.243  | 0.364  | 0.991  | 0.249  | 0.861  | 0.296  |
| BIO14 | -0.006 | -0.535 | -0.482 | 0.266  | 0.021  | -0.035 | 0.043  | -0.038 | -0.156 | 0.166  | -0.165 | 0.606  | 0.243  | 1      | -0.684 | 0.218  | 0.991  | 0.237  | 0.781  |
| BIO15 | 0.192  | 0.277  | 0.774  | -0.667 | -0.238 | 0.392  | -0.475 | 0.067  | 0.283  | -0.288 | 0.488  | -0.026 | 0.364  | -0.684 | 1      | 0.385  | -0.687 | 0.325  | -0.496 |
| BIO16 | 0.310  | -0.434 | 0.494  | -0.624 | -0.322 | 0.574  | -0.681 | 0.040  | 0.224  | -0.161 | 0.525  | 0.896  | 0.991  | 0.218  | 0.385  | 1      | 0.223  | 0.850  | 0.279  |
| BIO17 | -0.008 | -0.535 | -0.482 | 0.264  | 0.018  | -0.036 | 0.042  | -0.052 | -0.136 | 0.162  | -0.166 | 0.613  | 0.249  | 0.991  | -0.687 | 0.223  | 1      | 0.243  | 0.806  |
| BIO18 | 0.215  | -0.323 | 0.354  | -0.464 | -0.268 | 0.416  | -0.513 | 0.141  | 0.078  | -0.153 | 0.371  | 0.766  | 0.861  | 0.237  | 0.325  | 0.850  | 0.243  | 1      | 0.248  |
| BIO19 | -0.040 | -0.418 | -0.357 | 0.158  | -0.037 | -0.008 | -0.013 | -0.214 | 0.117  | 0.075  | -0.110 | 0.585  | 0.296  | 0.781  | -0.496 | 0.279  | 0.806  | 0.248  | 1      |

**Futuro RCP2.6**

|       | BIO1   | BIO2   | BIO3   | BIO4   | BIO5   | BIO6   | BIO7   | BIO8   | BIO9   | BIO10  | BIO11  | BIO12  | BIO13  | BIO14  | BIO15  | BIO16  | BIO17  | BIO18  | BIO19  |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| BIO1  | 1      | -0.439 | 0.216  | -0.372 | 0.598  | 0.884  | -0.491 | 0.552  | 0.639  | 0.721  | 0.882  | 0.235  | 0.321  | -0.019 | 0.219  | 0.285  | -0.015 | 0.188  | -0.075 |
| BIO2  | -0.439 | 1      | 0.175  | 0.187  | -0.013 | -0.534 | 0.495  | -0.069 | -0.195 | -0.289 | -0.388 | -0.580 | -0.453 | -0.486 | 0.244  | -0.416 | -0.490 | -0.298 | -0.467 |
| BIO3  | 0.216  | 0.175  | 1      | -0.918 | -0.444 | 0.531  | -0.754 | -0.019 | 0.341  | -0.456 | 0.620  | 0.165  | 0.441  | -0.475 | 0.743  | 0.467  | -0.470 | 0.308  | -0.355 |
| BIO4  | -0.372 | 0.187  | -0.918 | 1      | 0.450  | -0.721 | 0.936  | 0.010  | -0.410 | 0.370  | -0.761 | -0.378 | -0.603 | 0.282  | -0.657 | -0.615 | 0.271  | -0.415 | 0.165  |
| BIO5  | 0.598  | -0.013 | -0.444 | 0.450  | 1      | 0.199  | 0.384  | 0.462  | 0.340  | 0.945  | 0.201  | -0.206 | -0.261 | 0.046  | -0.234 | -0.290 | 0.043  | -0.278 | -0.047 |
| BIO6  | 0.884  | -0.534 | 0.531  | -0.721 | 0.199  | 1      | -0.829 | 0.331  | 0.690  | 0.354  | 0.982  | 0.395  | 0.537  | -0.090 | 0.403  | 0.514  | -0.080 | 0.321  | -0.021 |
| BIO7  | -0.491 | 0.495  | -0.754 | 0.936  | 0.384  | -0.829 | 1      | -0.048 | -0.456 | 0.207  | -0.811 | -0.490 | -0.654 | 0.111  | -0.513 | -0.650 | 0.100  | -0.462 | -0.008 |
| BIO8  | 0.552  | -0.069 | -0.019 | 0.010  | 0.462  | 0.331  | -0.048 | 1      | 0.130  | 0.538  | 0.365  | -0.011 | 0.072  | -0.063 | 0.129  | 0.033  | -0.077 | 0.164  | -0.305 |
| BIO9  | 0.639  | -0.195 | 0.341  | -0.410 | 0.340  | 0.690  | -0.456 | 0.130  | 1      | 0.363  | 0.677  | 0.126  | 0.221  | -0.146 | 0.283  | 0.224  | -0.106 | 0.053  | 0.136  |
| BIO10 | 0.721  | -0.289 | -0.456 | 0.370  | 0.945  | 0.354  | 0.207  | 0.538  | 0.363  | 1      | 0.320  | -0.063 | -0.137 | 0.160  | -0.257 | -0.179 | 0.156  | -0.153 | 0.045  |
| BIO11 | 0.882  | -0.388 | 0.620  | -0.761 | 0.201  | 0.982  | -0.811 | 0.365  | 0.677  | 0.320  | 1      | 0.335  | 0.516  | -0.182 | 0.495  | 0.499  | -0.174 | 0.319  | -0.137 |
| BIO12 | 0.235  | -0.580 | 0.165  | -0.378 | -0.206 | 0.395  | -0.490 | -0.011 | 0.126  | -0.063 | 0.335  | 1      | 0.895  | 0.611  | -0.068 | 0.895  | 0.614  | 0.736  | 0.570  |
| BIO13 | 0.321  | -0.453 | 0.441  | -0.603 | -0.261 | 0.537  | -0.654 | 0.072  | 0.221  | -0.137 | 0.516  | 0.895  | 1      | 0.233  | 0.334  | 0.988  | 0.238  | 0.806  | 0.280  |
| BIO14 | -0.019 | -0.486 | -0.475 | 0.282  | 0.046  | -0.090 | 0.111  | -0.063 | -0.146 | 0.160  | -0.182 | 0.611  | 0.233  | 1      | -0.705 | 0.220  | 0.991  | 0.290  | 0.763  |
| BIO15 | 0.219  | 0.244  | 0.743  | -0.657 | -0.234 | 0.403  | -0.513 | 0.129  | 0.283  | -0.257 | 0.495  | -0.068 | 0.334  | -0.705 | 1      | 0.346  | -0.701 | 0.254  | -0.501 |
| BIO16 | 0.285  | -0.416 | 0.467  | -0.615 | -0.290 | 0.514  | -0.650 | 0.033  | 0.224  | -0.179 | 0.499  | 0.895  | 0.988  | 0.220  | 0.346  | 1      | 0.224  | 0.796  | 0.274  |
| BIO17 | -0.015 | -0.490 | -0.470 | 0.271  | 0.043  | -0.080 | 0.100  | -0.077 | -0.106 | 0.156  | -0.174 | 0.614  | 0.238  | 0.991  | -0.701 | 0.224  | 1      | 0.290  | 0.786  |
| BIO18 | 0.188  | -0.298 | 0.308  | -0.415 | -0.278 | 0.321  | -0.462 | 0.164  | 0.053  | -0.153 | 0.319  | 0.736  | 0.806  | 0.290  | 0.254  | 0.796  | 0.290  | 1      | 0.212  |
| BIO19 | -0.075 | -0.467 | -0.355 | 0.165  | -0.047 | -0.021 | -0.008 | -0.305 | 0.136  | 0.045  | -0.137 | 0.570  | 0.280  | 0.763  | -0.501 | 0.274  | 0.786  | 0.212  | 1      |

**Futuro RCP4.5**

|       | BIO1   | BIO2   | BIO3   | BIO4   | BIO5   | BIO6   | BIO7   | BIO8   | BIO9   | BIO10  | BIO11  | BIO12  | BIO13  | BIO14  | BIO15  | BIO16  | BIO17  | BIO18  | BIO19  |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| BIO1  | 1      | -0.447 | 0.202  | -0.361 | 0.554  | 0.878  | -0.484 | 0.603  | 0.606  | 0.703  | 0.875  | 0.230  | 0.294  | -0.001 | 0.188  | 0.275  | -0.005 | 0.181  | -0.080 |
| BIO2  | -0.447 | 1      | 0.196  | 0.152  | -0.014 | -0.530 | 0.474  | -0.081 | -0.210 | -0.314 | -0.376 | -0.533 | -0.364 | -0.464 | 0.300  | -0.354 | -0.472 | -0.244 | -0.458 |
| BIO3  | 0.202  | 0.196  | 1      | -0.923 | -0.487 | 0.527  | -0.756 | -0.108 | 0.313  | -0.491 | 0.621  | 0.174  | 0.484  | -0.440 | 0.737  | 0.483  | -0.458 | 0.310  | -0.345 |
| BIO4  | -0.361 | 0.152  | -0.923 | 1      | 0.500  | -0.712 | 0.932  | 0.102  | -0.381 | 0.404  | -0.762 | -0.369 | -0.614 | 0.260  | -0.637 | -0.611 | 0.272  | -0.403 | 0.174  |
| BIO5  | 0.554  | -0.014 | -0.487 | 0.500  | 1      | 0.144  | 0.436  | 0.597  | 0.278  | 0.936  | 0.139  | -0.214 | -0.294 | 0.039  | -0.244 | -0.303 | 0.044  | -0.280 | -0.056 |
| BIO6  | 0.878  | -0.530 | 0.527  | -0.712 | 0.144  | 1      | -0.828 | 0.340  | 0.662  | 0.329  | 0.979  | 0.381  | 0.520  | -0.083 | 0.379  | 0.503  | -0.091 | 0.301  | -0.033 |
| BIO7  | -0.484 | 0.474  | -0.756 | 0.932  | 0.436  | -0.828 | 1      | 0.029  | -0.445 | 0.232  | -0.812 | -0.468 | -0.640 | 0.098  | -0.483 | -0.629 | 0.108  | -0.433 | -0.001 |
| BIO8  | 0.603  | -0.081 | -0.108 | 0.102  | 0.597  | 0.340  | 0.029  | 1      | 0.192  | 0.656  | 0.360  | -0.108 | -0.047 | -0.110 | 0.057  | -0.065 | -0.119 | 0.070  | -0.332 |
| BIO9  | 0.606  | -0.210 | 0.313  | -0.381 | 0.278  | 0.662  | -0.445 | 0.192  | 1      | 0.335  | 0.642  | 0.174  | 0.248  | -0.053 | 0.261  | 0.243  | -0.043 | 0.063  | 0.187  |
| BIO10 | 0.703  | -0.314 | -0.491 | 0.404  | 0.936  | 0.329  | 0.232  | 0.656  | 0.335  | 1      | 0.284  | -0.073 | -0.186 | 0.163  | -0.283 | -0.200 | 0.167  | -0.162 | 0.050  |
| BIO11 | 0.875  | -0.376 | 0.621  | -0.762 | 0.139  | 0.979  | -0.812 | 0.360  | 0.642  | 0.284  | 1      | 0.328  | 0.510  | -0.165 | 0.474  | 0.495  | -0.174 | 0.309  | -0.147 |
| BIO12 | 0.230  | -0.533 | 0.174  | -0.369 | -0.214 | 0.381  | -0.468 | -0.108 | 0.174  | -0.073 | 0.328  | 1      | 0.870  | 0.623  | -0.102 | 0.884  | 0.619  | 0.710  | 0.592  |
| BIO13 | 0.294  | -0.364 | 0.484  | -0.614 | -0.294 | 0.520  | -0.640 | -0.047 | 0.248  | -0.186 | 0.510  | 0.870  | 1      | 0.197  | 0.356  | 0.990  | 0.190  | 0.785  | 0.268  |
| BIO14 | -0.001 | -0.464 | -0.440 | 0.260  | 0.039  | -0.083 | 0.098  | -0.110 | -0.053 | 0.163  | -0.165 | 0.623  | 0.197  | 1      | -0.702 | 0.215  | 0.989  | 0.293  | 0.781  |
| BIO15 | 0.188  | 0.300  | 0.737  | -0.637 | -0.244 | 0.379  | -0.483 | 0.057  | 0.261  | -0.283 | 0.474  | -0.102 | 0.356  | -0.702 | 1      | 0.332  | -0.713 | 0.235  | -0.519 |
| BIO16 | 0.275  | -0.354 | 0.483  | -0.611 | -0.303 | 0.503  | -0.629 | -0.065 | 0.243  | -0.200 | 0.495  | 0.884  | 0.990  | 0.215  | 0.332  | 1      | 0.208  | 0.770  | 0.272  |
| BIO17 | -0.005 | -0.472 | -0.458 | 0.272  | 0.044  | -0.091 | 0.108  | -0.119 | -0.043 | 0.167  | -0.174 | 0.619  | 0.190  | 0.989  | -0.713 | 0.208  | 1      | 0.285  | 0.796  |
| BIO18 | 0.181  | -0.244 | 0.310  | -0.403 | -0.280 | 0.301  | -0.433 | 0.070  | 0.063  | -0.162 | 0.309  | 0.710  | 0.785  | 0.293  | 0.235  | 0.770  | 0.285  | 1      | 0.201  |
| BIO19 | -0.080 | -0.458 | -0.345 | 0.174  | -0.056 | -0.033 | -0.001 | -0.332 | 0.187  | 0.050  | -0.147 | 0.592  | 0.268  | 0.781  | -0.519 | 0.272  | 0.796  | 0.201  | 1      |

**Futuro RCP6.0**

|       | BIO1   | BIO2   | BIO3   | BIO4   | BIO5   | BIO6   | BIO7   | BIO8   | BIO9   | BIO10  | BIO11  | BIO12  | BIO13  | BIO14  | BIO15  | BIO16  | BIO17  | BIO18  | BIO19  |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| BIO1  | 1      | -0.420 | 0.196  | -0.355 | 0.562  | 0.871  | -0.478 | 0.555  | 0.609  | 0.702  | 0.872  | 0.222  | 0.306  | -0.009 | 0.197  | 0.265  | 0.000  | 0.192  | -0.093 |
| BIO2  | -0.420 | 1      | 0.247  | 0.106  | -0.022 | -0.491 | 0.435  | -0.020 | -0.228 | -0.320 | -0.333 | -0.553 | -0.385 | -0.534 | 0.340  | -0.349 | -0.547 | -0.235 | -0.493 |
| BIO3  | 0.196  | 0.247  | 1      | -0.921 | -0.476 | 0.529  | -0.749 | -0.024 | 0.278  | -0.495 | 0.621  | 0.142  | 0.442  | -0.498 | 0.758  | 0.461  | -0.496 | 0.333  | -0.376 |
| BIO4  | -0.355 | 0.106  | -0.921 | 1      | 0.492  | -0.718 | 0.931  | 0.027  | -0.363 | 0.409  | -0.763 | -0.350 | -0.588 | 0.304  | -0.655 | -0.599 | 0.293  | -0.425 | 0.198  |
| BIO5  | 0.562  | -0.022 | -0.476 | 0.492  | 1      | 0.143  | 0.432  | 0.486  | 0.294  | 0.936  | 0.145  | -0.217 | -0.272 | 0.053  | -0.242 | -0.309 | 0.047  | -0.292 | -0.051 |
| BIO6  | 0.871  | -0.491 | 0.529  | -0.718 | 0.143  | 1      | -0.831 | 0.312  | 0.667  | 0.314  | 0.979  | 0.376  | 0.524  | -0.097 | 0.393  | 0.497  | -0.084 | 0.324  | -0.038 |
| BIO7  | -0.478 | 0.435  | -0.749 | 0.931  | 0.432  | -0.831 | 1      | -0.011 | -0.443 | 0.239  | -0.811 | -0.465 | -0.630 | 0.119  | -0.494 | -0.627 | 0.103  | -0.459 | 0.005  |
| BIO8  | 0.555  | -0.020 | -0.024 | 0.027  | 0.486  | 0.312  | -0.011 | 1      | 0.118  | 0.543  | 0.358  | -0.093 | 0.010  | -0.150 | 0.125  | -0.024 | -0.154 | 0.129  | -0.374 |
| BIO9  | 0.609  | -0.228 | 0.278  | -0.363 | 0.294  | 0.667  | -0.443 | 0.118  | 1      | 0.347  | 0.633  | 0.178  | 0.238  | -0.069 | 0.238  | 0.234  | -0.021 | 0.069  | 0.214  |
| BIO10 | 0.702  | -0.320 | -0.495 | 0.409  | 0.936  | 0.314  | 0.239  | 0.543  | 0.347  | 1      | 0.277  | -0.066 | -0.155 | 0.192  | -0.289 | -0.202 | 0.190  | -0.168 | 0.061  |
| BIO11 | 0.872  | -0.333 | 0.621  | -0.763 | 0.145  | 0.979  | -0.811 | 0.358  | 0.633  | 0.277  | 1      | 0.315  | 0.506  | -0.192 | 0.491  | 0.483  | -0.181 | 0.331  | -0.167 |
| BIO12 | 0.222  | -0.553 | 0.142  | -0.350 | -0.217 | 0.376  | -0.465 | -0.093 | 0.178  | -0.066 | 0.315  | 1      | 0.889  | 0.626  | -0.108 | 0.887  | 0.629  | 0.709  | 0.573  |
| BIO13 | 0.306  | -0.385 | 0.442  | -0.588 | -0.272 | 0.524  | -0.630 | 0.010  | 0.238  | -0.155 | 0.506  | 0.889  | 1      | 0.236  | 0.305  | 0.987  | 0.239  | 0.796  | 0.276  |
| BIO14 | -0.009 | -0.534 | -0.498 | 0.304  | 0.053  | -0.097 | 0.119  | -0.150 | -0.069 | 0.192  | -0.192 | 0.626  | 0.236  | 1      | -0.721 | 0.223  | 0.990  | 0.245  | 0.748  |
| BIO15 | 0.197  | 0.340  | 0.758  | -0.655 | -0.242 | 0.393  | -0.494 | 0.125  | 0.238  | -0.289 | 0.491  | -0.108 | 0.305  | -0.721 | 1      | 0.325  | -0.724 | 0.257  | -0.505 |
| BIO16 | 0.265  | -0.349 | 0.461  | -0.599 | -0.309 | 0.497  | -0.627 | -0.024 | 0.234  | -0.202 | 0.483  | 0.887  | 0.987  | 0.223  | 0.325  | 1      | 0.224  | 0.792  | 0.270  |
| BIO17 | 0.000  | -0.547 | -0.496 | 0.293  | 0.047  | -0.084 | 0.103  | -0.154 | -0.021 | 0.190  | -0.181 | 0.629  | 0.239  | 0.990  | -0.724 | 0.224  | 1      | 0.244  | 0.769  |
| BIO18 | 0.192  | -0.235 | 0.333  | -0.425 | -0.292 | 0.324  | -0.459 | 0.129  | 0.069  | -0.168 | 0.331  | 0.709  | 0.796  | 0.245  | 0.257  | 0.792  | 0.244  | 1      | 0.159  |
| BIO19 | -0.093 | -0.493 | -0.376 | 0.198  | -0.051 | -0.038 | 0.005  | -0.374 | 0.214  | 0.061  | -0.167 | 0.573  | 0.276  | 0.748  | -0.505 | 0.270  | 0.769  | 0.159  | 1      |

**Futuro RCP8.5**

|       | BIO1   | BIO2   | BIO3   | BIO4   | BIO5   | BIO6   | BIO7   | BIO8   | BIO9   | BIO10  | BIO11  | BIO12  | BIO13  | BIO14  | BIO15  | BIO16  | BIO17  | BIO18  | BIO19  |
|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| BIO1  | 1      | -0.435 | 0.202  | -0.365 | 0.570  | 0.884  | -0.495 | 0.572  | 0.614  | 0.710  | 0.877  | 0.207  | 0.291  | -0.024 | 0.197  | 0.261  | -0.021 | 0.171  | -0.123 |
| BIO2  | -0.435 | 1      | 0.225  | 0.140  | -0.010 | -0.537 | 0.492  | -0.048 | -0.243 | -0.315 | -0.361 | -0.576 | -0.418 | -0.497 | 0.303  | -0.387 | -0.512 | -0.262 | -0.472 |
| BIO3  | 0.202  | 0.225  | 1      | -0.916 | -0.456 | 0.500  | -0.723 | -0.059 | 0.299  | -0.478 | 0.616  | 0.094  | 0.415  | -0.484 | 0.721  | 0.423  | -0.490 | 0.250  | -0.389 |
| BIO4  | -0.365 | 0.140  | -0.916 | 1      | 0.473  | -0.702 | 0.920  | 0.062  | -0.387 | 0.390  | -0.763 | -0.315 | -0.574 | 0.296  | -0.629 | -0.579 | 0.292  | -0.341 | 0.211  |
| BIO5  | 0.570  | -0.010 | -0.456 | 0.473  | 1      | 0.173  | 0.409  | 0.541  | 0.285  | 0.934  | 0.165  | -0.216 | -0.284 | 0.024  | -0.223 | -0.308 | 0.017  | -0.263 | -0.081 |
| BIO6  | 0.884  | -0.537 | 0.500  | -0.702 | 0.173  | 1      | -0.828 | 0.325  | 0.673  | 0.352  | 0.976  | 0.356  | 0.502  | -0.082 | 0.346  | 0.477  | -0.075 | 0.265  | -0.052 |
| BIO7  | -0.495 | 0.492  | -0.723 | 0.920  | 0.409  | -0.828 | 1      | 0.006  | -0.462 | 0.205  | -0.810 | -0.453 | -0.627 | 0.090  | -0.447 | -0.617 | 0.079  | -0.395 | 0.002  |
| BIO8  | 0.572  | -0.048 | -0.059 | 0.062  | 0.541  | 0.325  | 0.006  | 1      | 0.121  | 0.594  | 0.355  | -0.110 | -0.027 | -0.135 | 0.099  | -0.050 | -0.140 | 0.121  | -0.380 |
| BIO9  | 0.614  | -0.243 | 0.299  | -0.387 | 0.285  | 0.673  | -0.462 | 0.121  | 1      | 0.343  | 0.649  | 0.174  | 0.241  | -0.040 | 0.218  | 0.239  | -0.019 | 0.031  | 0.201  |
| BIO10 | 0.710  | -0.315 | -0.478 | 0.390  | 0.934  | 0.352  | 0.205  | 0.594  | 0.343  | 1      | 0.297  | -0.056 | -0.156 | 0.164  | -0.265 | -0.190 | 0.163  | -0.128 | 0.038  |
| BIO11 | 0.877  | -0.361 | 0.616  | -0.763 | 0.165  | 0.976  | -0.810 | 0.355  | 0.649  | 0.297  | 1      | 0.281  | 0.481  | -0.198 | 0.471  | 0.463  | -0.194 | 0.266  | -0.192 |
| BIO12 | 0.207  | -0.576 | 0.094  | -0.315 | -0.216 | 0.356  | -0.453 | -0.110 | 0.174  | -0.056 | 0.281  | 1      | 0.866  | 0.640  | -0.146 | 0.871  | 0.640  | 0.687  | 0.573  |
| BIO13 | 0.291  | -0.418 | 0.415  | -0.574 | -0.284 | 0.502  | -0.627 | -0.027 | 0.241  | -0.156 | 0.481  | 0.866  | 1      | 0.207  | 0.313  | 0.988  | 0.207  | 0.757  | 0.245  |
| BIO14 | -0.024 | -0.497 | -0.484 | 0.296  | 0.024  | -0.082 | 0.090  | -0.135 | -0.040 | 0.164  | -0.198 | 0.640  | 0.207  | 1      | -0.712 | 0.214  | 0.993  | 0.285  | 0.753  |
| BIO15 | 0.197  | 0.303  | 0.721  | -0.629 | -0.223 | 0.346  | -0.447 | 0.099  | 0.218  | -0.265 | 0.471  | -0.146 | 0.313  | -0.712 | 1      | 0.318  | -0.716 | 0.203  | -0.534 |
| BIO16 | 0.261  | -0.387 | 0.423  | -0.579 | -0.308 | 0.477  | -0.617 | -0.050 | 0.239  | -0.190 | 0.463  | 0.871  | 0.988  | 0.214  | 0.318  | 1      | 0.212  | 0.750  | 0.247  |
| BIO17 | -0.021 | -0.512 | -0.490 | 0.292  | 0.017  | -0.075 | 0.079  | -0.140 | -0.019 | 0.163  | -0.194 | 0.640  | 0.207  | 0.993  | -0.716 | 0.212  | 1      | 0.284  | 0.769  |
| BIO18 | 0.171  | -0.262 | 0.250  | -0.341 | -0.263 | 0.265  | -0.395 | 0.121  | 0.031  | -0.128 | 0.266  | 0.687  | 0.757  | 0.285  | 0.203  | 0.750  | 0.284  | 1      | 0.139  |
| BIO19 | -0.123 | -0.472 | -0.389 | 0.211  | -0.081 | -0.052 | 0.002  | -0.380 | 0.201  | 0.038  | -0.192 | 0.573  | 0.245  | 0.753  | -0.534 | 0.247  | 0.769  | 0.139  | 1      |