



Variación genética de *Balmea stormiae* (Rubiaceae) en el centro-occidente de México

Genetic variation of *Balmea stormiae* (Rubiaceae) in west-central Mexico

Dulce Karina Mejía-Jiménez¹ , Juan Carlos Montero-Castro^{1,4} , Antonio González-Rodríguez³ ,
Sabina Irene Lara-Cabrera¹ , Eduardo Ruiz-Sánchez² , Luis Felipe Mendoza-Cuenca¹ 

Resumen:

Antecedentes y Objetivos: Los individuos de *Balmea stormiae* (Rubiaceae) son árboles o arbustos hemiepífitos que habitan malpaíses con bosques de pino-encino en poblaciones disyuntas en Centroamérica y México. La especie se considera en peligro de extinción y particularmente se ha documentado que las poblaciones de Michoacán han estado expuestas a fuertes presiones antropogénicas. Por tal motivo, en este estudio se estimó la diversidad genética en cuatro poblaciones de Michoacán, contrastando esta información con la obtenida en una población de Jalisco, ambas regiones ubicadas en el centro-occidente de México.

Métodos: Las muestras vegetales fueron recolectadas en cinco poblaciones de la región occidente del Cinturón Volcánico Transmexicano. Para evaluar la diversidad genética, se utilizó el intrón *rps16* del ADN de cloroplasto, el espacio transcrita externo (ETS) del ADN ribosomal nuclear y marcadores dominantes ISSR de ADN nuclear (Inter Secuencias Simples Repetidas por sus siglas en inglés).

Resultados clave: Los marcadores moleculares revelaron alta diferenciación genética entre las poblaciones de Jalisco y Michoacán, la cual se atribuye a la baja conectividad entre estas. Posiblemente se deba a la baja capacidad de dispersión a larga distancia de las semillas y el polen. Se detectó flujo genético moderado y expansión demográfica reciente en las poblaciones de Michoacán. Los niveles de variación genética en las poblaciones de Michoacán concuerdan con la edad de los flujos de lava, siendo Arocotín y Zacapu las poblaciones más diversas sobre los flujos de lava más antiguos.

Conclusiones: Los resultados podrían explicarse por el origen relativamente reciente, producto de la actividad volcánica del Holoceno, de los ambientes en los que habita esta especie, sumado a la perturbación recurrente relacionada con grandes asentamientos prehispánicos de Michoacán.

Palabras clave: estructura genética, genética de la conservación, hemiepífita, madera dura, vegetación de malpaís.

Abstract:

Background and Aims: Individuals of *Balmea stormiae* (Rubiaceae) are trees or hemiepiphytic shrubs that inhabit pine-oak forests on rock outcrops in disjunct populations of Central America and Mexico. The species is considered endangered and especially the populations of Michoacán have been reported as exposed to strong anthropogenic pressures. For this reason, in this study the genetic diversity of four populations of Michoacán was estimated, contrasting this information with that obtained from one population of Jalisco, both regions located in west-central Mexico.

Methods: Samples were collected in five populations in the western region of the Trans-Mexican Volcanic Belt. The chloroplast *rps16* intron, the external transcribed spacer of ribosomal DNA (ETS) and seven Inter-Simple Sequence Repeats of nuclear DNA (ISSR) were used to assess genetic diversity.

Key results: Molecular markers revealed high genetic differentiation between the populations from Jalisco and Michoacán, attributed to the low connectivity amongst them, probably due to the low long distance dispersal capacity of seeds and pollen. Moderate genetic flow and demographic expansion were detected for populations in Michoacán. The degree of genetic diversity in Michoacán populations are consistent with the age of lava flows, whereby Arocotín and Zacapu are the most diverse populations located on the oldest lava flows.

Conclusions: Results could be explained by the relatively recent origin, resulting from Holocene volcanic activity, of the environments in which the species inhabits, coupled with the recurring disturbance related to large pre-Hispanic settlements.

Key words: conservation genetics, genetic structure, hardwood, hemi-epiphyte, vegetation of lava flow.

¹Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Biología, Gral. Francisco J. Múgica S/N, C.U., 58030 Morelia, Michoacán, México.

²Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Camino Ramón Padiña Sánchez 2100, Las Agujas, 44600 Zapopan, México.

³Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Antigua carretera a Pátzcuaro 8701, 58190 Morelia, Michoacán, México.

⁴Autor para la correspondencia: cestrum2003@yahoo.com.mx

Recibido: 10 de agosto de 2022.

Revisado: 31 de agosto de 2022.

Aceptado por Marie-Stéphanie Samain: 19 de octubre de 2022.

Publicado Primero en línea: 22 de noviembre de 2022.

Publicado: Acta Botanica Mexicana 129 (2022).

Citar como: Mejía-Jiménez, D. K., J. C. Montero-Castro, A. González-Rodríguez, S. I. Lara-Cabrera, E. Ruiz-Sánchez y L. F. Medonza-Cuenca. 2022. Variación genética de *Balmea stormiae* (Rubiaceae) en el centro-occidente de México. Acta Botanica Mexicana 129: e2119. DOI: <https://doi.org/10.21829/abm129.2022.2119>



Este es un artículo de acceso abierto bajo la licencia Creative Commons 4.0 Atribución-No Comercial (CC BY-NC 4.0 Internacional).

e-ISSN: 2448-7589



Introducción

Conocida como “ayuque”, *Balmea stormiae* Martínez (Hilieae, Cinchonoideae, Rubiaceae; *sensu* Manns y Bremer, 2010) es la única especie del género. Es un árbol o arbusto hemiepífito cuyos individuos alcanzan 20 m de altura y hasta 20 cm de diámetro, con madera dura, blanquecina y hojas ampliamente ovadas con la base cordada (Fig. 1D; Borhidi, 2012). Su inflorescencia es terminal en cimas corimbosas péndulas (Fig. 1A); las flores son hermafroditas, gamopétalas, rojas a púrpuras, aromáticas nocturnas (Fig. 1B; Martínez, 1942), por lo que de acuerdo con el enfoque de la biología reproductiva (Van Zandt et al., 2020), su polinización podría ser por falenofilia. El fruto es una cápsula septicida, bivalva con numerosas semillas aladas (Fig. 1E; Martínez, 1942; Fosberg, 1974; Borhidi, 2012).

La especie se distribuye en pequeñas áreas en Guatemala, El Salvador y México (Chiapas, Colima, Estado de México, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit y Oaxaca,) en altitudes entre 1100 y 2100 m (Martínez, 1942; Fosberg, 1974; Martínez Salas et al., 2017). Sin embargo, la distribución local de *B. stormiae* es bastante restringida, pues habita en sitios muy específicos y aislados, encontrándose en bosque de pino-encino o encino sobre pedregales de rocas volcánicas o calizas, en un área de ocupación estimada de 188 km² (Martínez Salas et al., 2017).

Se ha reportado declive de las poblaciones de *B. stormiae* desde 1940 cuando se utilizó como árbol navideño en Michoacán, México (Fosberg, 1974). En la actualidad, ese detrimento continúa debido a que la madera de esta especie se utiliza para la construcción de techos y artesanías; además de afrontar amenazas como incendios y destrucción de su hábitat debido a la extracción de rocas para su uso en la construcción o para despejar zonas y utilizarlas en el pastoreo, resultando en el deterioro de las poblaciones de esta especie (Molina-Paniagua y Zamudio, 2010; Martínez Salas et al., 2017). Lo anterior justifica que esta especie esté incluida en la categoría de “Protección Especial” en la reglamentación mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 (SEMARNAT, 2010). A nivel internacional es considerada “En Peligro” (Martínez Salas et al., 2017) y ubicada en el Apéndice I de CITES (CITES, 2022).

Factores como un pequeño tamaño poblacional, el aislamiento de las poblaciones y la especificidad del ambien-

te podrían incidir negativamente en la variación genética de las poblaciones de *B. stormiae*, incrementando la deriva genética y la diferenciación entre las poblaciones. Estos aspectos no han sido evaluados en *B. stormiae*, por lo que el propósito de este trabajo es estimar la diversidad genética en cuatro poblaciones de Michoacán y una de Jalisco, en el centro-occidente de México, mediante siete marcadores ISSR, así como secuencias del intrón *rps16* de cloroplasto y del espaciador transcritto externo ribosomal nuclear (ETS).

Materiales y Métodos

Área de estudio

Se exploraron cinco poblaciones del centro-occidente del Cinturón Volcánico Transmexicano, cuatro en Michoacán (Arocutín, San Andrés Coru, Nuevo San Juan Parangaricutiro y Zacapu) y una en la Sierra de Manantlán, Jalisco (Cuadro 1; Fig. 2). Estas localidades se encuentran en diferentes formaciones volcánicas. Las de Michoacán pertenecen al campo Michoacán-Guanajuato del Cinturón Volcánico Transmexicano. El malpaís de Zacapu está compuesto por varios flujos de lava agrupados en dos períodos con una edad de 27,000 a 21,300 a. C. y 1479 a 900 a. C (Reyes-Guzmán, 2018). Al flujo de lava (El Capaxtiro) donde se realizó la colecta en este estudio, se le ha asignado una edad de entre 1500 a 2500 años de antigüedad (Reyes-Guzmán, 2018). Por otra parte, en el pedregal Arocutín, la zona de muestreo fue en el cerro La Taza, que se encuentra al suroeste del Lago de Pátzcuaro, y se le ha asignado una edad aproximada de 8430 años (García-Quintana et al., 2016; Osorio-Ocampo, 2018). Los pedregales cercanos a Nuevo San Juan Parangaricutiro fueron originados por varios eventos de actividad volcánica durante el Plioceno, Pleistoceno y Holoceno (Bocco, 1998), aunque se sabe que 50% de todo ese territorio fue cubierto por cenizas o flujos de lava provenientes del volcán Paricutín durante su erupción de 1943 a 1952 (Medina et al., 2000). En la localidad de San Andrés Coru, el volcán El Metate es considerado el más joven del campo volcánico Michoacán-Guanajuato, iniciando su actividad en el año 1250 d. C. (Chevrel et al., 2016). Los individuos de *B. stormiae* se colectaron en el flujo de mayores dimensiones (flujo 6). En el estado de Jalisco, la formación de la Sierra de Manantlán se encuentra en la confluencia de la Sierra Madre del Sur y el Cinturón Volcánico Transmexicano (INE,



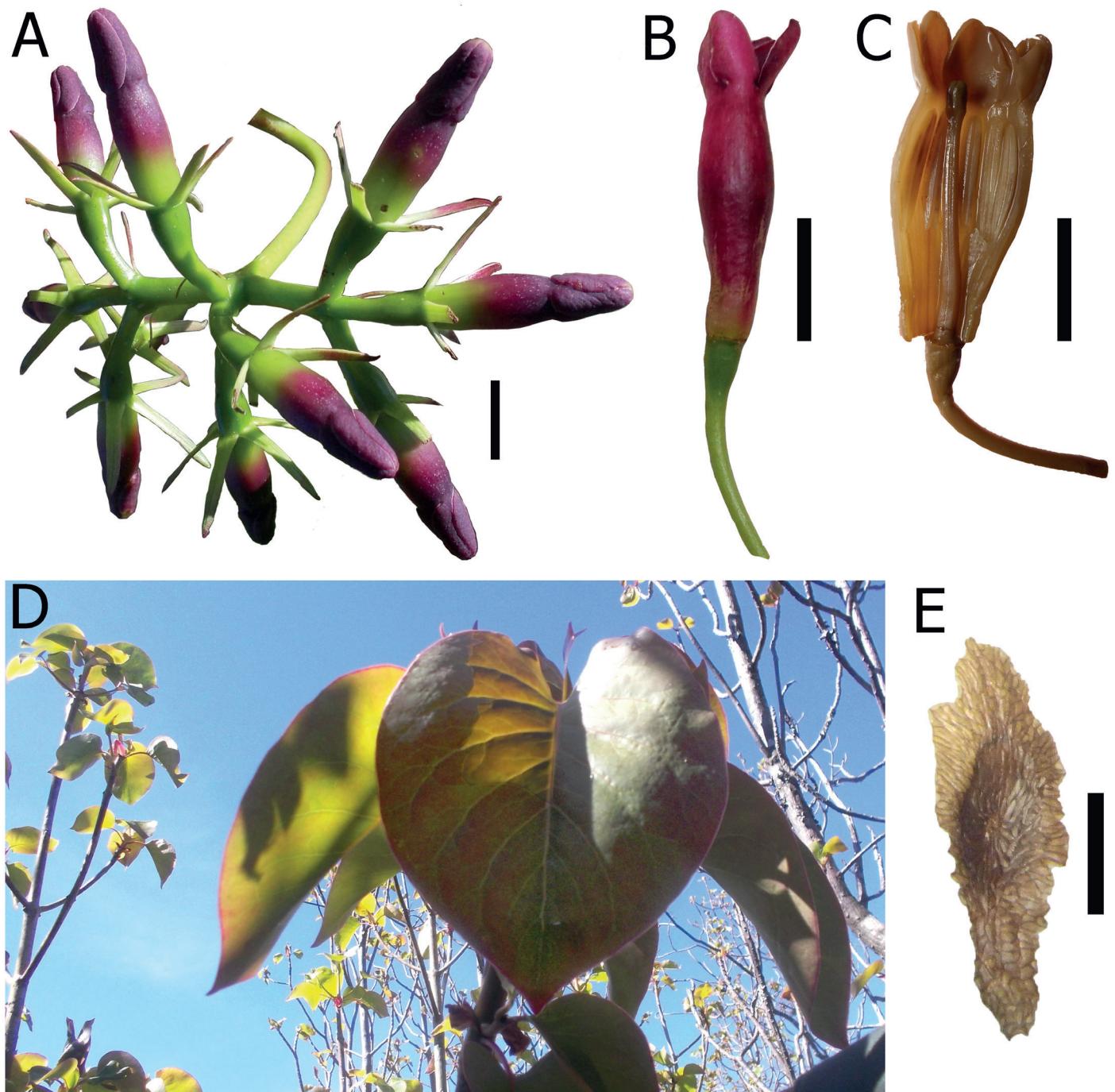


Figura 1: Imágenes de algunas estructuras morfológicas de *Balmea stormiae* Martínez: A. inflorescencia; B. flor en antesis; C. disección de la flor; D. ápice de la rama; E. semilla alada. Barra de escala A, B y C=1 cm; E=1mm.

2000). La zona de colecta de *B. stormiae* se ubica en el occidente de la Sierra de Manantlán en la Unidad Fisiográfica Las Joyas, la cual es la parte más alta y conservada, formada por roca volcánica intrusiva y extrusiva, que es producto del vulcanismo del Mioceno y Pleistoceno (Martínez y Ramírez, 1998).

Muestreo de material vegetal

Se incluyeron muestras de la mayor cantidad de individuos que estuvieran separados entre sí por al menos 15 m, pero dada la dificultad de desplazamiento dentro de los pedregales, solo se muestrearon entre 8 a 15 individuos por localidad (Cuadro 1). Las muestras por individuo consistieron

Cuadro 1: Detalles geográficos, tamaño de muestra y medidas de diversidad genética en las poblaciones de *Balmea stormiae* Martínez con el ETS. El número de secuencias contabiliza independientemente a las dos secuencias de los heterocigotos. N=número de individuos, RH=riqueza de haplotipos, S=número de sitios polimórficos, Hd=diversidad haplotípica, π =diversidad nucleotídica (Nei, 1987) y SD=desviación estándar. En paréntesis se muestra el número de secuencias por ribotipo. *P<0.05, **P<0.001, ***P<0.0001.

	Latitud	Longitud	Altitud (m s.n.m.)	N	Secuencias obtenidas	Ribotipos	RH	S	Hd +SD	π + SD	D de Tajima	Fs de Fu
Arocutín	19.5366	-101.709	2132	15	23	H2(11), H6(1), H7(7), H8(1), H9(2), H10(1)	4.85	8	0.696 ± 0.0727	0.0027 ± 0.00119	-1.019	-0.872
Zacapu	19.8384	-101.8358	2242	8	12	H1(1), H2(6), H3(1), H9(2), H13(1), H14(1)	6	5	0.758 ± 0.1221	0.0017 ± 0.00142	-1.52*	-3.44 **
San Andrés Coru	19.458	-101.975	1854	12	14	H1(1), H2(8), H3(3), H4(1), H5(1)	4.57	4	0.659 ± 0.1227	0.0015 ± 0.0013	-1.02	-1.998
Nuevo San Juan	19.4190	-102.1161	1931	13	16	H2(11), H5(2), H9(1), H11(1), H12(1)	4.2	4	0.533 ± 0.1421	0.0011 ± 0.00101	-1.54*	-2.75 *
Manantlán	19.6330	-104.3325	1765	12	13	H15(12), H16(1)	1.92	1	0.154 ± 0.1261	0.00028 ± 0.00046	-1.15	-0.53
Valores globales	—	—	—	60	78	—	5.73	22	0.754	0.0021	-1.9*	-11.37***

en una rama de 35 cm (permiso de colecta SEMARNAT SGPA/DGVS/003505/18), de las cuales una hoja sin rastros de herbívoros o de alguna afectación fúngica se preservó en gel de sílice (J. T. Baker, Estado de México, México). Una vez deshidratadas se mantuvieron en un congelador a -20 °C en el laboratorio de Sistemática Molecular de Plantas, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, donde se realizó la extracción del ADN con el kit de Invisorb® Spin Plant Mini Kit (STRATEC, Birkenfeld, Alemania).

Amplificación y secuenciación de ADN

Se amplificó el intrón de cloroplasto *rps16* siguiendo a Oxelman et al. (1997) con los cebadores *rpsF* y *rpsr2* (Cuadro

2). Además, se incluyó una secuencia de este marcador obtenida de GenBank (GenBank, 2022; Cuadro 3) de un individuo reportado para Colima por Manns y Bremer (2010).

Las amplificaciones del ETS se realizaron siguiendo a Becerra (2003) utilizando su cebador BUR1 y el ETS-iR1 (Cuadro 2). Las PCRs se realizaron en un termociclador TC-412 (Techne, Staffordshire, UK). Los fragmentos de ADN resultantes se enviaron a secuenciar a Macrogen Inc., Corea del Sur. Los electroferogramas “forward” y “reverse” se revisaron visualmente y se ensamblaron con Sequencher v. 4.8 (Gene Codes Corp. Ann Arbor, Michigan, EUA). Las secuencias obtenidas se alinearon manualmente en el programa BioEdit v. 7.1.9 (Hall, 1999). Los sitios variables detectados fueron revisados cuidadosamente para descartar errores.



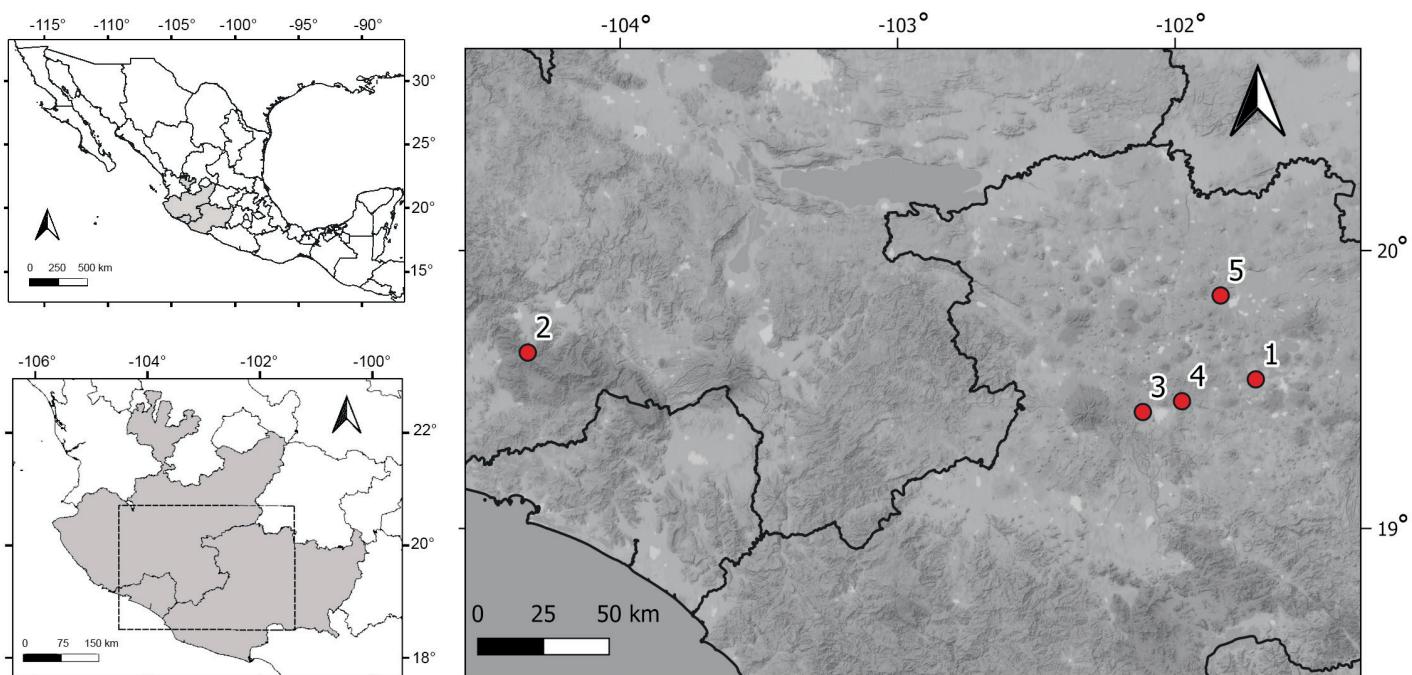


Figura 2: Ubicación geográfica de las poblaciones muestreadas de *Balmea stormiae* Martínez en Michoacán y Jalisco, México. 1. Arocutín; 2. Manantlán; 3. Nuevo San Juan; 4. San Andrés Coru; 5. Zacapu.

Cuadro 2: Secuencia de los cebadores utilizados para las secuencias de núcleo, cloroplasto e ISSR de *Balmea stormiae* Martínez, así como las citas de los estudios donde se retomó la secuencia de nucleótidos de cada cebador.

Marcador	Nombre del Cebador	Secuencia del cebador 5' - 3'	Cita
ETS	ETS-iR1	GGCAGGATCAACCAGGTAGC	Este estudio
	BUR1	GGGCGTGTGAGTGGTGT	Becerra, 2003
rps16	rpsF	GTGGTAGAAAGCAACGTGCGACTT	Oxelman et al., 1997
	rpsR	TCGGGATCGAACATCAATTGCAAC	Oxelman et al., 1997
ISSR	UBC807	AGAGAGAGAGAGAGAGT	George et al., 2017
	UBC811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	George et al., 2017
	UBC814	CTCTCTCTCTCTCT	Muthusamy et al., 2008
	UBC825	ACACACACACACACACT	George et al., 2017
	UBC841	GAGAGAGAGAGAGAGAYC	Muthusamy et al., 2008
	UBC842	CACACACACACACACAYG	Lau et al., 2005
	UBC844	CTCTCTCTCTCTCTCTRC	Lau et al., 2005

En el caso de los ISSR se realizaron pruebas preliminares con 28 cebadores de los desarrollados por el Laboratorio de Biotecnología de Universidad de Columbia Británica, en Vancouver, British Columbia, Canadá. De estos se eligieron

con base en la obtención de bandas claras y su reproducibilidad en todos los ensayos, a los oligonucleótidos denominados UBC807, UBC811, UBC814, UBC825, UBC841, UBC842 y UBC844 (Cuadro 2), anteriormente utilizados en varios estu-

Cuadro 3: Número de acceso GenBank (2022) de los haplotipos obtenidos de cloroplasto y núcleo de *Balmea stormiae* Martínez, así como las localidades donde se distribuían las muestras.

Marcador	Haplótipo	Localidad	Número de acceso GenBank
	H1	57 individuos de las cuatro poblaciones de Michoacán	OL519845
Intrón de cloroplasto <i>rps16</i>	H2	Una secuencia de Colima reportada por Manns y Bremer (2010) 15 secuencias de Manantlán, Jalisco	GQ852371.1 OL548879
	H1	Dos secuencias, una de San Andrés Coru y una de Zacapu, Michoacán	OL598583
	H2	55 secuencias, 14 de San Andrés Coru, 16 de Arocotín, 17 de Nuevo San Juan y ocho de Zacapu, Michoacán	OL598584
	H3	Cinco secuencias, cuatro de San Andrés Coru y una de Zacapu, Michoacán	OL598585
	H4	Una secuencia de San Andrés Coru, Michoacán	OL598586
	H5	Tres secuencias, una de San Andrés Coru y dos de Nuevo San Juan, Michoacán	OL598587
Espaciador transcrito externo del ADN ribosomal nuclear	H6	Una secuencia de Arocotín, Michoacán	OL598588
	H7	Ocho secuencias de Arocotín, Michoacán	OL598589
	H8	Una secuencia de Arocotín, Michoacán	OL598590
	H9	Siete secuencias, tres de Arocotín, dos de Nuevo San Juan y dos de Zacapu, Michoacán	OL598591
	H10	Una secuencia de Arocotín, Michoacán	OL598592
	H11	Una secuencia de Nuevo San Juan, Michoacán	OL598593
	H12	Una secuencia de Nuevo San Juan, Michoacán	OL598594
	H13	Una secuencia de Zacapu, Michoacán	OL598595
	H14	Una secuencia de Zacapu, Michoacán	OL598596
	H15	20 secuencias de Manantlán, Jalisco	OL598597
	H16	Una secuencia de Manantlán, Jalisco	OL598598

dios (Lau et al., 2005; Li y Jin, 2008; Muthusamy et al., 2008; Datta et al., 2010; Gama-Maia y Torres, 2016; George et al., 2017). Las condiciones de amplificación siguieron el procedimiento realizado por Santillán-Mendoza et al. (2018). Los productos de los amplicones se corrieron en geles de agarosa al 1.5%, con TBE 0.5x, a cinco voltios por centímetro (5 V/cm) y un marcador de peso molecular de 100 pb (New England Biolabs, UK). Los geles se sometieron a postinción en una dilución al 3x del colorante GelRed (Biotum, Inc, EUA) por 30 minutos.

Análisis de secuencias de ADN

Las ambigüedades en las secuencias de *rps16* fueron tratadas como datos faltantes y los haplotipos se establecieron en DNAsp v. 5 (Librado y Rozas, 2009). En el caso de los datos nucleares ETS, se evidenciaron los individuos heterocigotos ubicando dobles picos en los electroferogramas de las secuencias. Se detectaron y eliminaron los bloques con recombinación mediante IMgc (Woerner et al., 2007) y las ambigüedades encontradas se resolvieron con el método Phase (Stephens



et al., 2001) del programa DNAsp v. 5 (Librado y Rozas, 2009). Con este mismo programa se calcularon los índices de diversidad nucleotídica de Nei (π , Nei, 1987), diversidad haplotípica (Hd, Nei, 1987), diferenciación genética (G_{ST} , Nei, 1973) y flujo genético (Nm, Wright, 1951), tanto para *rps16* como para ETS. Las relaciones genealógicas entre haplotipos se infirieron con redes de “median-joining” en PopART v. 1.7 (Bandelt et al., 1999).

La baja variabilidad genética obtenida en *rps16* de este muestreo impidió realizar análisis adicionales con estas secuencias de cloroplasto. En el caso de ETS, para tratar de comparar variabilidad genética, compensando el diferente tamaño del muestreo entre las poblaciones, se obtuvo la riqueza de haplotipos (RH) con el programa SPAGeDi v. 1.5a (Hardy y Vekemans, 2002). Los análisis que se describen a continuación se realizaron con las secuencias de ETS, considerando dos regiones (Jalisco y Michoacán) y las cinco poblaciones, una en Jalisco y cuatro dentro de Michoacán. Se realizaron análisis “mismatch distribution” y de partición de la variabilidad genética (AMOVA), así como la obtención de las F_{ST} pareadas en Arlequin v. 3.5.2 (Excoffier y Lischer, 2010). Se evaluó la estructura filogeográfica comparando G_{ST} y N_{ST} en PERMUT-CPSSR v. 2.0 (Pons y Petit, 1996). Las pruebas de neutralidad con F_s de Fu (Fu, 1997) y D de Tajima (Tajima, 1989) se realizaron en DNAsp v. 5 (Librado y Rozas, 2009) y Arlequin v. 3.5.2 (Excoffier y Lischer, 2010). Se evaluó el aislamiento por distancia con una prueba de Mantel (1967) en GenAIEx v. 6.5 (Peakall y Smouse, 2006), usando los valores de las F_{ST} pareadas y las distancias geográficas lineales, realizando dos análisis, uno incluyendo todas las poblaciones y otro excluyendo Manantlán, la localidad más alejada.

Análisis de datos ISSR

Las bandas resultantes de las amplificaciones se codificaron como caracteres binarios (Wolfe, 2005). Utilizando Popgenie v. 1.31 (Yeh et al., 1999), se estimó el número de alelos observados (Na), el número de alelos efectivos (Ne) (Kimura y Crow, 1964), la diversidad genética de Nei (h) (Nei, 1973), el porcentaje de loci polimórficos (%P), el índice de Shannon (I) (Shannon, 1948) y la diferenciación genética (G_{ST}) (Nei, 1973). El flujo genético se calculó como: $Nm=0.5(1-G_{ST}) / G_{ST}$, con el supuesto de que todas las poblaciones

tienen el mismo flujo genético. Con GenAIEx v. 6.5 (Peakall y Smouse, 2006), se obtuvieron las distancias genéticas entre las poblaciones con el método de Nei (1972). Se realizó el AMOVA con dos regiones (Jalisco y Michoacán) y poblaciones dentro de Michoacán. La prueba de Mantel (1967) se efectuó entre las distancias genéticas de Nei y las distancias geográficas lineales entre las poblaciones, realizando dos análisis, uno incluyendo todas las poblaciones y otro excluyendo Manantlán, la localidad más alejada.

La estructura genética se determinó con STRUCTURE v. 2.3 (Pritchard et al., 2000) considerando los datos como marcadores dominantes (Falush et al., 2007) usando el modelo de ancestría mezclada (Admixture model) y frecuencias alélicas correlacionadas (Allele Frequencies Correlated). El análisis se hizo con un periodo burn-in de 100,000, longitud de corrida de 1,000,000 generaciones de MCMC (cadenas Markovianas de Monte Carlo) y 10 réplicas independientes para cada valor de K (de 1 a 6). Se determinó el número adecuado de grupos con el valor de delta K de acuerdo con Evanno et al. (2005) en Structure Harvester v. 0.6.94 (Earl y VonHoldt, 2012).

Resultados

Diversidad genética y redes de haplotipos con *rps16* y ETS

El alineamiento de *rps16* consistió en 73 individuos y 716 posiciones, presentando baja diversidad haplotípica ($Hd=0.335\pm0.056$) y baja diversidad nucleotídica ($\pi=0.0014\pm0.00024$). Se encontraron dos haplotipos separados por tres sustituciones. El haplotipo con mayor frecuencia (H1) se presenta en 57 muestras de las cuatro poblaciones de Michoacán (Cuadro 3). El haplotipo menos frecuente se encontró en 16 muestras, 15 de Jalisco y una de Colima (Cuadro 3). Consecuentemente la red de haplotipos separa las poblaciones de Michoacán de las de Jalisco/Colima (Fig. 3C).

En los datos de ETS se incluyó cada elemento del par de secuencias de los heterocigotos detectados, por lo que el alineamiento resultó de 78 secuencias, 560 posiciones y 17 sitios polimórficos (S). La diversidad haplotípica fue alta ($Hd=0.754 \pm 0.041$) y la diversidad nucleotídica baja ($\pi=0.0021$). Las poblaciones con mayor diversidad haplotípica y nucleotídica son Arocutín y Zacapu; en cambio en Ma-



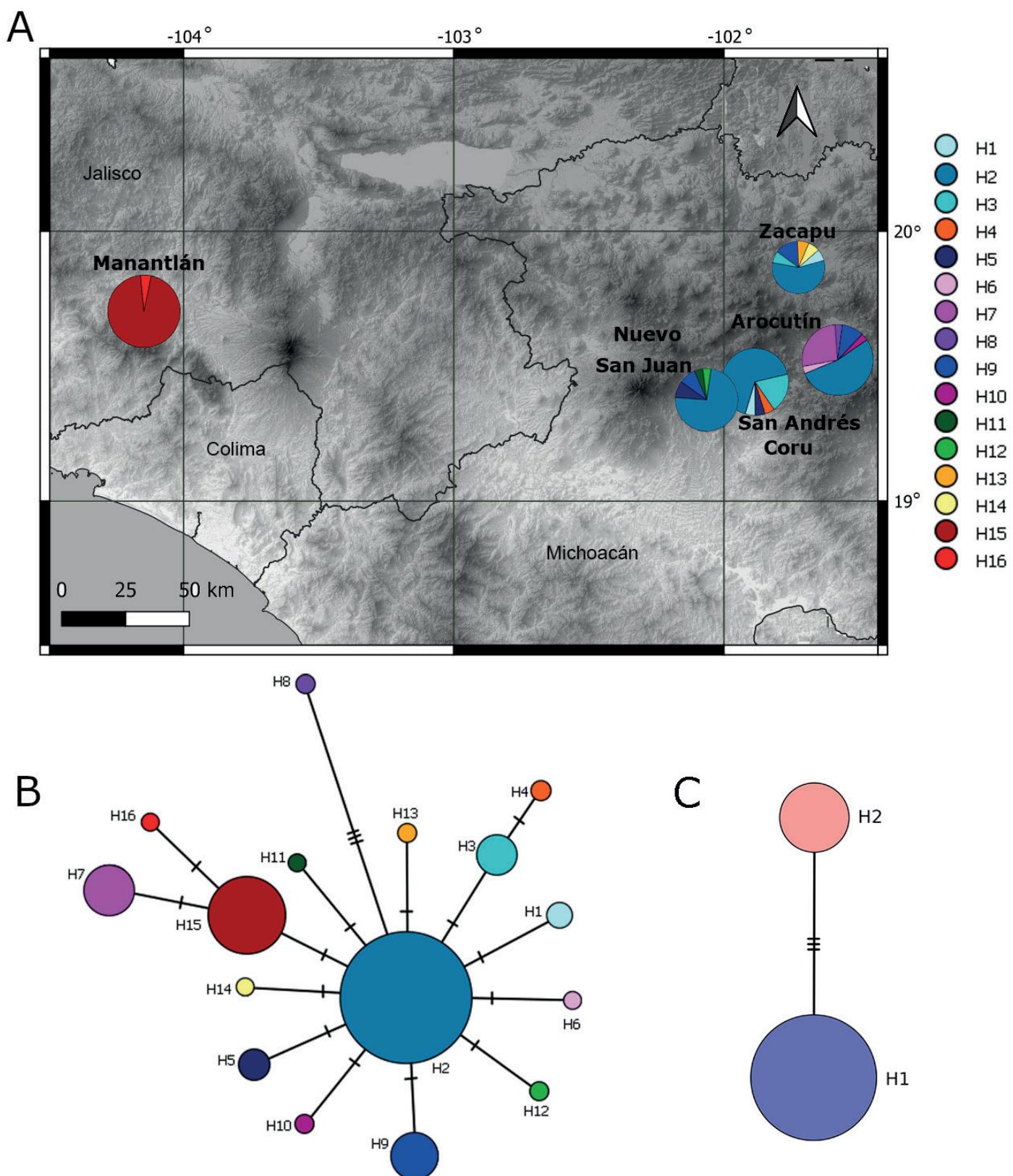


Figura 3: A. distribución geográfica de los ribotipos del ETS obtenidos de cinco poblaciones de *Balmea stormiae* Martínez del centro-occidente de México, donde los colores de la derecha diferencian los 16 ribotipos encontrados; B. red de los ribotipos referidos; C. red de haplotipos con *rps16*, el haplotipo H1 se encuentra en las poblaciones de Michoacán y el H2 en Manantlán (Jalisco) y Colima.

nantlán, Jalisco se presentó la menor diversidad (**Cuadro 1**). En el caso de la estimación de la riqueza de haplotipos (RH) se obtuvo que Zacapu presenta la mayor riqueza de haplotipos (RH=6), seguido de Arocotín (RH=4.85), mientras que Manantlán presentó la menor (RH=1.92). Se obtuvieron 16 ribotipos (H) dispuestos en una red de haplotipos en forma de estrella: al centro el ribotipo más común (H2), presente en 55 secuencias de Michoacán, seguido por un ribotipo (H15) presente en 20 secuencias de Jalisco (**Cuadro 3**). Al menos un ribotipo único se encontró en todas las poblaciones estudiadas. No se presentaron ribotipos compartidos entre Michoacán y Jalisco (**Figs. 3A, B**).

Estructura genética

El valor de N_{ST} no fue significativamente mayor que el G_{ST} , lo que indica ausencia de estructura filogeográfica ($N_{ST}=0.349$, $G_{ST}=0.182$, $P>0.05$). El AMOVA con los datos ETS indicó que 51.76% de la variación fue explicada por las

diferencias dentro de las poblaciones, mientras que 7.57% de la diversidad genética se encontró entre poblaciones y aunque la variación entre regiones es de 40.67%, este valor no fue significativo (**Cuadro 4**). Los valores más altos de las F_{ST} pareadas con ETS (0.35 a 0.71, $P<0.05$) se presentaron entre la población de Manantlán (Jalisco) y las cuatro poblaciones de Michoacán (**Cuadro 5**). En Michoacán, Arocotín presentó los mayores niveles de diferenciación al compararla con las demás poblaciones, con valores de F_{ST} moderados y bajos (entre 0.15 y 0.099, $P<0.05$). Por otro lado, San Andrés Coru y Nuevo San Juan, localidades cercanas geográficamente, mostraron una F_{ST} baja ($F_{ST}=0.073$, $P<0.05$), mientras que Zacapu presentó F_{ST} bajos respecto a San Andrés Coru (0.024, $P>0.05$) y Nuevo San Juan (0.0085, $P>0.05$). El flujo genético global, incluyendo todas las poblaciones, fue relativamente bajo ($Nm=0.81$), mientras que el flujo genético sin incluir la población de Jalisco fue moderado ($Nm=8.95$).

Cuadro 4: Resultados del AMOVA del ETS e ISSR en cinco poblaciones de *Balmea stormiae* Martínez. * $P<0.001$, ** $P<0.0001$.

	Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	% de variación	Índice de fijación
AMOVA del ETS	Entre regiones	1	9.003	40.67	$F_{CT}=0.406$
	Entre poblaciones	3	4.483	7.57	$F_{SC}=0.127^*$
	Dentro de poblaciones	73	32.81	51.76	$F_{ST}=0.482^{**}$
	Total	77	46.29	100	
AMOVA de ISSR	Entre regiones	1	81.141	17	$F_{CT}=0.169^*$
	Entre poblaciones	3	73.818	7	$F_{SC}=0.084^*$
	Dentro de poblaciones	76	752.376	76	$F_{ST}=0.239^*$
	Total	80	907.335	100	

Cuadro 5: Comparaciones de F_{ST} por pares de poblaciones en *Balmea stormiae* Martínez. Los valores de ISSR arriba de la diagonal y de ETS debajo de la diagonal. * $P<0.05$.

	San Andrés Coru	Arocotín	Nuevo San Juan	Zacapu	Manantlán
San Andrés Coru	----	0.031*	0.095*	0.105*	0.266*
Arocotín	0.15301*	----	0.089*	0.113*	0.238*
Nuevo San Juan	0.07324*	0.12322*	----	0.079*	0.234*
Zacapu	0.02369	0.09970	-0.00854	----	0.208
Manantlán	0.66947*	0.34636*	0.71208*	0.65169*	----

Historia demográfica

Los valores globales de D de Tajima (-1.88, $P<0.05$), de Fs de Fu (-11.45, $P<0.05$) y la distribución unimodal en el “mismatch distribution” sugirieron que hay señal de una expansión demográfica reciente en *B. stormiae*. A nivel de poblaciones, se obtuvo D de Tajima y Fs de Fu negativas y significativas para Zacapu (-1.22 y -3.44, $P<0.05$) y para San Juan Nuevo (-1.54 y -2.75, $P<0.05$), sugiriendo que hay desviaciones de la neutralidad esperada y expansión poblacional. Los resultados de la prueba de Mantel, incluyendo todas las poblaciones, indicaron una alta relación positiva (no significativa) entre la distancia geográfica y la distancia genética calculada ($R^2=0.790$, $P>0.05$), obteniendo una mucho menor correlación si se excluye la población de Jalisco ($R^2=0.222$, $P>0.05$).

Diversidad genética con ISSR

La matriz ISSR produjo 97 loci (bandas) oscilando entre 11 (UBC807) y 22 (UBC841) por marcador y se generaron 81 genotipos diferentes. Se encontró un alto porcentaje de loci polimórficos (80.41%). La diferenciación genética fue moderada, como indicó la F_{ST} (0.239, $P<0.001$), presentándose los valores más altos entre la población de Manantlán y las de Michoacán (**Cuadro 5**). La población de Arocotín fue la más diversa, ya que presentó el mayor porcentaje de loci polimórficos (60.82%), el mayor número de alelos

observados ($Na=1.6082$) y alelos efectivos ($Ne=1.3953$), así como los valores más altos de diversidad genética de Nei ($h=0.2271$) y de Shannon ($I=0.3359$). Por el contrario, la población de Manantlán fue la que presentó menores niveles de diversidad (**Cuadro 6**).

El AMOVA con ISSR indicó que 76% de la variación fue explicada dentro de las poblaciones ($F_{ST}=0.239$, $P<0.001$), seguido por 17% entre las regiones de Michoacán y Jalisco ($F_{CT}=0.169$, $P<0.001$), mientras 7% de la variación restante fue entre poblaciones ($F_{SC}=0.084$, $P<0.001$) (**Cuadro 4**). El delta K del método de Evanno en STRUCTURE Harvester indicó que el número óptimo de grupos genéticos fue cuatro. La estructura genética coincidió con la distribución geográfica de *B. stormiae* en Jalisco y Michoacán, pero con ancestría mezclada en la mayoría de los individuos (**Figs. 4A, B**). La prueba de Mantel con ISSR, incluyendo todas las poblaciones, indicó una correlación positiva significativa ($R^2=0.921$, $P<0.05$), contrastando con la nula correlación obtenida ($R^2=0.054$, $P>0.05$) para esta misma prueba si se excluye la población de Jalisco.

Discusión

Diversidad genética y redes de haplotipos

La baja variabilidad del *rps16* de cloroplasto respecto a la de los datos ribosomales es lo esperado (**Baldwin et al., 1995**), ya que el menor tamaño efectivo poblacional de las

Cuadro 6: Medidas de diversidad genética de cinco poblaciones de *Balmea stormiae* Martínez con ISSR. N=número de individuos, Na =número de alelos observados, Ne =número de alelos efectivos (Kimura y Crow, 1964), h =diversidad genética de Nei (1973), I =índice de Shannon (Shannon, 1948).

	N	Na	Ne	h	I	# loci polimórficos	% loci polimórficos
Arocotín	19	1.6082 ± 0.4907	1.3953 ± 0.3884	0.2271 ± 0.2064	0.3359 ± 0.2933	59	60.82
Zacapu	14	1.5876 ± 0.4948	1.3733 ± 0.3843	0.2149 ± 0.2076	0.3179 ± 0.2953	57	58.76
Nuevo San Juan	16	1.567 ± 0.4981	1.3744 ± 0.3995	0.2115 ± 0.2135	0.3103 ± 0.3027	55	56.7
San Andrés Coru	16	1.5464 ± 0.5004	1.3661 ± 0.3948	0.2084 ± 0.2104	0.3068 ± 0.2997	53	54.64
Manantlán	16	1.5361 ± 0.5013	1.3019 ± 0.3656	0.1778 ± 0.197	0.2682 ± 0.2821	52	53.61
GLOBAL	81	1.8041 ± 0.3989	1.4249 ± 0.3644	0.2518 ± 0.1858	0.3832 ± 0.2546		



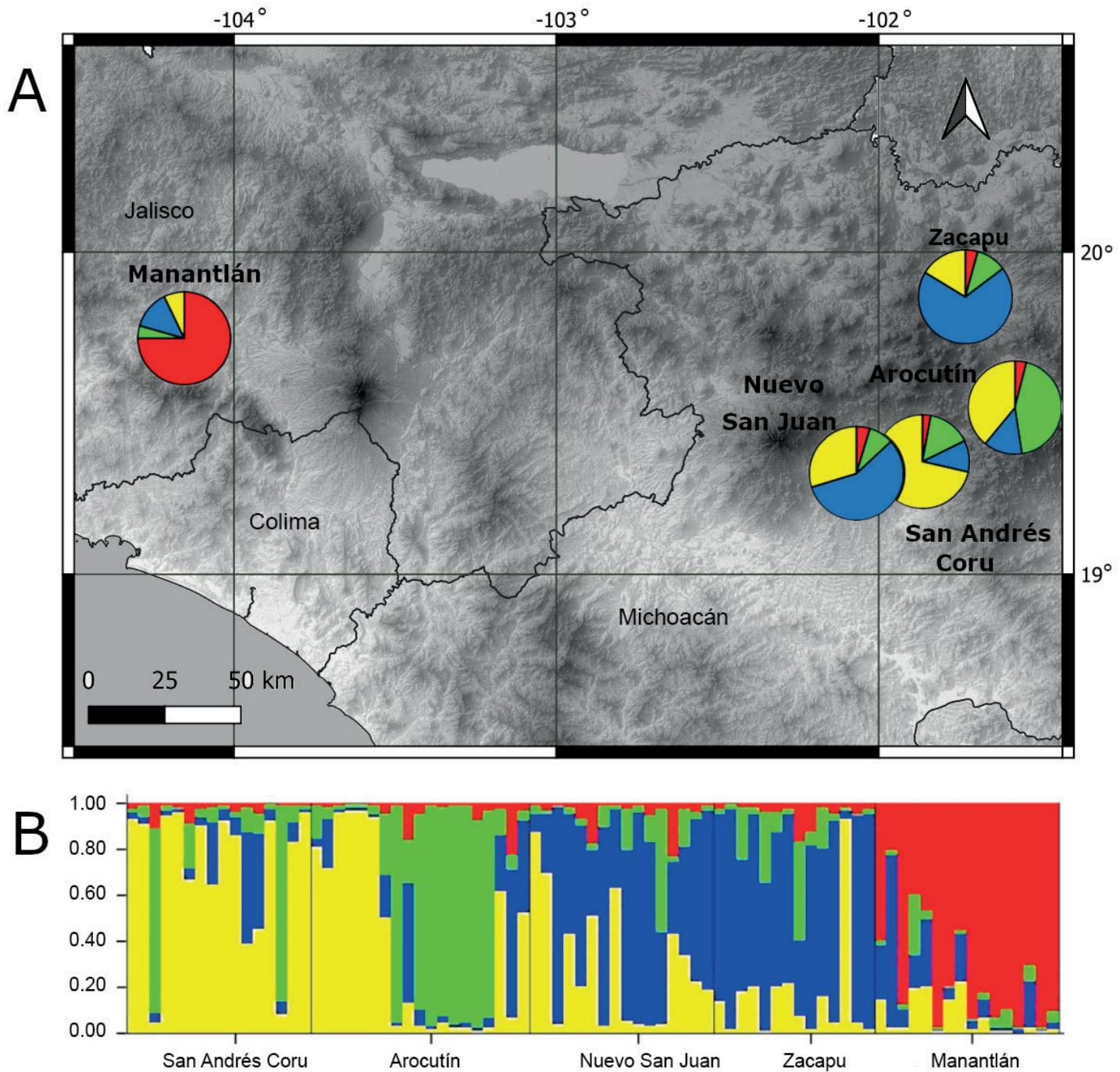


Figura 4: Agrupación de las poblaciones de *Balmea stormiae* Martínez de Michoacán y Jalisco obtenidas con STRUCTURE. A. distribución de los grupos genéticos obtenidos; B. asignación de los grupos genéticos a partir de los datos ISSR de las poblaciones estudiadas para el delta K=4, donde cada color representa un diferente grupo genético.

regiones de cloroplasto, comparado con el de las regiones nucleares, incide en este patrón (McCauley, 1995; Hare, 2001). Sin embargo, no era esperado el contraste entre la nula diferenciación entre las poblaciones de Michoacán y

la gran diferenciación entre las poblaciones de este estado y la de Jalisco. Factores como la separación geográfica entre las regiones de Michoacán y Jalisco, la perturbación del ambiente y la fragmentación del hábitat pueden redu-

cir el tamaño efectivo de las poblaciones (como ha sido documentado por ejemplo en [Young et al., 1996](#)). Como consecuencia de todo lo anterior, el transporte de semillas y polen de una región a otra puede ser muy deficiente, reduciendo la tasa de flujo genético e incrementándose la endogamia dentro de las poblaciones ([Young et al., 1996](#); [Frankham et al., 2002](#); [Lowe et al., 2005](#)). Esta situación se magnifica para las regiones de cloroplasto dada la menor capacidad de dispersión de las semillas comparada con la del polen ([Petit et al., 2005](#)). En casos como este donde existe aislamiento geográfico, reducción en el tamaño poblacional y alta diferenciación entre poblaciones, se ha documentado que la deriva genética actúa con mayor fuerza reduciendo la variabilidad dentro de las poblaciones ([Setsuko et al., 2007](#)).

La diferenciación genética entre las poblaciones de Michoacán fue baja, tanto en el caso de los datos de ETS, como de los ISSR. En cambio, esta es de mayores proporciones entre la población de Jalisco respecto a las poblaciones de Michoacán, siendo considerable en el caso de los datos de ETS y moderada en el caso de los ISSR. Una diferenciación alta entre las localidades de estas regiones también se evidenció con los datos de cloroplasto, a pesar de la poca variabilidad encontrada en este marcador, ya que no se detectaron haplotipos compartidos entre Michoacán y Jalisco. Además, con ambos marcadores de núcleo el aislamiento por distancia se evidencia cuando se incluye la población de Jalisco, pero no es así cuando solo se pone a prueba entre las poblaciones de Michoacán. Esto podría estar evidenciando una dinámica de islas en el cielo (“sky-island dynamic”) como lo sugerido por [Mastretta-Yanes et al. \(2015\)](#). Tomando en cuenta esto, se puede afirmar que las poblaciones de *B. stormiae* de la región de Manantlán (Jalisco/Colima) presentan conectividad limitada con las de Michoacán como consecuencia de la separación por tierras bajas que funcionan como barreras para la dispersión de esta especie. Lo anterior es consistente con la ausencia de haplotipos compartidos y con la diferenciación genética con los datos de *rps16* y ETS entre estas dos regiones. Por otro lado, la menor distancia geográfica entre las poblaciones de *B. stormiae* distribuidas en Michoacán favoreció la conectividad entre éstas, lo cual pudo haber permitido la colonización por semillas entre los diferentes volcanes de la

región de manera escalonada (“stepping stone”), así como una dispersión del polen más efectiva ([Mastretta-Yanes et al., 2015](#)). El modelo de “stepping stone” también podría dar explicación a la ausencia de una relación estadísticamente significativa entre la distancia genética y geográfica con el ETS indicando una alta conectividad entre las montañas de Michoacán ([Mastretta-Yanes et al., 2015](#)).

Estructura genética e historia demográfica

Los resultados obtenidos en el AMOVA con ETS e ISSR indican que los porcentajes de variación genética coinciden en ser bajos entre poblaciones, intermedios entre regiones y altos dentro de las poblaciones, indicando flujo genético entre poblaciones (al menos entre las poblaciones de Michoacán) y bajo entre regiones. Mientras tanto, la alta variación genética dentro de las poblaciones puede ser consecuencia de una expansión demográfica, detectada por la *D* de Tajima, *Fs* de Fu y la “mismatch distribution”, con datos del ETS.

La ausencia de estructura filogeográfica estimada con G_{ST} y N_{ST} con los datos del ETS es congruente con su red de haplotipos, que muestra una estructura filogeográfica muy simple reflejando principalmente la separación entre las poblaciones de Michoacán y Jalisco. Por otro lado, la combinación de diversidad haplotípica alta y diversidad nucleotídica baja de este marcador en conjunto con la red de haplotipos con forma de estrella, en la que hay un haplotipo notoriamente predominante, también sugiere un crecimiento poblacional reciente ([Avise, 2000](#)).

Es de resaltar que los altos valores de loci polimórficos, diversidad genética de Nei y diversidad de Shannon obtenidos con ISSR para la especie en estudio son similares a los reportados en otras especies de rubiáceas, como *Psychotria hastisepala* Müll. Arg. y *Morinda tomentosa* B. Heyne ex Roth ([Arya et al., 2014](#); [Silva et al., 2014](#)). Para *P. hastisepala* por ejemplo, se sugirió que los niveles de variabilidad genética se atribuyen a su autoincompatibilidad y reproducción vegetativa ([Silva et al., 2014](#)). Estos factores deberán ser descartados para *B. stormiae* en estudios venideros.

Otra hipótesis por comprobar en futuros estudios es la concordancia de los niveles de variación genética para las poblaciones de Michoacán obtenidos tanto con ISSR como



con la π del ETS, con la orogénesis reportada para los flujos de lava de mayor a menor antigüedad: Arocútín, Zacapu, San Andrés Coru y Nuevo San Juan (Bocco et al., 1998; Martínez y Ramírez, 1998; Chevrel et al., 2016; García-Quintana et al., 2016; Osorio-Ocampo, 2018; Reyes-Guzmán, 2018). Es decir, las poblaciones con mayor diversidad genética (Arocútín y Zacapu) se encuentran en los flujos de lava más antiguos, mientras que las poblaciones menos diversas se encuentran sobre los pedregales más recientes. Si esto se comprueba en estudios posteriores, será congruente con el argumento de que la variación genética de poblaciones ancestrales es mayor que la presente en las poblaciones más recientes, ya que estas últimas han tenido menos tiempo para acumular diferencias (Mastretta-Yanes et al., 2015). Sin embargo, al parecer esto no aplica a la población de Manantlán que presenta la menor variación genética y se encuentra en la erupción más antigua del Mioceno-Pleistoceno (Martínez y Ramírez, 1998). Esta observación podría confirmar que esta población está aislada de las demás poblaciones, tanto por distancia como por la orografía del lugar, lo que incide negativamente en el flujo genético y aumenta su endogamia.

Otra hipótesis aventurada, por confirmar, tiene que ver con los valores negativos y significativos de los estimadores de neutralidad que indican expansión poblacional de *B. stormiae*, lo que podría estar relacionado con los supuestos de la dinámica de la vegetación durante el Cuaternario Tardío, los cuales indican que los cambios en la estructura de la vegetación en el Holoceno fueron provocados por las actividades humanas durante los últimos 4000 años (Cabaillero-Rodríguez et al., 2018). En ese sentido, se reporta que los primeros asentamientos humanos en Zacapu datan de aproximadamente 1500 a. C. (Reyes-Guzmán et al., 2018). Se estima que, en su apogeo, la población prehispánica de esta localidad albergó alrededor de 20,000 habitantes, abarcando 1100 hectáreas sobre el pedregal (Michelet, 1998; Migeon, 1998; Smith, 2005; Forest, 2014). Si suponemos que se utilizaron los recursos forestales disponibles en la región para la subsistencia de estos asentamientos humanos, esto pudo haber originado una recurrente perturbación al hábitat, incidiendo en la variación genética de esta especie. Sin embargo, el abandono posterior del pedregal durante la conquista pudo propiciar el crecimien-

to poblacional de *B. stormiae*; esto antes de nuevamente ser perturbada en tiempos actuales (Martínez-Salas et al., 2017; Reyes-Guzmán et al., 2018).

Implicaciones para la conservación

Este es el primer estudio que contribuye al entendimiento de la genética poblacional de *B. stormiae*, especie considerada en peligro de extinción, distribuida en regiones aisladas. No obstante, es necesario llevar a cabo futuros análisis ampliando el tamaño del muestreo e incluyendo poblaciones de Colima, Guerrero, Oaxaca, Nayarit, Guatemala y El Salvador. Además, se sugiere explorar otros marcadores moleculares para fechar con precisión eventos de contracción y expansión demográfica para corroborar las hipótesis aquí expuestas y tener más elementos para establecer estrategias de conservación adecuadas para esta especie. Con base al trabajo de campo realizado en este estudio, considerando la perturbación observada en las diferentes localidades y el bajo número de individuos censados, se constata a esta especie en peligro de extinción (Martínez Salas et al., 2017).

Contribución de autores

JMC ideó la investigación. DMJ realizó la investigación en campo para la adquisición de las muestras, investigación de laboratorio y analizó los datos con ayuda de AGR y JCM. DMJ escribió el manuscrito inicial. AGR, ERS, LMC, SLC contribuyeron en el diseño, discusión y revisión del manuscrito final. JMC y DMJ atendieron las correcciones de los revisores hasta la publicación del artículo.

Financiamiento

Este estudio fue apoyado por la beca de posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología otorgada a DMJ (número de beca 461974, Registro 618622) y por la Coordinación de la Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Agradecimientos

Se agradece a Ulises de la Paz Ruiz, Ramón Cuevas Guzmán, Valente Sánchez Rodríguez, Alberto Rivera Ortiz, Adán Morales y Pablo Carrillo Reyes por su ayuda en las recolectas de campo. A María de la Luz Pérez García y Goretti Mendo-



za por su apoyo en el laboratorio. A los curadores y personal de los herbarios MEXU, IBUG-CUCBA, ZEA-CuCSur, IEB por su amable atención. A la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales de México por el permiso de colecta otorgado (SEMARNAT SGPA/DGVS/003505/18). Agradecimientos especiales a los revisores anónimos y editores de esta revista que mejoraron notablemente el documento.

Literatura citada

- Arya, L., R. K. Narayanan, M. Verma, A. K. Singh y V. Gupta. 2014. Genetic diversity and population structure analyses of *Morinda tomentosa* Heyne, with neutral and gene-based markers. *Genetic Resources and Crop Evolution* 61(8): 1469-1479. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10722-014-0168-4>
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press. Cambridge, USA. 464 pp. DOI: <https://doi.org/10.2307/j.ctv1nzfgj7>
- Baldwin, B. G., M. J. Sanderson, J. M. Porter, M. F. Wojciechowski, C. S. Campbell y M. J. Donoghue. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82(2): 247-277. DOI: <https://doi.org/10.2307/2399880>
- Bandelt, H. J., P. Forster y A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16(1): 37-48. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Becerra, J. X. 2003. Evolution of Mexican *Bursera* (Burseraceae) inferred from ITS, ETS, and 5S nuclear ribosomal DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26(2): 300-309. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(02\)00256-7](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(02)00256-7)
- Bocco, V., A. Torres, A. Velázquez y C. Siebe. 1998. Geomorfología y recursos naturales en comunidades rurales. El caso de Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán. *Geografía y Desarrollo* 16: 71-84.
- Borhidi, A. 2012. Rubiáceas de México. Akadémiai Kiadó. Budapest, Hungría. 608 pp.
- Caballero-Rodríguez, D., A. Correa-Metrio, S. Lozano-García, S. Sosa-Nájera, B. Ortega, Y. Sanchez-Dzib, K. Aguirre-Navarro y A. Sandoval-Montaña. 2018. Late-Quaternary spatiotemporal dynamics of vegetation in Central Mexico. *Review of Palaeobotany and Palynology* 250: 44-52. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.revpalbo.2017.12.004>
- Chevrel, M. O., M. N. Guilbaud y C. Siebe. 2016. The ~AD 1250 effusive eruption of El Metate shield volcano (Michoacán, Mexico): magma source, crustal storage, eruptive dynamics, and lava rheology. *Bulletin of Volcanology* 78(4): 32. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00445-016-1020-9>
- CITES. 2022. Apéndice I. Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES). <https://cites.org> (consultada septiembre de 2022).
- Datta, J., N. Lal, M. Kaashyap y P. P. Gupta. 2010. Efficiency of three PCR based marker systems for detecting DNA polymorphism in *Cicer arietinum* L. and *Cajanus cajan* L. Millspaugh. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal* 2010: 1-15.
- Earl, D. A. y B. M. VonHoldt. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4(2): 359-361. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Evanno, G., S. Regnaut y J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology* 14(8): 2611-2620. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Excoffier, L. y H. E. L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10(3): 564-567. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Falush, D., M. Stephens y J. K. Pritchard. 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7(4): 574-578. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x>
- Forest, M. 2014. *Approches spatio-archéologiques de la structure sociale des sites urbains du Malpaís de Zacapu*. PhD dissertation, Université de Paris. Panthéon/Sorbonne, Paris.
- Fosberg, F. R. 1974. Studies in American Rubiaceae 2. Ayuque, *Balmea stormiae*, an endangered Mexican species. *SIDA, Contributions to Botany* 5(4): 268-270. <https://www.biodiversitylibrary.org/part/161977> (consultado junio de 2017).
- Frankham, R., J. D. Ballou y D. A. Briscoe. 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press.



- Cambridge, UK. 617 pp. DOI: <https://doi.org/10.1017/CBO9780511808999>
- Fu, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147(2): 915-925. DOI: <https://doi.org/10.1093/genetics/147.2.915>
- Gama-Maia, D. J. y R. A. Torres. 2016. Fine-scale genetic structuring, divergent selection, and conservation prospects for the overexploited crab (*Cardisoma guanhumi*) in tropical mangroves from North-eastern Brazil. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 96(8): 1677-1686. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0025315415002052>
- García-Quintana, A., A. Goguitchaichvili, J. Morales, M. Cervantes Solano, S. Osorio-Ocampo, J. L. Macías y J. Urrutia-Fucugauchi. 2016. Datación magnética de rocas volcánicas formadas durante el Holoceno: caso de flujos de lava alrededor del Lago de Pátzcuaro (campo volcánico Michoacán-Guanajuato). *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas* 33(2): 209-220. <https://www.scielo.org.mx/pdf/rmcg/v33n2/2007-2902-rmcg-33-02-00209.pdf> (consultado enero de 2018).
- GenBank. 2022. National Center for Biotechnology Information <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> (consultado septiembre de 2022).
- George, B., P. R. Choudhury, I. P. Singh, V. S. Meena, S. M. Quatadah, A. Bohra, F. Singh y N. P. Singh. 2017. Comparative analysis of RAPD and ISSR markers in estimating the genetic relationship among cultivated and wild genotypes of pigeonpea (*Cajanus cajan*). *Vegetos-An International Journal of Plant Research* 30(Special): 378-387. DOI: <https://doi.org/10.5958/2229-4473.2017.00102.1>
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Hardy, O. J. y X. Vekemans. 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* 2(4): 618-620. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00305.x>
- Hare, M. P. 2001. Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends in Ecology & Evolution* 16(12): 700-706. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02326-6](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02326-6)
- INE. 2000. Programa de manejo de la Reserva de la Biosfera Sierra de Manantlán, México. Instituto Nacional de Ecología, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). México, D.F., México. 203 pp.
- Kimura, M. y J. F. Crow. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49(4): 725-738. DOI: <https://doi.org/10.1093/genetics/49.4.725>
- Lau, C. P., L. Ramsden y R. M. Saunders. 2005. Hybrid origin of "*Bauhinia blakeana*" (Leguminosae: Caesalpinoideae), inferred using morphological, reproductive, and molecular data. *American Journal of Botany* 92(3): 525-533. DOI: <https://doi.org/10.3732/ajb.92.3.525>
- Li, J.-M. y Z.-X. Jin. 2008. Genetic structure of endangered *Emmenopterys henryi* Oliv. based on ISSR polymorphism and implications for its conservation. *Genetica* 133(3): 227-234. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10709-007-9204-z>
- Librado, P. y J. Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25(11): 1451-1452. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- Lowe, A. J., D. Boshier, M. Ward, C. F. E. Bacles y C. Navarro. 2005. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity* 95: 255-273. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800725>
- Manns, U. y B. Bremer. 2010. Towards a better understanding of intertribal relationships and stable tribal delimitations within Cinchonoideae s.s. (Rubiaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56(1): 21-39. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.04.002>
- Mantel, M. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27(2): 209-220.
- Martínez, M. 1942. A new genus of Rubiaceae from Mexico. *Bulletin Torrey Botanical Society* 69(6): 438-441. DOI: <https://doi.org/10.2307/2481425>
- Martínez, R. L. M. y R. J. M. Ramírez. 1998. Unidades fisiográficas de la Reserva de la Biosfera Sierra de Manantlán bajo un sistema de información geográfica. *Tierra Latinoamericana* 16(3): 195-203.
- Martínez Salas, E., S. Oldfield y M.-S. Samain. 2017. *Balmea stormiae*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T61532862A61532866. DOI: <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T61532862A61532866.en>

- Mastretta-Yanes, A., A. Moreno-Letelier, D. Piñero, T. H. Jorgensen y B. C. Emerson. 2015. Biodiversity in the Mexican highlands and the interaction of geology, geography and climate within the Trans-Mexican Volcanic Belt. *Journal of Biogeography* 42(9): 1586-1600. DOI: <https://doi.org/10.1111/jbi.12546>
- McCauley, D. E. 1995. The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. *Trends in Ecology and Evolution* 10(5): 198-202. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)89052-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)89052-7)
- Medina, G. C., F. Guevara-Féfer, R. M. A. Martínez, P. Silva-Sáenz, M. A. Chávez-Carbajal y R. I. García. 2000. Estudio florístico en el área de la comunidad indígena de Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México. *Acta Botanica Mexicana* 52: 5-41. DOI: <https://doi.org/10.21829/abm52.2000.853>
- Michelet, D. 1998. Topografía y prospección sistemática de los grandes asentamientos del Malpaís de Zacapu: claves para un acercamiento a las realidades sociopolíticas. In: Darras, V. (ed.). *Génesis, culturas y espacios en Michoacán*. Centro de Estudios Mexicanos y Centroamericanos (CEMCA). México, D.F., México. Pp. 47-59. DOI: <https://doi.org/10.4000/books.cemca.3396>
- Migeon, G. 1998. El poblamiento del Malpaís de Zacapu y de sus alrededores del Clásico al Posclásico. In: Darras, V. (ed.). *Génesis, culturas y espacios en Michoacán*. Centro de Estudios Mexicanos y Centroamericanos (CEMCA). México, D.F., México. Pp. 36-45. DOI: <https://doi.org/10.4000/books.cemca.3395>
- Molina-Paniagua, M. E. y S. Zamudio Ruiz. 2010. Estudio florístico del Pedregal de Arócutin, en la cuenca del Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México. *Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes* fascículo complementario XXV: 1-42. DOI: <https://doi.org/10.21829/fb.167.2010.XXV>
- Muthusamy, S., S. Kanagarajan y S. Ponnusamy. 2008. Efficiency of RAPD and ISSR markers system in accessing genetic variation of rice bean (*Vigna umbellata*) landraces. *Electronic Journal of Biotechnology* 11(3): 32-41.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *The American Naturalist* 106(949): 283-292. DOI: <https://doi.org/10.1086/282771>
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70(12): 3321-3323. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.70.12.3321>
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York, USA. 512 pp. DOI: <https://doi.org/10.7312/nei-92038>
- Osorio-Ocampo, S., J. L. Macías, A. Pola, S. Cardona-Melchor, G. Sosa-Ceballos, V. H. Garduño-Monroy, P. W. Layer, L. García-Sánchez, M. Perton y J. Benowitz. 2018. The eruptive history of the Pátzcuaro Lake area in the Michoacán Guanajuato Volcanic Field, central México: Field mapping, C-14 and 40Ar/39Ar geochronology. *Journal of Volcanology and Geothermal Research* 358: 307-328. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jvolgeores.2018.06.003>
- Oxelman, B., M. Lidén y D. Berglund. 1997. Chloroplast *rps16* intron phylogeny of the tribe Sileneae (Caryophyllaceae). *Plant Systematics and Evolution* 206(4): 393-410. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00987959>
- Peakall, R. y P. E. Smouse. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6(1): 288-295. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
- Petit, R. J., J. Duminil, S. Fineschi, A. Hampe, D. Salvini y G. G Vendramin. 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology* 14(3): 689-701. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02410.x>
- Pons, O. y R. J. Petit. 1996. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics* 144(3): 1237-1245. DOI: <https://doi.org/10.1093/genetics/144.3.1237>
- Pritchard, J. K., M. Stephens y P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155(2): 945-959. DOI: <https://doi.org/10.1093/genetics/155.2.945>
- Reyes-Guzmán, N., C. Siebe, M. O. Chevrel, M.-N. Guilbaud, S. Salinas y P. Layer. 2018. Geology and radiometric dating of Quaternary monogenetic volcanism in the western Zacapu lacustrine basin (Michoacán, México): implications for archeology and future hazard evaluations. *Bulletin of Volcanology* 80(2): 18. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00445-018-1193-5>
- Santillán-Mendoza, R., S. P. Fernández-Pavía, K. O'Donnell, R. C. Ploetz, R. Ortega-Arreola, G. Vázquez-Marrufo, J. Benítez-Malvido, J. C. Montero-Castro, A. Soto-Plancarte y G. Rodríguez-Alvarado. 2018. A novel disease of big-leaf



- mahogany caused by two *Fusarium* species in Mexico. *Plant Disease* 102(10): 1965-1972. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-18-0060-RE>
- SEMARNAT. 2010. NORMA Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010. Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-Lista de especies en riesgo. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Diario Oficial de la Federación. Cd. Mx., México. http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5173091&fecha=30/12/2010 (consultado junio de 2022).
- Setsuko, S., K. Ishida, S. Ueno, Y. Tsumura y N. Tomaru. 2007. Population differentiation and gene flow within a metapopulation of a threatened tree, *Magnolia stellata* (Magnoliaceae). *American Journal of Botany* 94(1): 128-136. DOI: <https://doi.org/10.3732/ajb.94.1.128>
- Shannon, C. E. 1948. A mathematical theory of communication. *The Bell System Technical Journal* 27(3): 379-423. DOI: <https://doi.org/10.1002/j.1538-7305.1948.tb01338.x>
- Silva, C. A., M. F. Vieira, R. M. D. Carvalho-Okano y L. O. D. Oliveira. 2014. Reproductive success and genetic diversity of *Psychotria hastisepala* (Rubiaceae), in fragmented Atlantic forest, Southeastern Brazil. *Revista de Biología Tropical* 62(1): 369-380.
- Smith, M. E. 2005. City Size in Late Postclassic Mesoamerica. *Journal of Urban History* 31(4): 403-434. DOI: <https://doi.org/10.1177/0096144204274396>
- Stephens, M., N. J. Smith y P. Donnelly. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *The American Journal of Human Genetics* 68(4): 978-989. DOI: <https://doi.org/10.1086/319501>
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123(3): 585-595. DOI: <https://doi.org/10.1093/genetics/123.3.585>
- Van Zandt, P. A., D. D. Johnson, C. Hartley, K. A. LeCroy, H. W. Shew, B. T. Davis y M. S. Lehnert. 2020. Which moths might be pollinators? Approaches in the search for the flower-visiting needles in the Lepidopteran haystack. *Ecological Entomology* 45(1): 13-25. DOI: <https://doi.org/10.1111/een.12782>
- Woerner, A. E., M. P. Cox y M. F. Hammer. 2007. Recombination-filtered genomic datasets by information maximization. *Bioinformatics* 23(14): 1851-1853. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm253>
- Wolfe, A. D. 2005. ISSR techniques for evolutionary biology. *Methods in Enzymology* 395: 134-144. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)95009-X](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)95009-X)
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15(1): 323-354. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-1809.1949.tb02451.x>
- Yeh, F. C., R. C. Yang, T. Boyle, Z. H. Ye y J. X. Mao. 1999. POPGENE, version 1.32. The User Friendly Software for Population Genetic Analysis. *Molecular Biology and Biotechnology Centre*, University of Alberta. Edmonton, Canada.
- Young, A. G., T. Boyle y T. Brown. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology & Evolution* 11(10): 413-418. DOI: [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10045-8](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10045-8)