



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN BIOCIENCIAS



Tesis

Que para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

Presenta:

Humberto Adrián Hernández Urban

**Sistemática y filogenia del género *Calatola* Standl. (Metteniusaceae
Schnizlein) para México**

Directores de tesis

Dr. Emilio Estrada-Ruiz

Laboratorio de Ecología, Departamento de Zoología, ENCB-IPN

Dr. Rodrigo Duno de Stefano

Herbario CICY, Unidad de Recursos Naturales Centro de Investigación Científica
de Yucatán, A.C. (CICY)



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 13:00 horas del día 05 del mes de junio del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas para examinar la tesis titulada:

Sistemática y filogenia del género *Calatola* Standl. (Metteniusaceae H. Karst. ex Schnizl) para México

Presentada por el alumno:

Hernández
Apellido paterno

Urbán
Apellido materno

Humberto Adrián
Nombre(s)

Con registro:

B	1	5	0	2	3	4
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Biociencias

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Emilio Estrada Ruiz

Dr. Rodrigo Stefano Duno

Dr. Carlos Fabián Vargas Mendoza

Dr. Héctor Omar Mejía Guerrero

M. en C. María Patricia Vera Caletti

PRESIDENTE DEL COLEGIO

Dr. Gerardo Aparicio Ozores



S.E.P.
Escuela Nacional de
Ciencias Biológicas
Sección de Estudios
de Posgrado
e Investigación



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
COORDINACION GENERAL DE POSTRADO E INVESTIGACION

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 7 del mes septiembre del año 2017, el que suscribe **Humberto Adrián Hernández Urban** alumno del Programa de **Maestría en Biociencias** con número de registro **B150234**, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dr. Emilio Estrada Ruiz** y **Dr. Rodrigo Stefano Duno** y cede los derechos del trabajo intitulado “**Sistemática y filogenia del género *Calatola* Standl. (Metteniusaceae H. Karst. Ex Schnizl) para México**”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: **hernandez_urban2010@yahoo.com.mx**, **emilkgrama@yahoo.com** y **roduno@cicy.mx**. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Biol. Humberto Adrián Hernández Urban

Dr. Emilio Estrada Ruiz
Director de tesis

Dr. Rodrigo Stefano Duno
Director de tesis

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo de investigación se realizó bajo la dirección del Dr. Emilio Estrada Ruiz, en el Laboratorio de Zoología, en la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, del Instituto Politécnico Nacional y del Dr. Rodrigo Duno de Stefano del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), Mérida, Yucatán.

Este trabajo fue apoyado por la beca de maestría del CONACYT (741215/596953) otorgado a Humberto Adrián Hernández Urban y por los proyectos de investigación del CONACYT (240241) y SIP-IPN 20161352 y 20170872 del Dr. Emilio Estrada Ruiz.

Agradezco y expreso el merecido reconocimiento al comité tutorial y jurado revisor: Dr. Emilio Estrada Ruiz, Dr. Rodrigo Duno de Stefano, Dr. Carlos Fabián Vargas Mendoza, Dr. Héctor Omar Mejía Guerrero y M. en C. Ma. Patricia Vera Caletti, por su esfuerzo conjunto que significó invaluable revisiones, críticas y observaciones a este trabajo.

Agradecimientos

Agradezco a *CONACYT* por el apoyo económico brindado para la elaboración de esta investigación.

Agradezco al *Instituto Politécnico Nacional* por permitirme ser parte de esta magnífica institución.

Agradezco al *Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC*, por el apoyo facilitado durante mi estancia.

Quiero agradecer a mi director de tesis, el *Dr. Emilio Estrada Ruíz* por sus conocimientos, tiempo y paciencia que me brindo para llevar a cabo esta investigación.

Agradezco a mi codirector de tesis, el *Dr. Rodrigo Duno de Stefano* por el apoyo, revisión y contribución al trabajo final.

Asimismo agradezco al *Dr. Héctor Omar Mejía Guerrero*, *Dr. Carlos Fabian Vargas Mendoza* y *M. en C. María Patricia Vera Caletti*, por el apoyo, tiempo y contribuciones en la revisión del trabajo final.

De manera especial quiero agradecer a las personas que me apoyaron en campo para obtener las recolectas que hicieron posible la obtención de datos para esta investigación, que son: *Técnico Forestal Ramiro* por el apoyo y búsqueda de la zona Amixtlán, Puebla., al *Dr. Ramón Cuevas Guzmán* por las facilidades para entrar a la reserva de la biosfera Sierra de Manantlán, Jalisco., a la *Bióloga Rosamond*

Coates Lutes y al *M. en C. Delfino Álvaro Campos Villanueva* por facilitarme la estancia en la Estación Biológica de “Los Tuxtlas”, Veracruz, a los Sres. *Julián Pérez Bravo* y *Jaime Pérez Pérez* por el acompañamiento y estancia en cerro Boquerón, Motozintla, Chiapas.

Agradezco a la *Bióloga Lilia Lorena Can Itzá del CICY*, por sus enseñanzas y colaboración en el laboratorio para la obtención de resultados.

De manera permanente agradezco a mis padres *Mauro Humberto Hernández Osorno* y *Rita Isabel Urban Cruz* por brindarme todo su apoyo y comprensión.

Índice

Lista de figuras.	III
Lista de tablas.	IV
Resumen.	VI
Abstract.	VIII
Introducción.	1
Marco teórico.	2
Caracteres generales.	4
Regiones ADN cloroplásticos incluidas en el presente trabajo (<i>matK</i> y <i>ndhF</i>).	6
Posición sistemática.	10
Justificación.	14
Preguntas de trabajo (hipótesis).	15
Objetivo general.	15
Objetivos específicos.	15
Materiales y Métodos.	16
Herbario y salida de campo.	16
Selección del grupo externo e interno.	21
Codificación de caracteres.	21
Extracción y cuantificación de ADN.	21
Obtención y edición de las secuencias de ADN.	26
Ensamble, edición y alineación de secuencias.	30
Prueba de congruencia.	30
Análisis filogenético.	30

Resultados.	32
Revisión de herbarios y recolecta en campo.	32
Análisis filogenético.	32
Parsimonia (morfología).	32
Parsimonia (molecular).	36
Análisis Bayesianos.	42
Clave dicotómica.	46
Discusión.	54
Conclusiones.	66
Prospectivas.	66
Literatura.	68
Anexo 1.	78
Anexo 2.	87
Anexo 3.	Digital

Lista de figuras

Figura 1. Distribución del género <i>Calatola</i> en México.	2
Figura 2: Diagrama del genoma del cloroplasto que ilustra la ubicación de las regiones de los genes codificantes	8
Figura 3. Clasificación filogenética de la clase Lamiidae.	14
Figura 4. Árbol más parsimonioso reconstruido a través del método de parsimonia de las especies del género <i>Calatola</i> con base en caracteres morfológicos.	35

Figura 5. Árbol de consenso de la mayoría (50%) reconstruido a través del método de parsimonia de especies del género <i>Calatola</i> con base en las secuencias de la región <i>matK</i>	37
Figura 6. Árbol de consenso de la mayoría (50%) reconstruido a través del método de parsimonia de especies del género <i>Calatola</i> con base en las secuencias de la región <i>ndhF</i>	38
Figura 7. Árbol único reconstruido a través del método de parsimonia de especies del género <i>Calatola</i> con base en las secuencias de la región <i>ndhF-matK</i>	40
Figura 8. Árbol único reconstruido a través del método de parsimonia de especies del género <i>Calatola</i> con base en morfología + <i>ndhF-matK</i>	41
Figura 9 Árbol consenso reconstruido a través del método bayesianos, en especies del género <i>Calatola</i> con base en las secuencias de la región <i>matK</i>	43
Figura 10 Árbol consenso reconstruido a través de bayesianos, en especies del género <i>Calatola</i> con base en las secuencias de la región <i>ndhF</i>	44
Figura 11 Árbol consenso reconstruido a través de bayesianos, en especies del género <i>Calatola</i> con base en las secuencias de la región <i>matK-ndhF</i>	45

Lista de tablas:

Tabla 1. Lista con nombres aceptados y sinonimias del género <i>Calatola</i> Standl. ...	3
Tabla. 2: Herbarios y acrónimos de las instituciones donde se revisaron los ejemplares.	17
Tabla 3. Fechas de las salidas al campo para la recolecta de las especies de <i>Calatola</i>	17

Tabla. 4: Sitios de recolecta de las especies del género <i>Calatola</i>	18
Tabla 5. Taxa, número de <i>GenBank</i> y modelos de evolución nucleotídica seleccionados para los distintos loci utilizado en los análisis de resolución del grupo hermano de <i>Calatola</i>	22
Tabla. 6.- Lista de los caracteres a utilizar en la matriz de datos morfológicos.	23
Tabal.7: Matriz de datos codificados del género <i>Calatola</i>	26
Tabla 8. Perfil del termociclador y condiciones de PCR para cada región a evaluar.	29
Tabla 9.- Número de ejemplares recolectados e identificados.	34
Tabla 10: Resumen de estadísticos asociados a los análisis de parsimonia basados en morfología, <i>ndhF</i> , <i>matK</i> y combinados.	34
Tabla 11: caracteres y estados de carácter para las familias Icacinaceae y Metteniusaceae.	46
Tabla 12.-Diferencias entre las especies de <i>Calatola</i>	50

RESUMEN

Calatola actualmente asignada a la familia Metteniusaceae, es un género neotropical con un total de cinco especies reconocidas; en México se encuentran cuatro especies: *C. mollis*, *C. laevigata*, *C. costaricensis* y *C. uxpanapensis*. Crecen generalmente en bosques lluviosos, desde bajas elevaciones hasta 2000 msnm. El género se caracteriza por ser árboles dioicos que superan los 30 m de altura, hojas simples, alternas; corteza escamosa, brecha tornándose a un color azul en pocos minutos o unas horas; frutos globosos a elipsoidales, glabros a seríceo-pilosos; endocarpo leñoso, con 2 costillas laterales prominentes y otras secundarias o simples protuberancias. Debido a la condición dioica de las especies, identificaciones erróneas y falta de ejemplares en los herbarios que reflejen la variación morfológica, se ha dificultado la obtención de material adecuado para los análisis moleculares y morfológicos. El objetivo del trabajo fue investigar las relaciones filogenéticas interespecíficas de *Calatola*, con base en caracteres moleculares (*matK*, *NdhF*) y morfológicos. Se revisaron muestras herborizadas de nueve herbarios nacionales, además, se recolectaron ejemplares en Jalisco, Puebla, Veracruz y Chiapas para la obtención de los caracteres morfológicos, anatómicos y para la extracción de ADN. Se realizó el análisis filogenético con 18 taxa, utilizando 36 caracteres morfológicos y las secuencias parciales de los genes *matK* y *ndhF* del cloroplasto, por métodos de parsimonia y bayesianos, ambos análisis permitieron recuperar al género *Calatola* como monofilético. En el análisis por parsimonia total, se obtuvo un árbol único que muestra la formación de dos clados. En el análisis bayesiano con los marcadores concatenados se observa la

formación de cuatro grupos, por separado se observa una mejor discriminación de las especies, en este caso, con el marcador *matK*. En cada uno de los análisis se obtiene una resolución baja dentro del complejo *Calatola*. Se sugiere el uso de marcadores nucleares como ITS o ETS que pueda incrementar la resolución de los análisis a nivel de especies.

Abstract

Calatola currently assigned to the Metteniusaceae family, is a Neotropical genus with a total of five recognized species; In Mexico there are four species: *C. mollis*, *C. laevigata*, *C. costaricensis* and *C. uxpanapensis*. They usually grow in rainforest, from low elevations up to 2000 m. The genus is characterized by dioic trees that exceed 30 meters in height, simple, alternate leaves; Scaly bark, gap becoming blue in a few minutes or a few hours; Fruits globose to ellipsoidal, glabrous to sericeo-hairy; Endocarp woody, with 2 prominent lateral ribs and other secondary or simple protuberances. Due to the dioecious condition of the species, erroneous identifications and lack of specimens in the herbaria that reflect the morphological variation, it has been difficult to obtain suitable material for molecular and morphological analyzes. The objective of this work was to investigate the interspecific phylogenetic relationships of *Calatola*, based on molecular (*matK*, *NdhF*) and morphological characters. Herbaric samples from nine national herbariums were reviewed. In addition, specimens were collected in Jalisco, Puebla, Veracruz and Chiapas to obtain morphological, anatomical and DNA extraction data. Phylogenetic analysis was carried out with 18 taxa, using 36 morphological characters and partial sequences of the *matK* and *ndhF* genes of the chloroplast, by parsimony and bayesian methods, both analyzes allowed to recover the genus *Calatola* as monophyletic. In the analysis by total parsimony, a single tree was obtained showing the formation of two clades. In the Bayesian analysis with the concatenated markers we observed the formation of four groups, separately we observed a better discrimination of the species, in this case, with the *matK* marker.

In each of the analyzes a low resolution is obtained within the *Calatola* complex. The use of nuclear markers such as STIs or STDs is suggested, which may increase the resolution of the analysis at the species level.

Introducción

Calatola Standl. (1926) es un género con cinco especies, que se encuentra hoy día dentro de la familia Metteniusaceae (Stull *et al.*, 2015); se distribuye en México, Centroamérica y la región norte de Suramérica, principalmente en la regiones andinas de Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Brasil y Bolivia (Figura 1; Vera-Caletti y Wendt, 2001). Se presenta generalmente en bosques lluviosos que van desde bajas elevaciones hasta 2000 metros de altitud. Se le encuentra en bosques tropicales perennifolios, caducifolios y mesófilos de montaña. El género se caracteriza morfológicamente entre otras cosas por su hábito arbóreo de hasta 35 m de altura, dioicos, corteza escamosa, brecha tornándose de un color azul en pocos minutos o unas horas, con hojas simples y alternas, membranáceas a subcoriáceas; inflorescencias masculinas espigas colgantes, flores tetrámeras; frutos globosos, obovoides o elipsoidales, generalmente glabros, rara vez densamente seríceo-pilosos; endocarpo duro o leñoso, con 2 costillas prominentes y otras secundarias o con simples protuberancias, rara vez liso.

Entre los usos encontrados en México existen los siguientes: *Calatola mollis* se ha empleado como planta medicinal, alivia malestares del riñón, remedio contra parásitos intestinales (Martínez, 1939; Cano *et al.*, 1997), además, la semilla se emplea para la elaboración de artesanías (Vera-Caletti, 1999). En el caso de *C. costaricensis* se usa para teñir telas y su fruto tostado es usado para el consumo humano (Vera-Caletti, 1999).

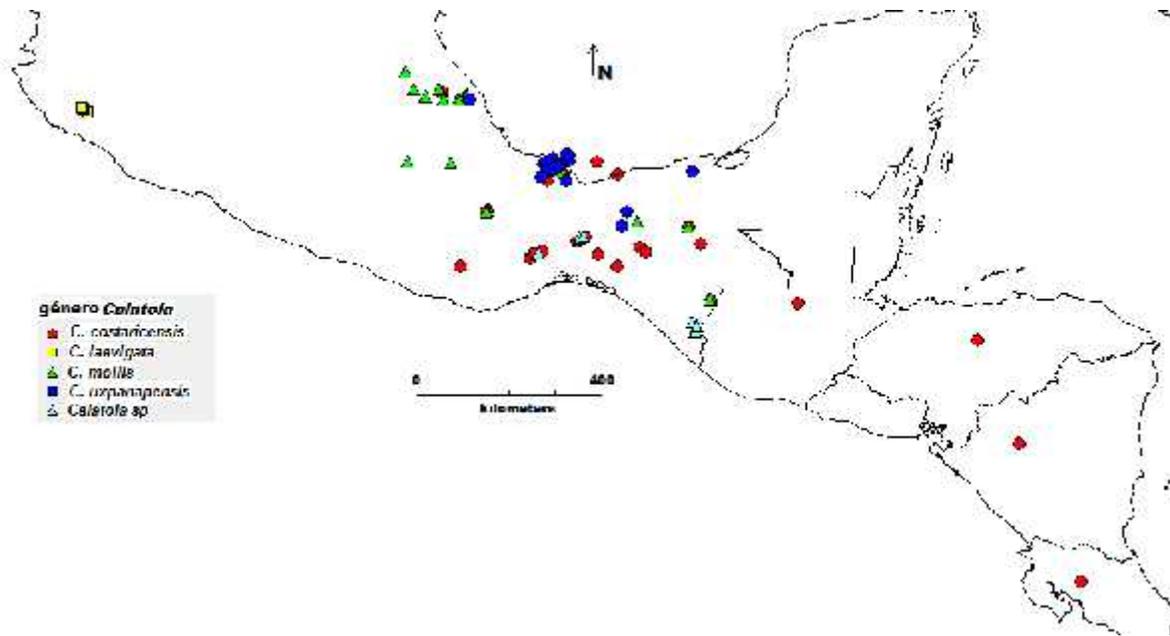


Figura 1: Distribución del género *Calatola* en México.

A pesar de los estudios realizados sobre la taxonomía de las especies, aún quedan vacíos por resolver, ya que la separación de las especies se dificulta por la condición dioica de las plantas y el escaso conocimiento de la variación en caracteres morfológicos diagnosticables.

Actualmente el uso de caracteres moleculares es una herramienta de apoyo la cual podría contribuir en la delimitación de las especies o asignación de especímenes a especies particulares (Hollingsworth *et al.*, 2011).

Marco teórico (*Calatola* y la familia Metteniusaceae)

La familia Metteniusaceae contiene 11 géneros con 139 especies, incluye árboles y arbustos de distribución pantropical, principalmente en los continentes americano,

africano y asiático (Stull *et al.*, 2015). Uno de los géneros de esta familia es *Calatola* que consta de cinco especies (tabla 1) y junto con *Platea* conforman la subfamilia Plateoideae (Stull *et al.*, 2015).

Respecto a la distribución del género *Calatola* en México, se presenta de acuerdo a las provincias biogeográficas (Morrone, 2001) de: Chiapas, Golfo de México, Sierra Madre Oriental, Sierra Madre del Sur y Sierra Madre Occidental. Se le encuentra en bosques mesófilos, que van desde bajas elevaciones hasta 2000 metros sobre nivel del mar (msnm). A pesar que *Calatola* cuenta con cuatro especies en México, ha sido poco estudiada (Vera-Caletti 1999).

Tabla 1: Lista con nombres aceptados y sinonimias del género *Calatola* Standl.

Nombres aceptados.	Sinónimos.
<i>Calatola costaricensis</i> Standl. 1926	<i>Calatola columbiana</i> Sleumer 1940. <i>Calatola pastazana</i> Sleumer 1940. <i>Calatola sanquininensis</i> Cuatrec. 1949. <i>Calatola venezolana</i> Pittier 1938.
<i>Calatola laevigata</i> Standl. 1923	
<i>Calatola mollis</i> Standl. 1823.	
<i>Calatola uxpanapensis</i> Vera-Caletti & T. Wendt 2001	
<i>Calatola microcarpa</i> A.H. Gentry ex R. Duno & Janovec. 2013.	

Caracteres generales.

Sobre la identificación de las especies del género, se considera difícil por varias razones, en especial la condición dioica y flores femeninas pequeñas. En México se reconocen cuatro especies: *C. costaricensis*, *C. mollis*, *C. uxpanapensis* y *C. laevigata* (Standley, 1923; Standley y Steyermark, 1949; Vera-Caletti, 1999). Publicaciones como las de Vera-Caletti (1999), Vera-Caletti y Wendt (2001) y Hernández-Urban (2013) incrementaron el conocimiento del grupo, aumentando el número de caracteres para la identificación de las especies.

Calatola posee gran variación morfológica, por ejemplo: *C. mollis* y *C. costaricensis*: destacan por presentar hojas grandes y espigas alargadas, sin embargo, las hojas de *C. mollis* son tomentosas, mientras que las de *C. costaricensis* son glabrescentes, conservando la pubescencia entre los nervios axilares. Por otro lado, *C. uxpanapensis* y *C. laevigata*, se diferencian por el endocarpo ya que *C. uxpanapensis* presenta crestas ecuatoriales y costillas gruesas, *C. laevigata* presenta la cresta ecuatorial inconspicua y la superficie general es reticulada o casi lisa.

Se ha observado que los granos de polen son esferoidales, tricolpados, con téctum foveolado-reticulado con muro delgado a grueso, lisos o con protuberancias, ligeramente granuloso o sólo con algunos gránulos dispersos, lúmenes de estrechos a amplios, homogéneo con una forma constante elíptica o de formas diversas y por ello no homogéneos; los colpi son cortos y estrechos con márgenes lisos, reticulados o dentados (Vera-Caletti, 1999).

Los estudios de cariotipo de las especies del género presentan una uniformidad en el número cromosómico de $n=14$ (Vera-Caletti, 1999).

Calatola costaricensis crece en altitudes que van de 2000 a 2200 msnm, en suelos profundos café oscuro, arenosos, calizos, negros arcillosos y pedregosos en bosques tropicales perennifolios, bosques mesófilos de montaña y bosques tropicales caducifolios en los estados Chiapas, Oaxaca y Veracruz, florece de enero a abril y fructifica de enero a noviembre, aunque probablemente su periodo de floración inicia en julio y termina en enero, lo que indicaría que posiblemente florece todo el año (Duno, 2011). Los caracteres que permiten reconocer a esta especie son: láminas de las hojas de 11-30 cm de largo, elípticas a oblongo-elípticas; el envés con poca pubescencia en las axilas de las venas laterales, generalmente muy conspicuos; espigas estaminadas de 9-23 cm de largo. (Vera-Caletti; 1999, Hernández-Urban; 2013)

Calatola laevigata se le encuentra en altitudes que van de 900 a 1900 msnm en sitios con afloramientos rocosos en bosque tropical caducifolio (Oaxaca) y bosque mesófilo de montaña (Chiapas y Jalisco). Actualmente su hábitat está muy alterado y la especie se encuentra en cafetales y las poblaciones naturales son muy reducidas lo que hace difícil su localización. En Chiapas, sólo se cuenta con datos de floración en diciembre. Los caracteres que permiten definir a esta especie son: endocarpo sin crestas ni costillas; hojas de 10-21 cm de largo, elípticas a ovado-elípticas, glabras; espigas estaminadas de 2-6 cm de largo y frutos de 2.1-3.5 cm de largo (Vera-Caletti; 1999, Hernández-Urban; 2013).

Calatola mollis, crece en altitudes que van de 500 a 1700 msnm, en suelos negros arcillosos y pedregosos en bosques tropicales perennifolios y bosques mesófilos de montaña en los estados de Chiapas, Puebla, Oaxaca y Veracruz, florece de enero a abril y fructifica de agosto a octubre, aunque probablemente desde enero se encuentren frutos. Los caracteres que permiten definir a esta especie son: fruto y envés de las hojas densamente tomentoso-amarillento (Vera-Caletti; 1999, Hernández-Urban; 2013).

Calatola uxpanapensis, crece en altitudes que van de 100 a 900 msnm, se encuentra acompañado de representantes de los géneros *Brosimum*, *Dialium*, *Ficus*, *Lonchocarpus* y *Sloanea* entre otros, en suelos profundos, arcillosos, en zonas kársticas (Vera-Caletti y Wendt, 2001), bosques tropicales perennifolios y caducifolio en los estados de Puebla y Veracruz, florece de febrero a mayo y fructifica de agosto a febrero. Los caracteres que permiten definir a esta especie son: láminas de las hojas de 10.5-30 cm de largo; fruto de 4-7.8 cm de largo, endocarpo elíptico, crestas redondeadas (Vera-Caletti; 1999, Hernández-Urban; 2013).

Regiones ADN cloroplásticos incluidas en el presente trabajo (*matK* y *ndhF*)

Estudios filogenéticos en plantas se basan generalmente en el ADN del cloroplasto (cpDNA) y del núcleo, con preferencia del primero. El cpDNA es más pequeño en comparación con el genoma nuclear (nDNA). Se admite que el cpDNA, está altamente conservado en términos de sustitución de nucleótidos con muy pocos reordenamientos, lo que permite que las moléculas puedan ser utilizadas en la resolución de las relaciones filogenéticas, a diferentes niveles evolutivos. Sin

embargo, la selección de la longitud de un gen y la tasa de sustitución adecuada es crucial en la determinación de las relaciones filogenéticas. Actualmente se utilizan los genes *rbcL*, *ndhF*, *rpl16*, *matK*, *atpB* (Soltis y Soltis, 1998; Patwardhan *et al.*, 2014) entre otros.

El cpDNA de las plantas es un único cromosoma circular que se caracteriza estructuralmente por la presencia de una duplicación invertida (IR), que divide al cromosoma en una región de copia única pequeña (SSC) y una grande (LSC) (Figura 3). Las ventajas del genoma del cloroplasto para la reconstrucción filogenética consisten en el hecho de ser pequeño, entre 120 y 200 kilobases (kb), lo que facilita su uso en los análisis de sitios de restricción. La mayoría de los genes en el genoma del cloroplasto son esencialmente de una sola copia. En contraste, la mayoría de los genes nucleares son miembros de familias de genes múltiples, que pueden comprometer la utilidad filogenética de estos genes. El genoma del cloroplasto es estructuralmente conservado y evoluciona con bastante lentitud en el nivel de secuencia de nucleótidos. Sin embargo, como es evidente a continuación, diferentes porciones del genoma del cloroplasto evolucionan a ritmos diferentes. Como resultado, existe una amplia gama de posibilidades para resolver relaciones usando datos del genoma cloroplástico, a nivel de especie, género, familia hasta niveles más altos (Soltis y Soltis, 1998).

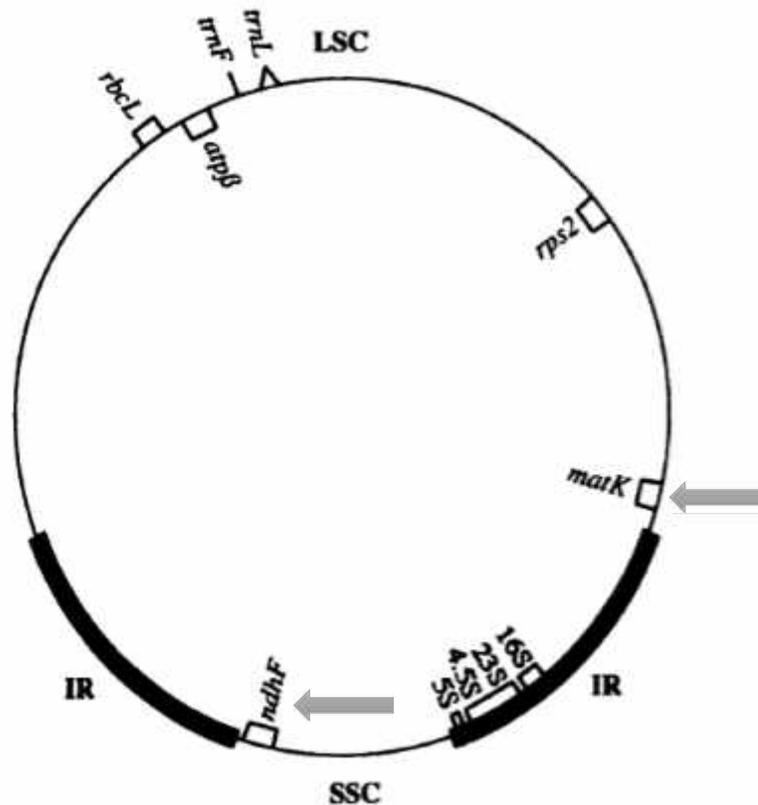


Figura 2: Diagrama del genoma del cloroplasto que ilustra la ubicación de las regiones del cloroplasto. IR = repetición invertida; SSC = pequeña región de una sola copia; LSC = gran región de una sola copia (tomado de Soltis y Soltis, 1998).

MatK: El gen *matK* (maturasa) es de aproximadamente de 1535 pares de bases (pb) (Yu *et al.*, 2011), se encuentra en el intrón del gen del cloroplasto *trnK* (lisina tRNA), y codifica una maturasa involucrada en el tipo de empalme II intrones de transcritos de ARN. Estudios recientes han demostrado la utilidad de este gen en la resolución de las relaciones evolutivas entre plantas de todos los niveles taxonómicos: angiospermas (Hilu *et al.*, 2003), familia Zingiberaceae (Selvaraj *et al.*, 2008) y género *Scaphosepalum* (Endara *et al.*, 2011). El gen *matK* tiene tasas relativamente altas de sustitución en comparación con otros genes utilizados en la

sistemática de plantas, posee una alta proporción de mutaciones de transversión y la sección 3 de su región de codificación ha demostrado ser muy útil para construir filogenias a nivel subfamilia. Las secuencias de las regiones no codificantes del genoma del cloroplasto se utilizan a menudo en la sistemática debido a que tales regiones tienden a evolucionar de forma relativamente rápida (Soltis y Soltis, 1998; Patwardhan *et al.*, 2014). El gen *matK* es una de las regiones codificantes del cloroplasto con mayor tasa evolutiva y por lo tanto muestra buenos niveles de discriminación entre especies; sin embargo, la universalidad de los *primers* tiene resultados variables entre diferentes grupos de plantas, mostrando éxito en algunos e irregularidades en otros. En busca de satisfacer esta necesidad, Yu *et al.* (2011) determinaron la región de *matK* que mejor representa al gen y diseñaron los *primers* *matK* 472f / *matK* 1248R, en regiones adyacentes que fueran las más conservadas. La universalidad de estos *primers* fue evaluada con muestras de 33 ordenes (Yu *et al.*, 2011; Cadavid, 2013).

NdhF: Este gen codifica para la subunidad F de NADP deshidrogenasa y es de aproximadamente 1100 pb de longitud. Givnish *et al.* (2005) usaron el gen *ndhF* para reconstruir relaciones a través de 282 taxones, que representaron a 78 familias de monocotiledóneas. Por otra parte, demostraron que las relaciones dentro de los ordenes son consistentes con aquellos basados en *rbcL*, solo o en combinación con *atpB* y 18S rDNA, mientras *ndhF* contribuye con más del doble de los caracteres informativos de *rbcL* y casi tantos como *rbcL atpB*, y 18S rDNA combinado (Patwardhan *et al.*, 2014). Kim y Jansen (1995) compararon las secuencias del gene

cloroplastico *ndhF* de los principales clados de la familia más grande de plantas con flores (Asteraceae) y encontraron que este gen proporciona 3 veces más información filogenética que el *rbcL*. Esto se debe a que es sustancialmente más largo y evoluciona dos veces más rápido. La región 5'(1380 pb) de *ndhF* es muy diferente de la región 3' (855 bp) y es similar a *rbcL* en tanto la tasa como el patrón de cambio de secuencia (Soltis y Soltis, 1998; Patwardhan *et al.*, 2014).

Posición sistemática

Engler (1893) reconoce cuatro tribus: Icacinaea, Iodeae, Sarcostigmatae y Phytocreneae. Paul C. Standley (1923) describe por primera vez al género *Calatola*, ubicándola dentro de la familia Icacinaceae (Standley, 1923). Sleumer (1969) reconoce esencialmente las mismas circunscripciones y amplía la familia a 58 géneros. Solamente la tribu Icacineae incluye géneros americanos, en los que se encuentra *Calatola*. De acuerdo a Sleumer (1969), esta tribu difiere de las demás por ser, en su mayoría, árboles y arbustos con flores hermafroditas y embriones pequeños, las otras tres tribus comprenden plantas escandentes con flores frecuentemente dioicas y embriones grandes.

Sleumer (1969), al igual que Engler (1896), señalan diferencias anatómicas importantes entre las subfamilias, *Calatola* al ser dioico aparenta combinar características de al menos dos tribus; sin embargo, los detalles de la anatomía de sus nudos y de la madera lo ubican claramente en la tribu *Icacineae* (Bailey y Howard, 1941a, b, c, d; Kärehed, 2001). Posteriormente, Reveal (1993), Takhtajan

(1997) eligieron a Icacinaceae como la familia tipo para el orden Icacinales. Este orden incluyó a Icacinaceae y Aquifoliaceae junto con Phellinaceae y Sphenostemonaceae, los cuales fueron incluidos en el superorden Celastranae. Savolainen *et al.* (1994) usando datos moleculares sugiere que los Celastrales son un grupo polifilético y pueden ser divididos en dos principales clados. El primer clado incluye a *Icacina* (Icacinaceae), Aquifoliaceae y *Camellia* (Theaceae), y el segundo clado incluye a *Euonymus* (Celastraceae), *Hippocratea* y *Salacia* (Hippocrateaceae).

El Grupo de Sistemática Filogenética de las Angiospermas (siglas en inglés APG, Angiosperm Phylogeny Group), basado en datos moleculares incluye a la familia en el complejo Rosidae (APG, 1998). Kårehed (2001) realizó un estudio empleando datos morfológicos (70 caracteres) y moleculares (cloroplastos: *ndhF*, *rbcl*, *atpB*, y núcleo: 18S rDNA) de un total de 54 géneros tradicionales considerados miembros de la familia Icacinaceae, caracterizados principalmente por la presencia de un ovario supero, unilocular con dos óvulos colgantes, de los cuales sólo madura uno. El autor encontró que la familia es polifilética, transfiriendo 18 géneros a las familias Cardiopteridaceae, Stemonuraceae (Aquifoliales) y Pennantiaceae (Apiales). Los 34 géneros restantes se retuvieron provisionalmente en el clado Icacinaceae *sensu stricto*, éstos comprendidos en cuatro clados, denominados grupos *Apodytes*, *Cassinopsis*, *Emmotum* e *Icacina*, los análisis colocaron provisionalmente a *Calatola* en el grupo *Emmotum*, por sus similitudes en anteras latrorsas (filamento unido a la antera por su cara interior) y extrorsas (filamento unido a la antera por su

cara exterior). Hasta esa fecha, la familia quedo conformada por 36 géneros y 195 especies pero con dudas sobre la inclusión de varios géneros (Kärehed, 2001).

Byng *et al.* (2014) con base en datos moleculares (*matK*, *ndhF* y *rbcl*) evaluaron la monofilía de 32 géneros de la familia Icacinaceae segregando a los géneros en siete clados: *Icacina* (22 géneros), *Cassinopsis* (un género), *Oncothecaceae* (un género), *Apodytes* (tres géneros), *Emmotum* (cuatro géneros), *Metteniusaceae* (un género) y *Platea* (dos géneros). En el grupo *Platea*, se colocaron los géneros *Platea* y *Calatola*. Los géneros comparten varias apomorfías, incluyendo estigmas cortos inconspicuos aparentemente sésiles y laciniados, endocarpo drupáceo reticulado y surcos longitudinales (Kärehed, 2001; Byng *et al.* 2014). Sin embargo, estos estudios aún no pudieron aclarar la circunscripción de la familia y las relaciones entre el clado Lamiidae (Euastéridas I) (Stull *et al.*, 2015).

Por otro lado, Stull *et al.* (2015) resolvieron la filogenia del clado Lamiidae (Euastéridas I), secuenciando 50 genomas de plastos, incluyendo la circunscripción y la posición filogenética de Icacinaceae. Ellos proponen que el clado Lamiidae (Euastéridas I) posiblemente radió a partir de un ancestro arbóreo tropical con flores pocos visibles y grandes frutos, drupáceas, dado que estos caracteres morfológicos se distribuyen a través de una clasificación de linajes (Icacinaceae, *Oncothecaceae* y *Metteniusaceae*), se caracterizan generalmente por presentar ovario y corola supero, con un desarrollo simpétalo tardío (Stull *et al.*, 2015).

Posteriormente, hay una propuesta de dos nuevos órdenes: Icacinales (Icacinaceae y Oncothecaceae) y Metteniusales (Metteniusaceae) como clados hermanos. La familia Icacinaceae presenta una reducción en el número de géneros, incluyendo exclusivamente al clado Cassinopsis y a la mayoría del clado Icacina adopta el nombre de subfamilia Icacinoideae. Si bien, no hay sinapomorfías morfológicas claras en Icacinaceae, todos los miembros de Icacinoideae poseen nodos uniloculares y placas de perforación simples en sus elementos de vasos (Stull *et al.*, 2015).

La familia Metteniusaceae comprende *Metteniusa* y 10 géneros del clado *Emmotum*, caracterizados por presentar polen colporado fovealado con ornamentación reticulada. También establecen tres nuevos nombres para las subfamilias: Apodytoideae, Metteniusoideae y Plateoideae. Aunque no se aclaran las sinapomorfías morfológicas que las definen. En la subfamilia Plateoideae se encuentran los géneros *Platea* y *Calatola* que incluyen árboles dioicos con inflorescencia indeterminada (figura 2) (Stull *et al.*, 2015).

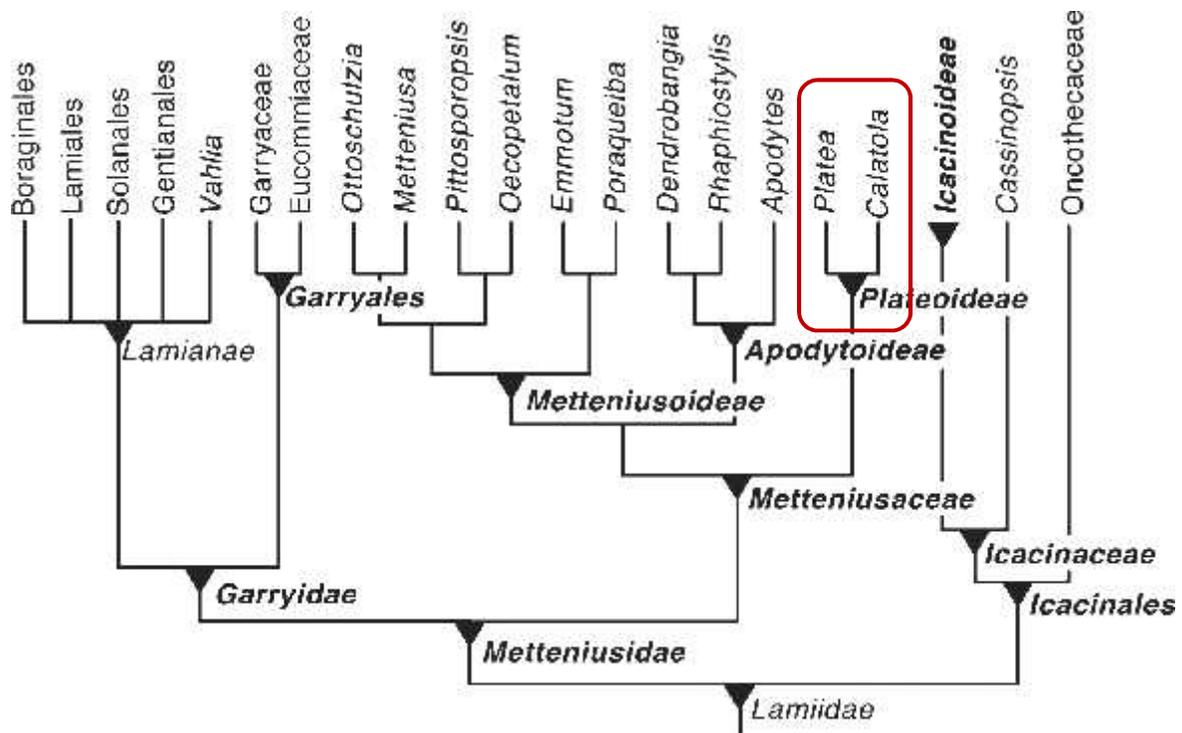


Figura 3: Clasificación filogenética de la clase Lamiales. *Calatola* es el grupo hermano de *Platea* y ambas forman la nueva subfamilia *Plateoideae*, una de las tres subfamilias de *Metteniusaceae* (modificado de Stull *et al.*, 2015).

Justificación

En México se reconocen cuatro especies de *Calatola* de las cinco existentes en toda América: *C. mollis*, *C. laevigata*, *C. uxpanapensis* y *C. costaricensis*. Con base en la revisión de herbario y la literatura taxonómica es evidente que son necesarias nuevas investigaciones en las cuales se incluyan herramientas moleculares (ADN de cloroplasto *matK* y *ndhF*) que aporten información complementaria a los caracteres morfológicos de las especies de *Calatola*. Análisis filogenéticos basados en datos moleculares y morfológicos indican que *Platea* y *Calatola* están

estrechamente relacionados. Sin embargo, aún no se han incluido en análisis filogenéticos a la mayoría de los miembros del género *Calatola*.

Preguntas de trabajo (hipótesis)

Se plantean tres preguntas básicas:

- 1.- ¿Es el género *Calatola* un grupo monofilético?
- 2.- ¿Qué relación existe entre las especies de *Calatola*?
- 3.- Se reconocen para México las cuatro especies propuestas previamente (Vera-Caletti, 1999, Vera-Caletti y Wendt 2001) ¿la riqueza de especies es mayor a la antes propuesta en México?

Objetivo general

Establecer con base en marcadores moleculares de cloroplastos (*matK*, *ndhF*) y morfológicos cuántas y cuáles especies existen en México, además de las relaciones filogenéticas interespecíficas dentro de *Calatola*.

Objetivos específicos

- 1.- Proponer una clasificación filogenética para el género *Calatola* con base en caracteres moleculares y morfológicos.
- 2.- Explicar la posible historia evolutiva del género *Calatola*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Herbario y salidas de campo

Se revisó material herborizado de *Calatola* y de los géneros *Oecopetalum*, *Ottoschulzia* y *Mappia*, depositado en los diferentes herbarios nacionales: CHAPA, CHIP, CICY, ECOSUR, ENCB, HEM, MEXU, MEXU (Ver), ZEA (Tabla 2; acrónimos según Thier, actualización continua), con la finalidad de revisar la mayor cantidad de muestras y reconocer las áreas de distribución. Además, se tomaron las medias de caracteres morfológicos continuos y se revisaron los caracteres de los taxa en cuestión. La información recopilada fue almacenada en una base de datos en Excel (anexo 3 digital).

Las salidas al campo se realizaron en diferentes fechas (Tabla 3). La metodología empleada en campo fue la siguiente: se cortaron 5 ramas de 50 cm de longitud por ejemplar encontrado, posteriormente se colocaron en papel periódico y con cartón corrugado para su separación entre las diferentes muestras, después fueron prensadas para su traslado a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (IPN), donde fueron colocadas en la secadora botánica para su desecación y conservación. Se cortó una hoja (la hoja lo más madura posible y libre de cualquier epifita) de los ejemplares recolectados y se protegió con una bolsa de té, después se guardó en una bolsa de plástico, junto con gel sílice, para mantener libre de humedad el material y poder hacer, posteriormente, la extracción de ADN.

La determinación de los ejemplares recolectados (Tabla 4) y herborizados se realizó mediante dos claves taxonómicas, la primera propuesta por Vera-Caletti (1999) y la

segunda por Hernández-Urban (2013); así como consulta directa con la M en C Vera-Caletti en la Universidad Autónoma Chapingo. Los ejemplares recolectados fueron depositados en los herbarios CICY, ENCB y CHAP.

Tabla 2: Herbarios y acrónimos de las instituciones donde se revisaron los ejemplares.

Colegio de Posgraduados, Estado de México	(CHAPA).
Instituto de Historia Natural y Ecología, Chiapas	(CHIP)
Centro de Investigación Científica de Yucatán "U najil tikin xiw", Yucatán	(CICY).
El Colegio de la Frontera Sur, Chiapas	(ECOSUR)
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Ciudad de México	(ENCB)
Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Chiapas	(HEM)
Instituto de Biología de la UNAM, Ciudad de México	(MEXU)
Estación de biología Los Tuxtla- Instituto de Biología de la UNAM, Veracruz	(MEXU)
Centro Universitario de la Costa Sur, Jalisco	(ZEA)

Tabla 3. Fechas de las salidas al campo para la recolecta de las especies de *Calatola*.

<i>C. mollis</i>	<i>C. laevigata</i>	<i>C. uxpanapensis</i>	<i>C. costaricensis</i>	<i>Calatola</i> sp.
Puebla : Amixtla	Jalisco: Estación Científica la Joyas	Veracruz: Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas,	Veracruz: Ejido Santa Rosa Abata, Catemaco,	Chiapas: Cerro Boquerón Motozintla,
23/01/2016	11/02/2016	2/03/2016 y 22/04/ 2016	22/04/2016	23/05/2016 16/10/2016

Tabla. 4: Sitios de recolecta de las especies del género *Calatola*.

Especie	Coordenadas	Altitud (msnm)	Tipo de vegetación	# de individuos con replicas	Observaciones
<i>C. mollis</i>	20°1'0.17"N, 97°48'54.40"O		Bosque mesófilo de montaña	1	Nombre común Palo azul
<i>C. laevigata</i>	19°38'25.3"N, 104°20'01.8"O	1687	Bosque mesófilo de montaña	1	Nombre común Morado, crece en zonas de transición de bosque pino-encino.
<i>C. laevigata</i>	19°36'30.0"N, 104°18'21.0"O	1907	Bosque mesófilo de montaña	1	Nombre común Morado, crece en zonas de transición de bosque pino-encino.
<i>C. laevigata</i>	19°36'41.9"N, 104°18'34.9"O	1758	Bosque mesófilo de montaña	1	Nombre común Morado, crece en zonas de transición de bosque pino-encino, se encontró en zonas de cañadas.
<i>C. uxpanapensis</i>	18°34'55.7"N, 95°04'35.2"O	222	Selva alta perennifolia	1	
<i>C. uxpanapensis</i>	18°35'9.5"N, 95°04'53.7"O	328	Selva alta perennifolia	1	
<i>C. uxpanapensis</i>	18°35'3.4"N, 95°04'56.7"O	328	Selva alta perennifolia	1	
<i>C. uxpanapensis</i>	18°35'6.2"N, 95°04'53.7"O	322	Selva alta perennifolia	1	
<i>C. uxpanapensis</i>	18°34'55.2"N, 95°04'54.7"O	393	Selva alta perennifolia	1	

Continuación de la tabla 4

<i>C. costaricensis</i>	18°31'21.5"N, 95°09'19.9"O	1131	Bosque mesófilo de montaña	1	Flores (espigas)
<i>C. costaricensis</i>	18°31'32.0"N, 95°09'20.1"O	1069	Bosque mesófilo de montaña	1	Flores (espigas)
<i>C. costaricensis</i>	18°31'35.6"N, 95°09'21.0"O	1124	Bosque mesófilo de montaña	1	Flores (espigas)
<i>C. costaricensis</i>	18°31'39.7"N, 95°09'20.4"O	1131	Bosque mesófilo de montaña	1	Árboles con flores son de menor tamaño, en apariencia son más robustos en el tallo, hojas de mayor tamaño, mientras los de flores alcanzan mayor altura. con diámetros estrechos y hojas de menor tamaño
<i>Calatola sp.</i>	15°13'59.4"N, 92°18'23.9"O	2335	Bosque mesófilo	1	Individuo joven de tres metros de altura con 4 de dap. Las hojas presentan margen aserrado. A 5 m de distancia se encuentra un individuo que presenta una altura de 22 metros de altura con 50 dap
<i>Calatola sp.</i>	15°14'0.7"N, 92°18'16.7"O	2335	Bosque mesófilo	1	Individuo 12 metros de altura aprox. con 10 de dap. margen aserrado
<i>Calatola sp.</i>	15°14'10.7"N, 92°18'6.2"O	2335	Bosque mesófilo	1	Individuo 10 metros de altura aprox con 10 de dap. margen aserrado

Con los datos recopilados de las localidades de cada ejemplar se elaboró el mapa de distribución del género *Calatola*, utilizando el programa de Diva Gis 7.5 (Fig. 1). Para los ejemplares que no cuentan con coordenadas se posicionó un punto de acuerdo con las coordenadas de las localidades reportadas, con ayuda de una base de datos de INEGI

Selección del grupo externo e interno

La selección de los grupos externos se realizó sobre la información del análisis filogenético propuesto por Stull *et al.* (2015), con el fin de polarizar los estados de caracteres plesiomórficos o apomórficos. La selección se realizó de dos maneras uno para los caracteres morfológicos y el otro para los moleculares. Los taxones que se escogieron para el grupo externo fueron los siguientes:

Morfológicos: *Mappia mexicana* y *M. multiflora* como miembros de la familia Icacinaceae, *Oecopetalum mexicanum*, *O. greenmanii* como miembros de la familia Metteniusaceae y *Platea parviflora* como grupo hermano de *Calatola* (Figura 2).

Molecular: *Cassinopsis ilicifolia**, *Icacina senegalensis**, *Mappia mexicanana** y *M. multiflora** como miembros de la familia Icacinaceae; *Ottoschulzia pallida**, *O. rhodoxylon**, *Oecopetalum mexicanum** y *Platea parviflora** (Metteniusaceae), que son taxa estrechamente relacionadas a *Calatola*. Las secuencias para estas especies (*) se obtuvieron de *GenBank* (Tabla 5).

En cuanto al grupo interno, se reconocieron cinco taxa para México (Tabla 5). *Calatola mollis*, *C. costaricensis*, *C. laevigata*, *C. uxpanapensis*, *Calatola sp.* Se adicionó la especie *C. microcarpa* (la cual aparece con el nombre *C. cf. venezolana*), esta última se obtuvo de *GenBank*.

Codificación de caracteres.

Los caracteres morfológicos se clasificaron en: a) caracteres binarios y b) multiestado. Los caracteres continuos fueron transformados en caracteres discretos mediante medidas de agrupación de los valores en rango, posteriormente cada rango fue codificado en código binario o multiestado. Se utilizó la información anatómica y morfológica propuesta por Vera-Caletti (1999), Kärehed (2001), Hernández-Urban (2013) y Stull *et al.* (2015) (Tabla 6).

Posteriormente se construyó la matriz de datos morfológicos para del género *Calatola* (Tabla 7).

Extracción y cuantificación de ADN

Para la extracción de ADN se usaron dos métodos, uno con el kit comercial DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen® y el segundo con un protocolo modificado de Echevarria-Machado *et al.* (2005) (Anexo 2). Se realizaron un total de nueve extracciones (con el Kit: una para *Calatola mollis*, dos para *C. laevigata* y *Calatola. sp* y dos para *C. costaricensis*. Método de sílica; una para *C. costaricensis* y *C. uxpanapensis*).

Tabla 5 Taxones, número de acceso *GenBank* para los distintos loci utilizados en los análisis de resolución del grupo hermano de *Calatola*. Las secuencias subrayadas fueron generadas para este trabajo.

Taxón	<i>matK</i>	<i>ndhF</i>
<i>Cassinopsis ilicifolia</i>	AJ429312.1	AJ429110.1
<i>Icacina senegalensis</i>	AJ429313.1	AJ429111.1
<i>Mappia mexicana</i>	KT738351.1	KT738635.1
<i>Mappia multiflora</i>		KF146229.1
<i>Oecopetalum mexicanum</i>	KT738359.1	KT738642.1
<i>Ottoschulzia rhodoxylon</i>	KT738361.1	KT738644.1
<i>Ottoschulzia pallida</i>		AJ312966.1
<i>Platea latifolia</i>	KR531369.1	KT738647.1
<i>Calatola cf. venezuelanan</i>		KF146233.1
<i>Calatola mollis</i>	<u>1974ZAF2352347476C</u>	<u>17E6ZAB609617476C</u>
<i>Calatola costaricensis</i>	<u>18B2ZAB056071485C</u>	<u>17E6ZAB610618484C</u>
<i>Calatola costaricensis</i>	<u>18B2ZAB057072486C</u>	<u>17E6ZAB611619485C</u>
<i>Calatola costaricensis</i>	<u>18B2ZAB0540692mC</u>	<u>17E6ZAB612620486C</u>
<i>Calatola laevigiata</i>	<u>18B2ZAB045060489C</u>	<u>17E6ZAB616624490C</u>
<i>Calatola laevigata</i>	<u>18B2ZAB046061490C</u>	<u>18B2ZAB078083489C</u>
<i>Calatola uxpanapensis</i>	<u>18B2ZAB0530681mC</u>	<u>18B2ZAB0740791MC</u>
<i>Calatola sp.</i>	<u>18B2ZAB051066487C</u>	<u>17E6ZAB613621487</u>
<i>Calatola sp.</i>	<u>18B2ZAB058073488.C</u>	<u>18B2ZAB077082488C</u>

Nota: El número presente para cada uno de los ejemplares secuenciados indica el número de seguimiento interno que se llevó durante todo el desarrollo del trabajo y no corresponde a un número de acceso en *Genbank*

Tabla 6- Lista de los caracteres utilizados en la matriz de datos morfológicos para el estudio.

# de carácter	Carácter	Estado de carácter y codificación
1	Anatomía nodal	Unilacunar (0); Trilacunar (1)
2	Elementos del vaso	Poros simples (0); Perforaciones escalariformes (1)
3	Sexualidad de los árboles	Monoico (0); Dioico (1);
4	Presencia de contrafuertes	Ausentes (0); Presentes (1)
5	Tiempo en llegar a la tonalidad morado	Sin cambio (0); 0-5 min minutos (1); 1-2 horas (2)
6	Forma de la hoja	Obovado (0); Elíptica (1); Angostamente oblongo (2); Angostamente elíptica (3); Oblongo (4)
7	Margen de la hoja adulta	Entera (0); Aserrada (1)
8	Coloración de la hoja al secarse	Café oscuro (0); Negro (1)
9	Pubescencia de la hoja adulta	Ausente (0); Presente (1)
10	Pubescencia axilar de las hojas	Ausente (0); Presente (1)
11	Domacios	Ausente (0); Presente (1)
12	Tipo de inflorescencia en las flores masculinas o hermafroditas	Racimo (0); Espiga (1)
13	Pubescencia Inflorescencia masculina o hermafrodita	Glabra (0); Pubescente (1)

Continuación tablas 6

14	Número de partes florales en masculinas/hermafroditas	Cuatro (0); Cinco (1)
15	Maduración floral en flor masculina	Sincronizada (base-ápice) (0); Variable (1); Simultánea (2)
16	Relación antera-filamento	1;2 (0); 2-1:1 (1); 4-3:1 (2); 6-5:1 (3); 8:1 (4)
17	Posición de la antera	Dorsifija (0); Versátil (1)
18	Tipo de crecimiento de la inflorescencia femenina/hermafrodita	Monocasio (0); Dicasio (1)
19	Pedicelos en flores femeninas/hermafroditas	Ausente (0); Presente (1)
20	Pétalos presentes en las flores femeninas/hermafroditas	Ausente (0); Presente (1)
21	Pétalos caducos en las flores femeninas/hermafroditas	Ausentes (0); Presente (1)
22	Indumentación de la cara interna de los pétalos	Ausente (0); Presente (1)
23	Pétalos con venación morada	Ausente (0); Presente (1)
24	Nervio interno del pétalo	Ligeramente desarrollado (0); Desarrollado (1); Muy conspicuo (2)
25	Sépalos connados	Libres (0); Unidos en la base (1/3) (1)
26	Forma del estigma	Capitado (0); Engrosado (1); Lacinado (2)

Continuación tablas 6

27	Ovario pubescente	Ausente (0), Presente (1)
28	Color de pubescencia del ovario	Blanco (0); Amarillo (1); Café-rojo (2)
29	Presencia del disco basal del ovario	Ausente (0); Presente (1)
30	Tamaño del estilo	Sésil u obsoleto (0); Evidente (1)
31	Forma del fruto	Elipsoide (0); oblongoide (1); Globoso (2); Ovoide (3); Anchamente obovado (4)
32	Tamaño del fruto	Chico (1-3cm) (0); Grande (4-8cm) (1)
33	Ornamentación del endocarpo	Liso (0); Ligeramente acostillado (1); Fuertemente acostillado (2)
34	Costillas primarias saliendo de la base-ápice	Ausente (0); Continuo con 1-2 líneas (1); Continuo con 3-5 líneas (2)
35	Costilla de sutura	Muy poco desarrollado (0); Desarrollado (1); Conspicuamente desarrollado (2)
36	Ápice de las costillas primarias	Ausente (0); Delgado y redondeado (1); Delgado y agudo (2); Grueso y aplanado (3); Grueso y redondeado (4)

Tabla 7: Matriz de datos codificados del género *Calatola*.

Matriz de datos del género <i>Calatola</i>.	
<i>Mappia mexicana</i>	00000000001001?011110001000?00100000
<i>Mappia multiflora</i>	00000200001001?011110101001000100000
<i>Oecopetalum mexicanum</i>	11000[14]00000001?101110002000?11[03]01101
<i>Oecopetalum greenmanii</i>	11000[14]00000001?401110002000?11[03]01101
<i>Platea parviflora</i>	11110400000101?40010100?010?10[03]02213
<i>Calatola costaricensis</i>	11101011110110020[01]111100121110212222
<i>Calatola mollis</i>	111010111101101200011110121110012022
<i>Calatola laevigata</i>	11111311100100230[01]111110121210001211
<i>Calatola uxpanapensis</i>	111121111001101301111110121110[02]12224
<i>Calatola</i> sp1	111123111001?0??0??11????2??10411211
<i>Calatola microcarpa</i>	1111?011100110??010111?0121210001211

Nota: el símbolo “?” se empleó para datos desconocidos.

Obtención y edición de las secuencias de ADN

Una característica del ADN es que absorbe la luz ultravioleta (UV) a 260 nm y permite estimar su concentración mediante espectrofotometría. Para llevar a cabo esta medición, se utilizó un espectrofotómetro *NanoDrop*, que requiere de 2 µl de muestra para llevar a cabo la cuantificación. Para estimar la pureza del ADN se considera la proporción de la absorbancia a 260 nm y 280 nm. Una proporción de 1.8 es aceptada como ADN puro, proporciones menores a este valor indican la

presencia de proteínas. Una segunda valoración de la pureza de ácidos nucleicos es la proporción 260/230, los valores aceptados se encuentran en el rango de 2.0 a 2.2, si la relación es menor indican la presencia de contaminantes como carbohidratos o fenol (Velázquez *et al.*, 2014).

Las regiones de los genes *matK* y *ndhF* empleados previamente en la familia Icacinaceae o Metteniusaceae (Kärehed, 2001, 2002; Angulo *et al.*, 2013; Byng *et al.*, 2014; Stull *et al.*, 2015), fueron amplificados usando los *primers* *matK472F* (5'-CCC RTY CAT CTG GAA ATC TTG GTT C-3') y *matK1248R* (5'-GCT RTR ATA ATG AGA AAG ATT TCT GC-3') descritos por Yu, *et al.* (2011). Por otro lado, para el gen *ndhF* se amplificó usando los *primers* 972F (5'-GTC TCA ATT GGG TTA TAT GAT G-3') y 2110R (5'-CCC CCT AYA TAT TTG ATA CCT TCT CC-3') descritos por Olmstead y Sweere (1994).

La técnica consistió en preparar en un microtubo de 1.5 ml una mezcla de los reactivos (H₂O+Buffer+MgCl₂+Solución Q+dNTPs+Taq+P1+P2), para las reacciones que fueran necesarias más una para asegurar que ninguno de los tubos se quedara con menos reactivo, conforme se indica en la Tabla 8. Se dividió el volumen final en las tiras de microtubos, a cada uno se le añadieron 21 µl de la mezcla y 4 µl del ADN de cada muestra (las concentraciones del ADN se manejaron a 15 ng/µl). A los controles negativos se añadieron 4 µl más de agua destilada estéril en lugar de ADN.

Para poder visualizar los productos de la PCR, se empleó gel de agarosa, donde se colocan las soluciones de las reacciones (PCR) Las cuales se mueven a través de

corriente eléctrica, hacia el polo positivo (la carga de una molécula de ADN es negativa por la presencia de grupos fosfatos. Si hay muchos fragmentos de un mismo tamaño se agruparán juntos y se pueden visualizar por la formación de una banda en el gel (Eguiarte *et al.*, 2007).

Para llevar a cabo la electroforesis se disolvió 1.6 gr de agarosa en 80 ml de buffer TAE 1x. Se calentó la mezcla en el microondas hasta obtener una solución transparente, sin grumos y se dejó enfriar; se vertió la solución en un molde para gel, se colocó un peine con el número de pozos necesarios y se dejó solidificar. Una vez solidificado el gel, se retiró cuidadosamente el peine. Se llenaron tres cuartas partes de la cámara de electroforesis con buffer TAE 1X para después colocar el gel de agarosa. El gel quedó cubierto por una capa aproximada de 2-5 mm de buffer. En el primer pozo se cargaron 2 μ L de buffer de carga (bromofenol) más 3 μ L del control. A cada muestra le corresponde un pozo; en cada pozo se cargó con 3 μ L del producto de PCR y 2 μ L de buffer de carga.

Se conectaron los cables de la cámara de electroforesis a la fuente de poder y se programaron 95 volts por una hora. Después de transcurridos 30 minutos se retiró el gel de la cámara y se colocó en la cámara de revelado con bromuro de etidio por 30 minutos. Por último, se colocó el gel en un transiluminador UV para revelar el gel y se fotografió. Una vez obteniendo y verificado la amplificación de la PCR, se enviaron a secuenciar con la compañía Macrogen inc. (Corea del Sur).

Tabla 8. Perfil del termociclador y condiciones de PCR para cada región a evaluar.

Gen	Perfil térmico	Condiciones de PCR	Conc. Inicial	Conc. Final
<i>matK</i>	<p>94°C por 4 min: desnaturalización inicial</p> <p>35 ciclos</p> <p>Desnaturalización: 94°C por 45s, 48°C por 48s</p> <p>Extensión: 72°C por 1 min 72 °C</p> <p>Extensión final: 72°C por 5 min</p>	<p>Volumen final de 25 µl:</p> <p>H₂O= 7.1</p> <p>Buffer = 2.5 µl</p> <p>MgCl₂ = 2.5 µl</p> <p><i>matK472F</i>= 1 µl</p> <p><i>matK1248R</i>= 1 µl</p> <p>Solución Q= 5 µl</p> <p>dNTPs= 2.5 µl</p> <p>Taq= 0.4 µl</p> <p>ADNc= 3 µl</p>	<p>10x</p> <p>25nM</p> <p>10nm</p> <p>10nm</p> <p>2nm</p> <p>2U</p>	<p>1x</p> <p>2.5</p> <p>0.4</p> <p>0.4</p> <p>0.2nM</p> <p>0.4µl</p>
<i>ndhF</i>	<p>94°C por 4 min: desnaturalización inicial</p> <p>30 ciclos</p> <p>Desnaturalización: 94°C por 45s, 49°C por 90s</p> <p>Extensión: 72°C por 3 min 72 °C</p> <p>Extensión final: 72°C por 7 min</p>	<p>Volumen final de 25µl:</p> <p>H₂O= 10.8 µl</p> <p>Buffer = 2.5 µl</p> <p>MgCl₂ = 1 µl</p> <p>972F= 1 µl</p> <p>2110R= 1 µl</p> <p>Solución Q= 5 µl</p> <p>dNTPs= 1.5 µl</p> <p>Taq= 0.2 µl</p> <p>ADNc= 2 µl</p>	<p>10x</p> <p>25nM</p> <p>10nm</p> <p>10nm</p> <p>2nm</p> <p>1U</p>	<p>1x</p> <p>2.5</p> <p>0.4</p> <p>0.4</p> <p>0.12nM</p> <p>0.2µl</p>

Ensamble, edición y alineación de secuencias

Las secuencias fueron ensambladas y editadas con el software *Sequencher* v5.4.5 (*Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA*) y *BioEdit* V7.0.9. Finalmente, las secuencias editadas fueron comparadas con los datos genéticos de la base de datos *GENBANK* usando la herramienta *BLASTN*, para comprobar que las secuencias de cada uno de los fragmentos de *matK* y *ndhF* fueran de *Calatola* y no de otros organismos.

Las secuencias ya editadas fueron alineadas a través de la implementación del algoritmo de alineación múltiple con el programa *SeaView* v3.2 (*Galtier et al., 1996*) con los parámetros predeterminados. Las matrices concatenadas de moléculas (*matk* y *ndhF*) y moléculas y morfología fueron ensambladas por separado en *BioEdit* V7.0.9.

Prueba de congruencia.

Para evaluar la congruencia entre las regiones *matK* y *ndhF* se empleó el programa *PauP** v4.0 (*Swofford, 1999*) con lo el cual se realizó la estimación del *ILD* como indicador de congruencia (*Farris et al., 1995*).

Análisis filogenético

Parsimonia:

Los análisis de máxima parsimonia se realizaron utilizando el programa *TNT* (*Goloboff et al., 2008*). Se usaron cinco estrategias de análisis, en el primero se analizaron los 36 datos morfológicos para los 11 taxa, (Tabla 6). En el segundo

análisis se emplearon 15 secuencias del gen *matK*; en el tercer análisis se emplearon 18 secuencias del gen *ndhF*; en el cuarto se emplearon 18 secuencias concatenadas para los genes *matK* y *ndhF*; y para el quinto se emplearon 18 secuencias concatenadas para los genes *matK-ndhF* y la morfología.

Para encontrar los árboles más parsimoniosos se utilizó una búsqueda exhaustiva con el logaritmo de enumeración implícita, para cada uno de los análisis. Para los análisis de los datos moleculares y concatenados, se obtuvo el árbol de mayoría (majority rule), con un corte al 50 %, utilizando todos los arboles e incluyendo todos los taxa, todos los caracteres tuvieron el mismo valor y huecos presentes entre las secuencias alineadas fueron considerados como un dato adicional. El mapeo de la distribución de los caracteres morfológicos se realizó utilizando Winclada 1.00.08 (Nixon, 2002).

Análisis bayesiano

El análisis bayesiano se efectuó con Mr. Bayes v3.2.6 (Huelsenbeck y Ronquist, 2001), se realizó una búsqueda exploratoria de 1000000 de generaciones, 5 cadenas y un *burning* de 25% para determinar el mejor modelo de evolución se empleó Jmodeltest 2.1.3 (Darriba *et al.*, 2012), con los parámetros que trae por default. Bajo el criterio de Akaike (AIC), el modelo empleado fue GTR+I+G, para las secuencias de *matK* y *ndhF*. Los árboles resultantes por ambos métodos se editaron con ayuda de los programas Tree v1.1.6, FigTree y CorelDraw X7.

Resultados

Revisión de herbarios y recolecta en campo

Se revisaron un total de 385 ejemplares herborizados en CHAPA, CHIP, CICY, ECOSUR, ENCB, HEM, MEXU, ZEA, acrónimos según Thiers [actualización constante]: 26 correspondieron a *Mappia* (Icacinaceae), 321 a *Calatola*, 26 a *Oecopetalum* y 12 a *Ottoschulzia pallida* (Metteniusaceae) todos presentes en México. Para *Calatola*, se consideran cinco taxa en los cuales se observan claras diferencias morfológicas (Tabla 9).

Análisis filogenético

En la tabla 10 se resume los estadísticos asociados a los análisis de parsimonia basados en morfología, *ndhF*, *matK* y combinados y adicionalmente la calidad de las secuencias moleculares expresadas en el número de ambigüedades para los ensamblajes recibidos de Macrogen. Las figuras de la 4 a la 9 son los árboles más parsimoniosos o árboles de consenso de la mayoría (50 %). Por último, las figuras de la 10 a la 12 incluyen los árboles de resultados de los análisis bayesianos.

Parsimonia (morfológico): Con los 36 caracteres morfológicos (Tabla 6) empleados, en la búsqueda de topologías más parsimoniosas (enumeración implícita), se encontraron dos árboles más parsimoniosos con L=66, IC= 0.833, y IR= 0.872 (Tabla 10). Los cladogramas (Figura 4 A y B) destacan que *Platea* es el

grupo hermano de *Calatola* (Clado A) y comparten siete sinapomorfías: (carácter 3) sexualidad de los árboles, (4) presencia de contrafuertes, (12) tipo de inflorescencia en las flores masculinas/hermafrodita, (21) pétalos caducos en las flores femeninas/hermafroditas, (26) forma del estigma, (34) costillas primarias salientes de la base-ápice y (35) costilla de sutura (Figura 4).

Los dos árboles también muestran que *Calatola* es un grupo monofilético (Clado B), soportado por seis sinapomorfías: (5) tiempo en llegar a la tonalidad morada, (7) margen de la hoja adulta, (8) coloración de la hoja al secarse, (9) pubescencia de la hoja adulta, (14) número de partes florales en masculinas/hermafroditas y (26) Forma del estigma. En el segundo árbol (Figura 4B) hay dos sinapomorfías adicionales que apoyan la monofilía de *Calatola* (23) Pétalos con venación morada y (25) sépalos connados.

Tabla 9- Número de ejemplares recolectados e identificados.

<i>C. mollis</i>	<i>C. laevigata</i>	<i>C. uxpanapensis</i>	<i>C. costaricensis</i>	<i>C. sp.</i>
1 individuo	3 individuos	4 individuos	7 individuos	3 individuos
Puebla 23/01/2016	Jalisco 11/02/2016	Veracruz 2/03/2016 22/04/2016	Veracruz 22/04/2016	Chiapas 23/05/2016 16/10/2016
Fruto maduro	Frutos maduros	Agosto-Octubre	Flores masculinas y flores femeninas	Endocarpos en el suelo
Hernández- Urban H.A. #=217	Hernández- Urban H.A. #=218, 219, 220	Hernández- Urban H.A. #=222, 223, 224, 225	Hernández- Urban H.A. #=226, 227, 228, 229, 230, 231, 232	Hernández- Urban H.A. #=233, 234, 235

Tabla 10: Resumen de estadísticos asociados a los análisis de parsimonia basados en morfología, *ndhF*, *matK* y combinados.

	Nº de Caracteres	Nº Caracteres Informativos	A	L	IC	IR	Amb
Morfología	36	36 (100%)	2	66	0.833	0.872	
MatK	870	118 (13.56 %)	7	487	0.842	0.784	28-66
NdhF	1084	210 (19.37 %)	3	888	0.709	0.765	199-271
NdhF + matK	1954	328 (16.78 %)	1	939	0.808	0.751	
Moléculas + morfología	1990	538 (36.15 %)	1	1015	0.802	0.755	

Nota: abreviaturas empleadas A.= número de árboles, L= longitud, número de pasos, IC= índice de consistencia, IR= índice de retención y Amb= ambigüedades

Parsimonia (molecular)

Parsimonia (análisis filogenético del gen *matK*)

En el análisis de parsimonia se obtuvieron siete árboles igualmente parsimoniosos, $L=487$, $IC=0.842$, $IR= 0.784$ (Tabla 10). El cladograma de consenso de la mayoría (Figura 5) muestra que *Platea* es el grupo hermano de *Calatola*, con un apoyo de *bootstrap* de 96 %. *Calatola* también es un grupo monofilético con un apoyo de *bootstrap* de 99 %. El análisis no resuelve en su totalidad las relaciones interespecíficas. Las dos especies con réplicas (dos individuos de la misma población) arrojan resultados inesperados, ya que no forman un grupo monofilético. El soporte de *bootstrap* sólo es robusto para *C. laevigata* ($BS=99\%$), mientras que el clado *C. mollis* y *Calatola sp.* tiene un apoyo de 55 %. No hay apoyo para el resto de las especies terminales *C. costaricensis*, *C. uxpanapensis* y *Calatola sp.* (segunda accesión).

Parsimonia (análisis filogenético del gen *ndhF*)

Se obtuvieron tres árboles igualmente parsimoniosos, ($L=888$), $IC=0.709$, $IR=RI=0.765$ (Tabla 10). El cladograma de consenso de mayoría (Figura 6), muestra dos grandes grupos monofiléticos, el primero con apoyo de *bootstrap* de 54% incluye a *Icacina*, *Mappia*, *Platea*, *Oecopetalum* y *Ottoschulzia* y el segundo grupo con un apoyo de 100 % al género *Calatola*. Nuevamente se observa una resolución incompleta a nivel intraespecífica.

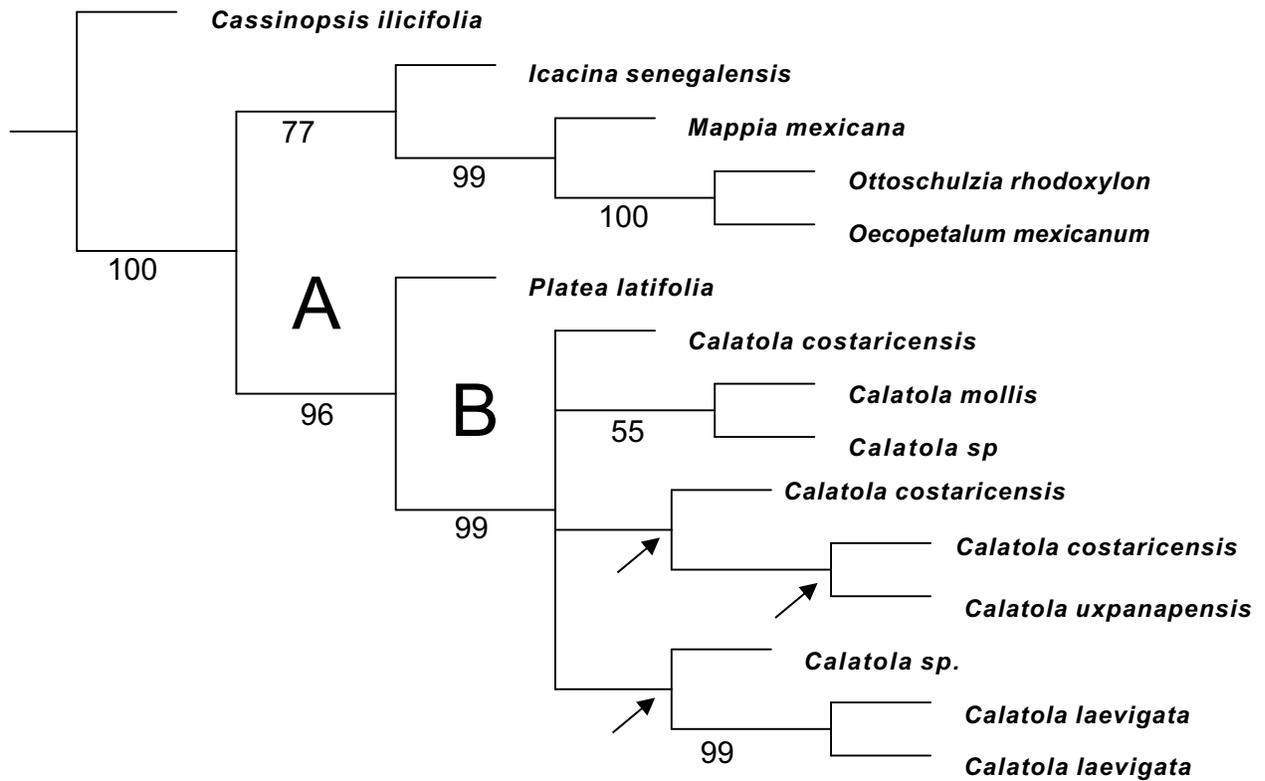


Figura 5. Árbol de consenso de mayoría (50%) reconstruido a través del método de parsimonia de especies del género *Calatola* con base en las secuencias de la región *matK*. Búsqueda enumeración implícita (L= 487, IC=0.842, IR= 0.784). **A**= Clado Plateoideae, **B**= Clado Calatola. TNT (Goloboff, *et al.*, 2008). Los números debajo de las ramas representan los valores obtenidos en el análisis de remuestreo (*bootstrap*). Las flechas indican los clados con valores de *bootstrap* menores a 50% (colapsan).

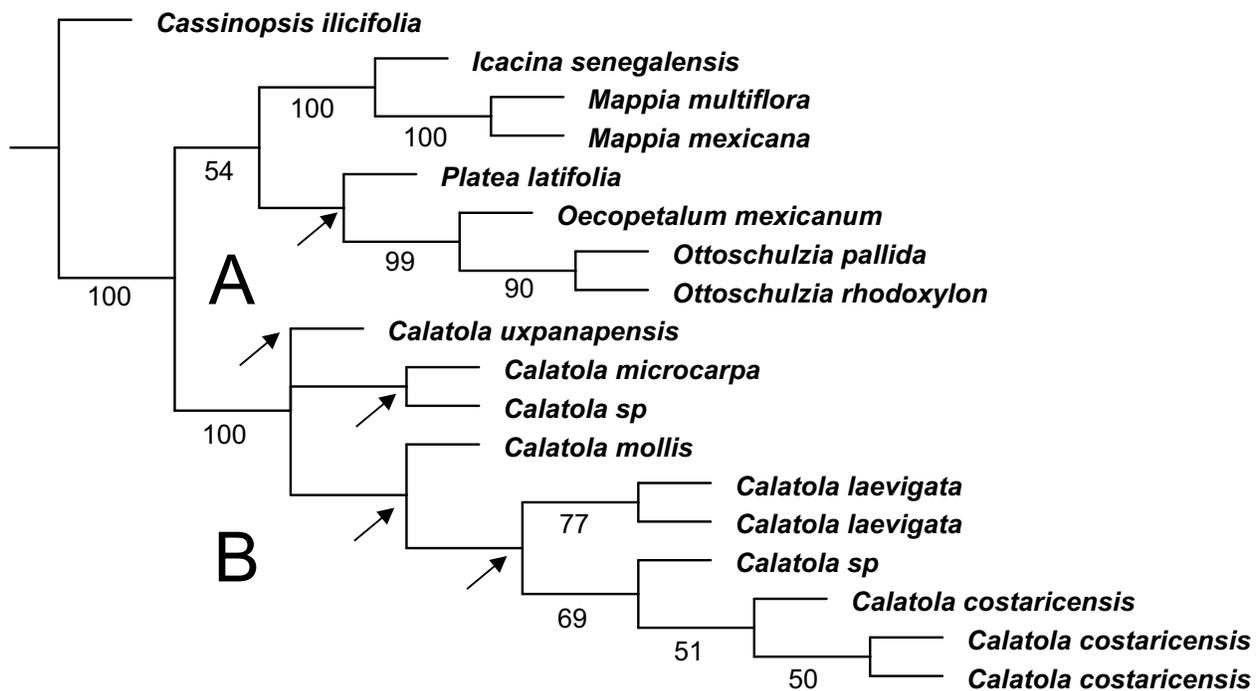


Figura 6. Árbol de consenso de mayoría (50%) reconstruido a través del método de parsimonia de especies del género *Calatola* con base en las secuencias de la región *ndhF*. Búsqueda enumeración implícita (L= 888, IC=0.709, IR= 0.765). **A**= Clado Icacinaceae + Metteniusaceae, **B**= Clado *Calatola*. TNT (Goloboff *et al.*, 2008). Los números debajo de las ramas representan los valores obtenidos en el análisis de remuestreo (*bootstrap*). Las flechas indican los clados con valores de *bootstrap* menores a 50 % (colapsan).

Parsimonia (análisis filogenético concatenado *matK* y *ndhF*)

Se obtuvo un solo árbol que fue el más parsimonioso (LP=939, IC=0.808, IR=0.751) (Tabla 10 y Figura 7). El árbol obtenido incluye dos clados principales, el primero (A) con los géneros de la familia Icacinaceae y Metteniusaceae que contiene a *Platea latifolia*. Dicha rama tiene un soporte de *bootstrap* de 69 %. El segundo clado (B) incluye al género *Calatola*, con un apoyo de *bootstrap* de 100%. La resolución intraespecífica del género *Calatola* es muy baja.

Parsimonia (análisis filogenético concatenado morfología, *matK* y *ndhF*)

Se obtuvo un solo árbol parsimonioso (L=1015, CI=0.802, RI=0.755) (Tabla 10 y Figura 8). El árbol obtenido incluye dos clados principales, el primero (A) incluye a los géneros de la familia Icacinaceae incluidos en este análisis con un apoyo de *bootstrap* de 100 %. El segundo clado (B) incluye a los miembros de la familia Metteniusaceae y al género *Calatola*, con un apoyo de *bootstrap* de 100%. Los números debajo de las ramas representan los valores obtenidos en el análisis de remuestreo (*bootstrap*). Las flechas indican los clados con valores de *bootstrap* menores a 50 % (colapsan).

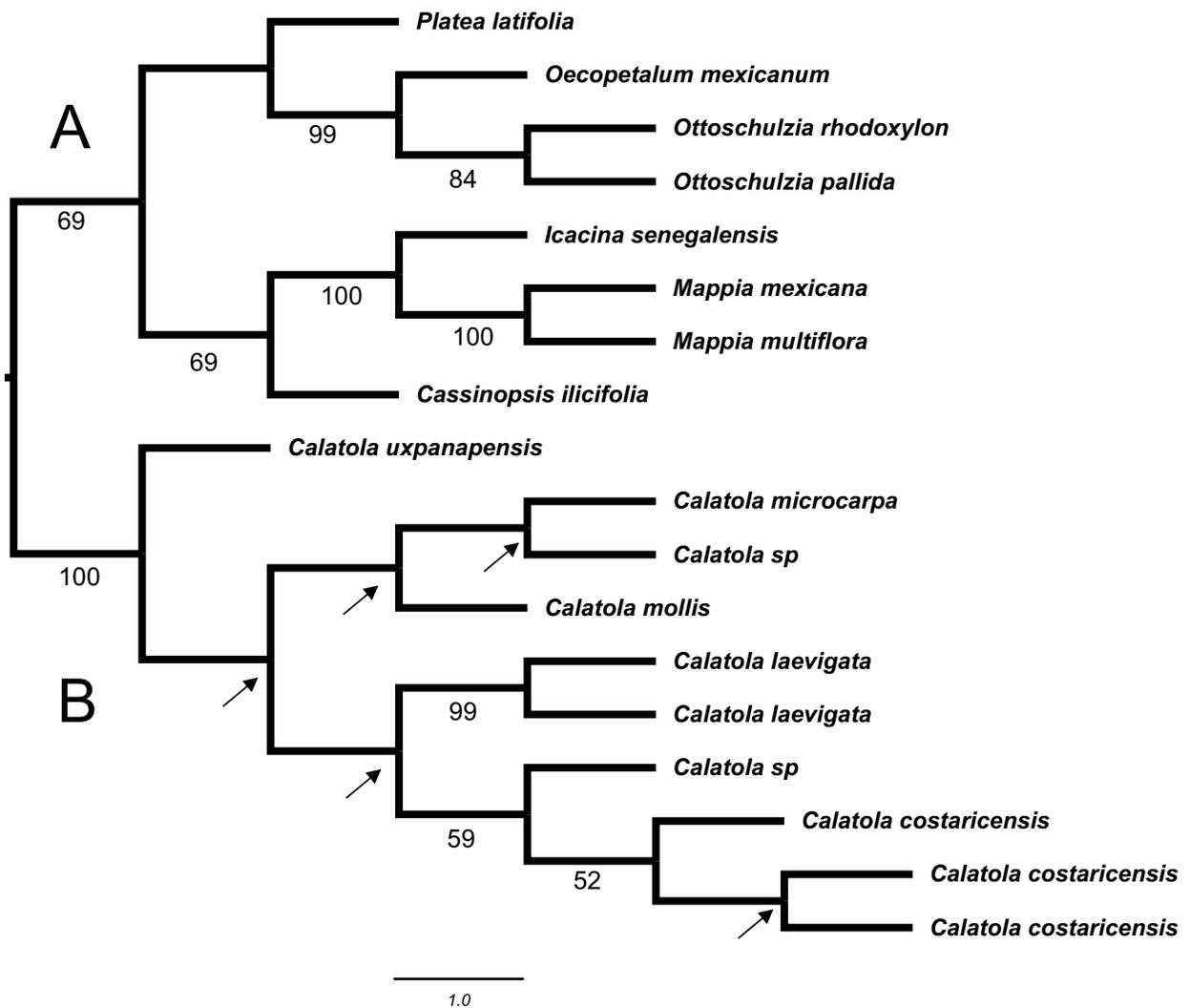


Figura 7. Árbol único reconstruido a través del método de parsimonia de especies del género *Calatola* con base en las secuencias de la región *ndhF-matK*. Búsqueda enumeración implícita (L=1015, IC=0.802, IR=0.755). **A**= Clado géneros de Icacinaceae + Metteniusaceae excluyendo *Calatola*. **B**= Clado *Calatola*. TNT (Goloboff *et al.*, 2008). Los números debajo de las ramas representan los valores obtenidos en el análisis de remuestreo (*bootstrap*). Las flechas indican los clados con valores de *bootstrap* menores a 50 % (colapsan).

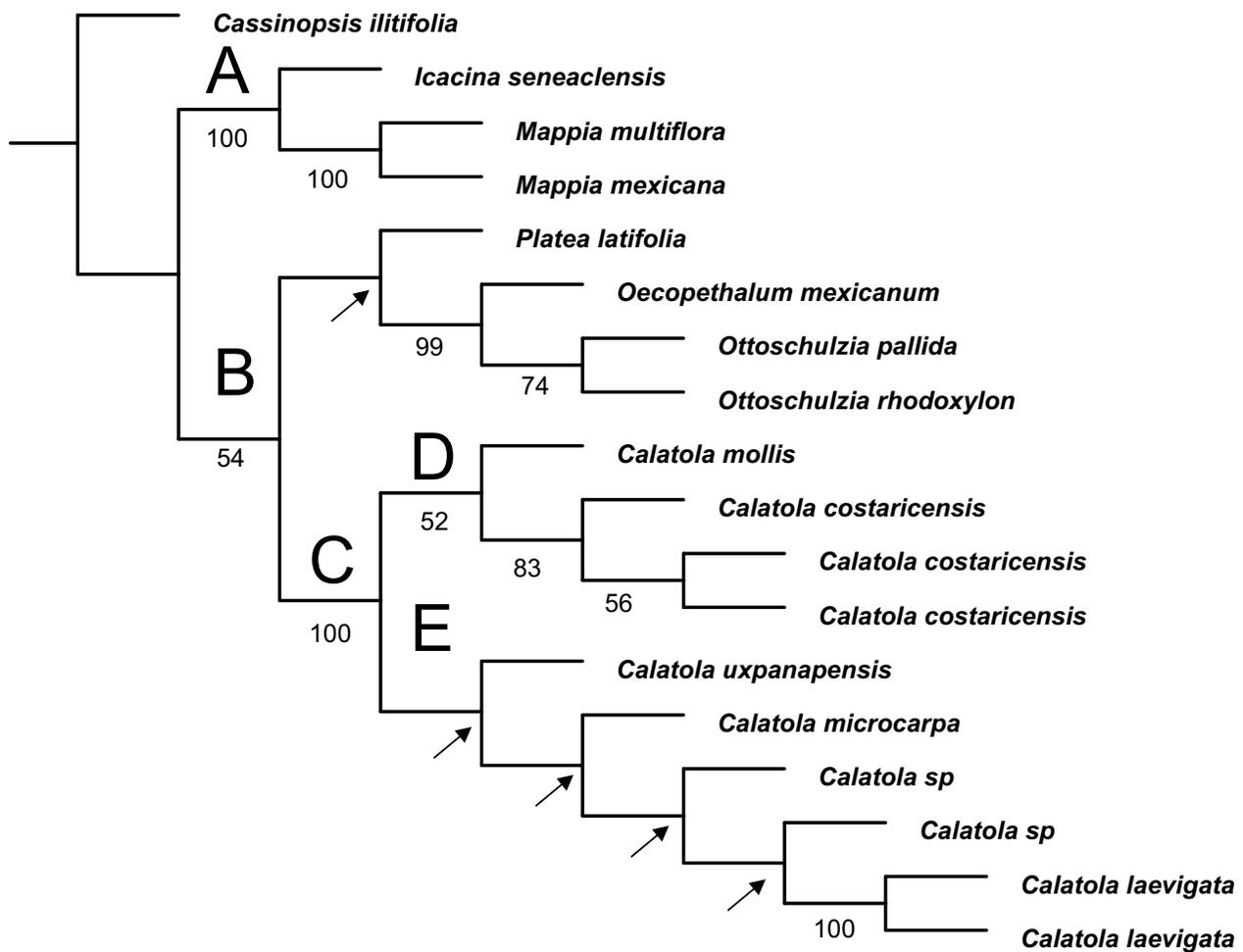


Figura 8. Árbol único reconstruido a través del método de parsimonia de especies del género *Calatola* con base en las secuencias de la región *ndhF* + *matk* + morfológico. Búsqueda enumeración implícita (LP=939, IC=0.808, IR=0.751). **A**= Clado géneros de Icacinaceae, **B**= Clado géneros Metteniusaceae, **C**= Clado género *Calatola*, **D**= Clado especies *C. mollis*-*C. costaricensis*, **E**= Clado especies *C. uxpanapensis*-*C. microcarpa*-*Calatola sp.*-*C. laevigata*. TNT (Goloboff, *et al.*, 2008). Los números debajo de las ramas representan los valores obtenidos en el análisis de remuestreo (*bootstrap*). Las flechas indican los clados con valores de *bootstrap* menores a 50 % (colapsan).

Análisis Bayesianos

El mejor modelo de sustitución nucleotídica que se obtuvo fue el GTR+I+G (JMODELTest V2.1.3.) En los árboles encontrados (Figura 9, 10 y 11) se soporta la monofilía de *Calatola* aunque las relaciones intragenéricas aún no quedan totalmente claras. Con el marcador *matK* (Figura 9) se observa que *Platea* es el grupo hermano de *Calatola*. Hay tres clados uno (Clado A) formado por *C. laevigata* y *Calatola* sp., otro (Clado B) formado por *Calatola uxpanapensis* y *C. costaricensis* y, finalmente un clado formado por la especie terminal *Calatola mollis*.

Con el marcador *ndhF* la resolución es menor, pero se recupera el clado *Calatola* sp., *Calatola costaricensis* y *C. laevigata*, los demás taxa terminales se encuentran formando un peine con este clado. Por último, el análisis con las dos secuencias moleculares forman un árbol intermedio entre los dos previos; se reconocen dos clados que junto con *C. mollis* y *C. microcarpa* forman una politomia, estos clados son: *Calatola* sp y *C. laevigata* y otro clado con *C. costaricensis* y *C. uxpanapensis*.

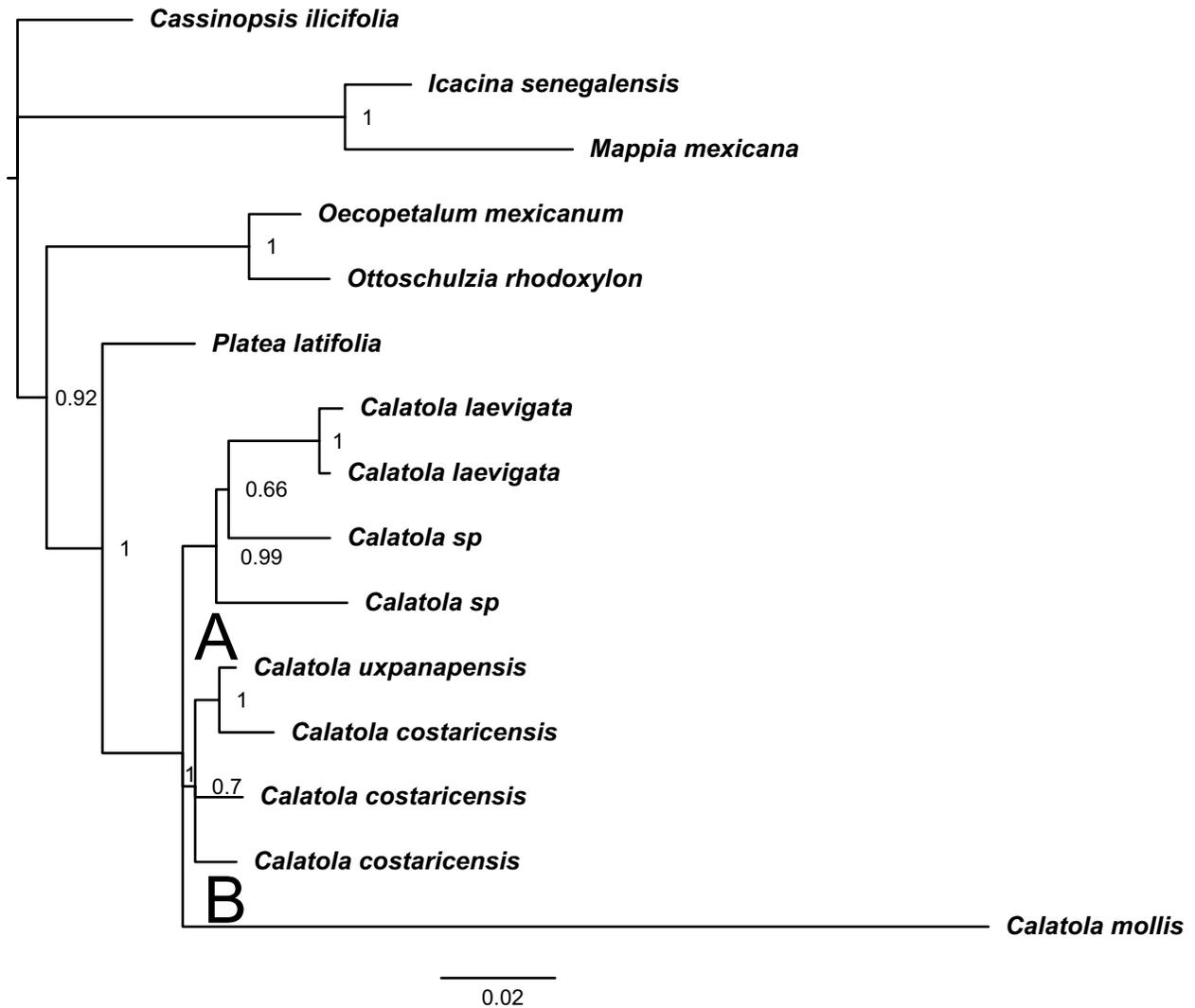


Figura 9 Árbol consenso reconstruido a través del método bayesianos de 1000000 generaciones (Huelsenbeck y Ronquist, 2001), con el modelo de GTR+I+G (Darriba *et al.*, 2012), en especies del género *Calatola* con base en las secuencias de la región *matK*. **A**= Clado especies *Calatola sp.*-*C. laevigata*, **B**= Clado especies *C. costaricensis*-*C. uxpanapensis*

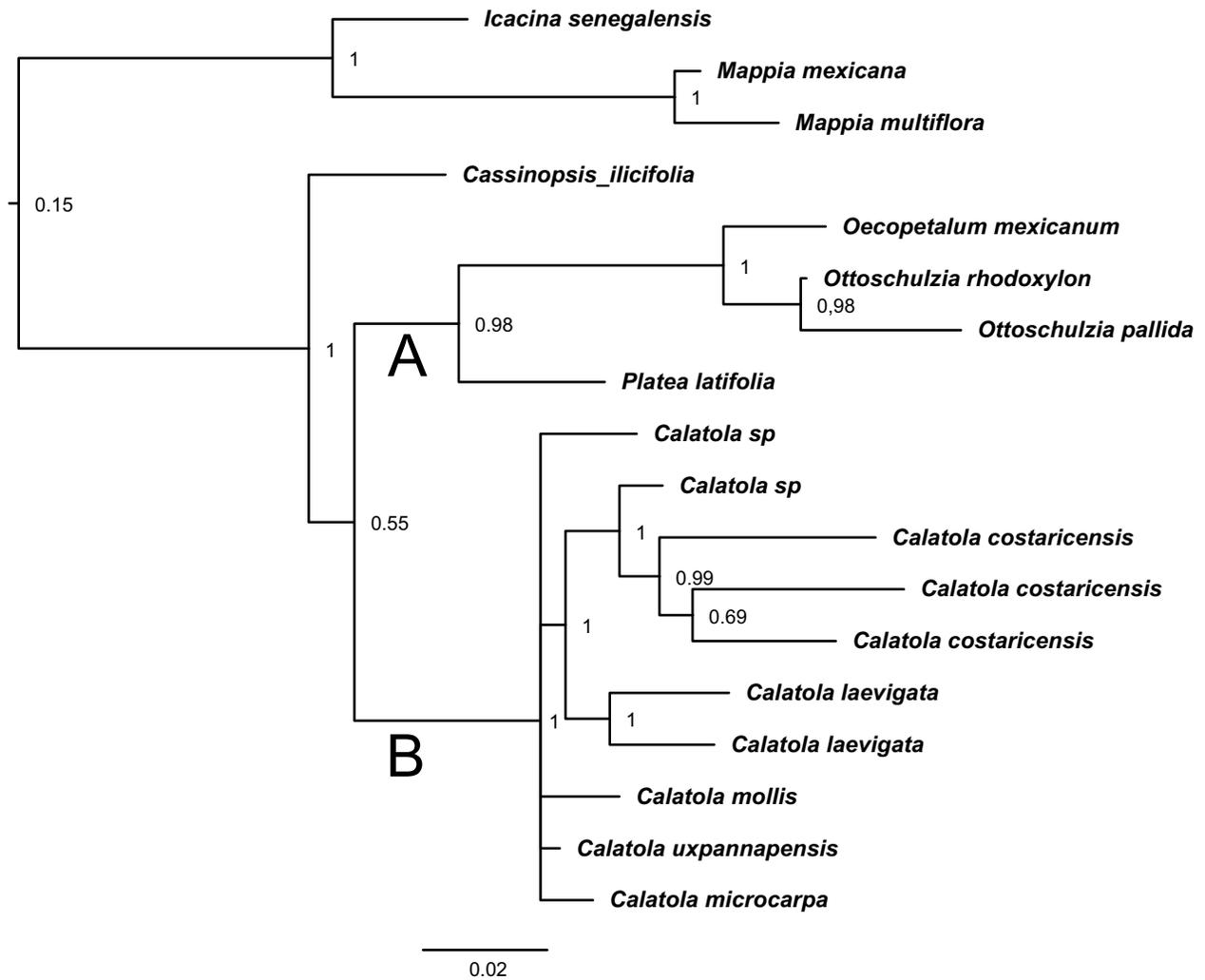


Figura 10 Árbol consenso reconstruido a través de bayesianos de 1000000 generaciones (Huelsenbeck y Ronquist, 2001), con el modelo de GTR+I+G (Darriba *et al.*, 2012), en especies del género *Calatola* con base en las secuencias de la región *ndhF*. **A**= Clado de los géneros Plateoideae y Metteniusoideae, **B**= Clado *Calatola*.

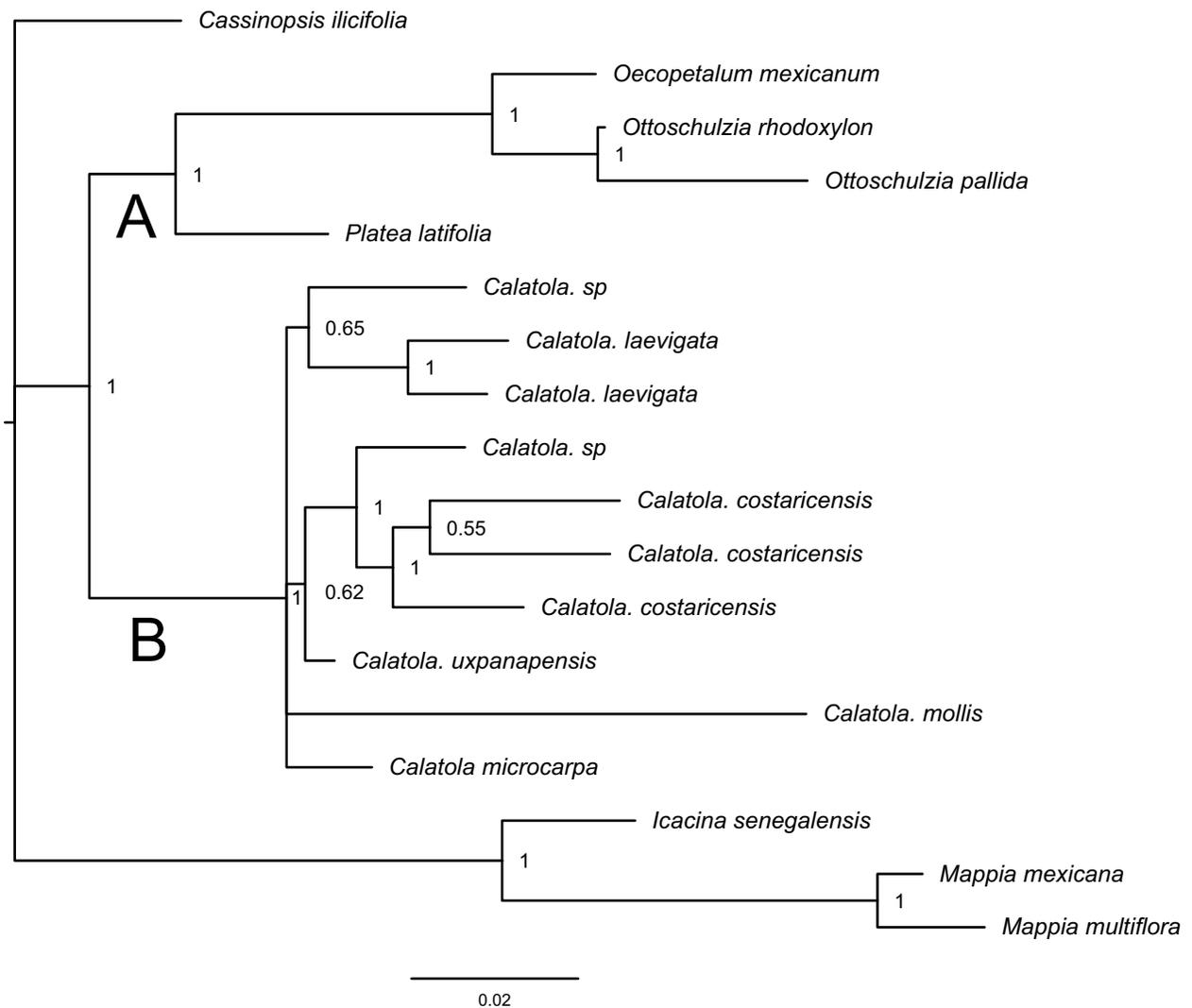


Figura 11 Árbol consenso reconstruido a través de bayesianos de 1000000 generaciones (Huelsenbeck y Ronquist, 2001), con el modelo de GTR+I+G (Darriba *et al.*, 2012), en especies del género *Calatola* con base en las secuencias de la región *matK-ndhF*. **A**= Clado de los géneros Plateoideae y Metteniusoideae, **B**= Clado *Calatola*.

Como parte del trabajo se generaron los siguientes datos complementarios. Se presenta una tabla sinóptica de los caracteres anatómicos y morfológicos que caracterizan a las familias Icacinaceae y Metteniusaceae (Tabla 11) y otra para las especies de *Calatola* en México (Tabla 12).

Clave dicotómica

Se presenta una clave para los géneros de la familia Metteniusaceae, junto con una sinopsis taxonómica del género *Calatola* (anexo 1).

Tabla 11: caracteres y estados de carácter para las familias Icacinaceae y Metteniusaceae

Caracteres	Icacinaceae	Metteniusaceae
Hábito	Árboles, arbusto y lianas	Árboles
Anatomía nodal	Unilacunar y trilacunar	Trilacunar y unilacunar (<i>Rhaphiostylis</i>)
Anatomía nodal (perforaciones)	Perforaciones simples	Escalariformes y poros simples en <i>Rhaphiostylis</i> .
Cristales (drusas)	Ausente y presente (madera, hojas y/o flores)	Presente (madera, hojas y/o flores)
Cristales rómbicos	Ausentes y presente	Presente en madera, hojas y flores

Continuación tabla 11

Cristales de arenas	Ausente y presente	Ausentes y presentes
Estomas	Ciclocítico y anomocítico	Anomocítico y ciclocítico
Células guarda	sin rebordes estomáticos internos, con o sin pieza polar T, sin un borde peristomal distinto	sin rebordes estomáticos internos, con o sin pieza polar T, sin un borde peristomal distinto
Células auxiliares	Parcialmente a casi completamente sumergido	Parcialmente a casi completamente sumergido
estomas (longitud μm)	10-40	20-30
Estomas (ancho μm)	10-40	10-30
Tipos indumentos	Pelos normales, globulares y uniciliados	Pelos normales, malpigiáceos, peltados y glandulares
Pelo	Presente en el lado adaxial y/o abaxial	Presente en el lado adaxial y/o abaxial
Hojas	Usualmente alternas (<i>loides</i>)	Alternas
Lámina	Simple	Simple
Márgenes (lamina)	Usualmente entera, ocasionalmente aserrada (<i>Cassinopsis</i> y <i>Pleurisanthes</i>)	Usualmente entera, ocasionalmente aserrada (<i>Calatola</i>)
Nerviación	Bronquidódroma	Bronquidódroma
Inflorescencia	Axilar en cimas dicotómicas, panícula, espiga y racimo	Axilar en cimas dicotómicas, panícula, espiga y racimo
Bractéolas	Ausentes	2 o 3
Cáliz	Usualmente 5	Usualmente 5, 4 (<i>Calatola</i>)
Corola	Usualmente 5	Usualmente 5, 4 (<i>Calatola</i>)
Corola (tubo)	Usualmente libres	Usualmente libres, unidos (<i>Dendrobangia</i> y <i>Ottoschulzia</i>)
Androceo	Estambres 3-5, filamento largo libre.	Estambres 5, filamento largo o corto, libres o adnato a la corola

Continuación tabla 11

Antera	Dorsifija, versátil, tetrasporangia, usualmente introsa a veces latrorsa, longitudinal	Basifija, versátil, polisporangia, septado, latrorsa, longitudinal, moniliforme.
Polen (apertura)	Porado, tricolpado o triporado	Tricolporado.
Polen (ornamentación)	Generalmente equinado con annulus presente o ausente, faveolado-granular, arelado, faveolado-papilado y granular-papilado-equinado	Foveolado, psilado o reticulado.
Ovario	Usualmente 2 (raramente 1 o 3), connotado	Usualmente 5 carpelos (2 más pequeños)
Óvulos	Usualmente 2 (rara vez 1), anatropía, apotropico, pendular, unitegumentado, placenta apical usualmente	Usualmente 2, Colateral ha superpuesto, anatropo, pendular, unitegumentado, placentario parietal <i>Metteniusa</i> , un óvulo
Óvulo tipo	Crasinucelado a veces teniunucelado	Crasinucelado
Estilo	Simple y filiforme, a veces casi ausente	Simple y filiforme, reducido y lacinado (<i>Calatola</i>), transformado en un disco (<i>Platea</i>).
Estigma	Puctado	Puctado o ligeramente papiloso
Fruto	Drupa	Drupa
Embrión	2 cotiledones, normalmente largo, recto a curvado bien diferenciado con clorofila	2 cotiledones, corto a largo, curvo, bien diferenciado, con clorofila

Continuación tabla 11

Géneros	23: <i>Alsodeiopsis</i> , <i>Casimirella</i> , <i>Cassinopsis</i> , <i>Desmostachys</i> , <i>Hosiea</i> , <i>Icacina</i> , <i>Iodes</i> , <i>Lavigeria</i> , <i>Leretia</i> , <i>Mappia</i> , <i>Mappianthus</i> , <i>Merrilliodendron</i> , <i>Miquelia</i> , <i>Natsiatopsis</i> , <i>Natsiatum</i> , <i>Nothapodytes</i> , <i>Phytocrene</i> , <i>Pleurisanthes</i> , <i>Pyrenacantha</i> , <i>Rhyticaryum</i> , <i>Sarcostigma</i> , <i>Sleumeria</i> y <i>Stachyanthus</i> .	11: <i>Apodytes</i> , <i>Calatola</i> , <i>Dendrobangia</i> , <i>Emmotum</i> , <i>Metteniusa</i> , <i>Oecopetalum</i> , <i>Ottoschulzia</i> , <i>Pittosporopsis</i> , <i>Platea</i> , <i>Poraqueiba</i> y <i>Rhaphiostylis</i> .
Distribución general	Nuevo Mundo y Viejo Mundo (África, Asia y Oceanía)	Nuevo Mundo y Viejo Mundo (África, Asia y Oceanía)

Tomado de: Baas (1974); Bailey y Howard (1941a, b, c, d); Heintzelman y Howard (1948); Howard (1942); Lozano-Contreras y Lozano (1988); Stull *et al.*, (2015); Van Staveren y Baas (1973); Vera-Caletti, (1999)

Tabla 12: Diferencias morfológicas entre las especies de *Calatola*. Modificado de Hernández-Urban, 2013

	<i>C. mollis</i>	<i>C. costaricensis</i>	<i>C. laevigata</i>	<i>C. uxpanapensis</i>	<i>C. sp. (inérita)</i>
Brecha de corteza	Se torna azul-morado inmediatamente después del corte	Después de 5 min. comienza a ponerse verde claro, paulatinamente cambia a verde-oscuro hasta azul-morado	2 hr. después del corte se torna azul-morado	A los 5 min. empieza a cambiar de color verde-azuloso a morado	2 hr. después del corte se torna azul-morado
Forma de hoja	Mayoría ampliamente elíptica	Variable, mayoría elíptica	Elíptica a ovado-elíptica	Estrechamente elíptica, mayoría oblongo-elíptica	Elíptica a oblongo-elíptica
Tamaño	25-30 X 10-12 cm	16-22 X 8-11 cm	(10.5-) 14-18(-21) X (4-) 5-7.5 cm	(10.5)14-20(-30) X (3-)4-7(-9.5)	(6.5)9-10(12.3) X (2)2.6-3.8 cm
Ápice y	Acumen	Acumen	Mucronado o ligeramente acuminado, acumen	Acuminado, acumen	Acuminado
Tamaño (longitud)	(1)1.5 cm	1(1.5) cm	4-5 cm	1-2 cm	2-3.5

Continuación tabla 12

Envés	Muy pubescente	Mayoría glabrescente con mechones de pelos en las axilas	Glabrescente	Glabrescente	Glabrescente
Espiga masculina: Tamaño	(13)14-26 X 0.6-0.7 cm	(9)17-20(23) X 0.4- 0.5(0.6) cm	(2)3-5(6.5) X 0.3- 0.5 cm	(3)5-9(12) X 0.4-0.5 cm	
Pedúnculo (tamaño)	5-7 X 1.5-20 mm	5-7(9) X 1.5 mm	1.7-2.0 X 1.3 mm	5-10 X 1mm	15-20 mm
Pubescente	seríceo al igual que el raquis	glabro al igual que el raquis	seríceos al igual que el raquis	finamente adpreso puberulentas al igual que el raquis	Glabro
Sépalos	Membranosos	Coriáceos	Membranosos	Ligeramente coriáceos	
Pétalos (largo)	2.5-3(3.5) mm	2-2.5 mm	2-2.2 mm	1.8-2 mm	

Continuación tabla 12

Coloración de la vena media	Con venación morada en ambas caras, el nervio medio pubescente	Sin venación morada en ambas caras, pubescente el nervio medio	venación morada pubescentes en ambas caras sobre el nervio medio	Venación morada cara interna pubéscete solo en el nervio medio. Externa sobre y alrededor del nervio medio sin cubrir toda la superficie	
Inflorescencia femenina	Monocasios Seríceos; pelos amarillo-blanquecinos	Monocasio, la mayoría dicasios simples Seríceos; tricomas, amarillo o rojizos	Monocasios, la mayoría dicasios simples	Dicasios compuestos Seríceos; tricomas blanquecinos	Dicasios compuestos
Longitud	1.5-2 cm	0.7-1.2 cm	0.7-1.2(1.7) cm	0.7-1.5 cm	(0.9)1.2-1.5 cm
Numero de flores	2(3) sésiles	Generalmente 3 pediceladas	4-6(10) pediceladas	3-4(6) pediceladas	
Pedúnculo	5.5-7.5 (15) mm de longitud	4-6 mm de longitud	2 mm de longitud	(2.5)3-5 mm de longitud	
Ovario	Pubescencia verde con tonos de color café	Pubescencia rojiza	Pubescencia blanquecina	Pubescencia rojiza	

Continuación tabla 12

Estigma	Fino y uniformemente multilobado	Lobado.	Lobado.	Fino y uniformemente lobado.	
Largo	0.3-0.5 (0.7) mm	0.3-0.4(10) mm	1.0 mm	0.2-0.4 mm	
Fruto	Elipsoidal, anchamente elipsoide	Globoso-subgloboso	Elipsoidal, reticulado, casi liso, sin crestas	Globoso-elipsoidal.	Globoso- obovoide
Tamaño	5-6 X 4-5(6) cm	5-6 X 4-5 cm	2-2.5 cm de longitud	(4)5-7(7.8) cm de longitud	3.5-4.0 X 2.7-3.0 cm
Endocarpo: Cresta ecuatorial	(2)2.5(3) mm de ancho	5-7(8) mm de ancho	Sin cresta ecuatorial ni costillas evidentes	(3)4-5(7)mm de ancho	Con cresta ecuatorial ni costillas evidentes
Consistencia	Leñoso	Leñoso	Semejante al corcho	Leñoso	Leñoso
Distribución			Vertiente del Pacifico	Vertiente del Atlántico	Vertiente del Pacifico

Discusión

Calatola es un género que, a pesar de presentar pocas especies en México, no está bien resuelto taxonómicamente debido a la falta de caracteres diagnósticos. De manera tradicional características morfológicas tales como las hojas y forma del endocarpo han sido empleadas para la determinación de las especies debido a que la mayoría de los ejemplares sólo cuentan con estas estructuras, de tal forma que, por la misma escasez de características, pueden existir errores en su determinación, tal es el caso de *C. uxpanapensis*, que fue confundida por mucho tiempo *C. laevigata* (Gutiérrez, 1994; Duno, 2011; Gutiérrez y Duno, 2014), por la forma de la lámina y la ausencia de pubescencia en el envés, a pesar que el tamaño del endocarpo, así como una ornamentación poco marcada, tiempos de coloración diferidos y la altitud donde se encuentran es diferente a *C. laevigata* (Vera-Caletti, 1999; Vera-Caletti y Wendt, 2001). Esta confusión taxonómica no sólo sucede con estas dos especies, ya que *C. laevigata* se ha confundido también con la especie *Calatola* sp. (Vera-Caletti, 1999), ya que en ambas tanto sus poblaciones como su área de distribución aún no están bien delimitadas no obstante, *Calatola* sp. puede diferenciarse por la ausencia de contrafuertes y el tiempo que tarda en cambiar de coloración el cual difiere por mucho de *C. laevigata*.

A partir de los análisis realizados y con los datos obtenidos en este trabajo se observa que hay una fuerte cohesión entre las especies de *Calatola*, compartiendo una misma historia evolutiva (Figuras 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11). Los datos morfológicos representaron el 100% de caracteres informativos, por otra lado, a pesar de que los genes *ndhF* y *matK* presentaron un número bajo de caracteres informativos; 118 sitios variables (13.56%)

para *matK*, 210 sitios variables (19.37%) para *ndhF* y 328 sitios variables (16.78%) para *ndhF-matK*, estos valores son suficientes para recuperar a las especies del género *Calatola* como monofilético.

) **Análisis morfológico**

En el análisis de parsimonia realizado al conjunto de caracteres morfológico (Figura 4 A y B), se recupera el grupo Plateoideae, donde se encuentran *Calatola* y *Platea* (Byng, *et al.*, 2014; Stull, *et al.*, 2015), con quien comparten siete sinapomorfías (Tabla 6 y caracteres 3, 4, 12, 26, 34 y 35) además de presentar un apoyo robusto en el análisis de remuestreo (BS= 91%). Bailey y Howard (1941a, b, c, d) fueron quienes por primera vez establecieron la relación de los géneros dentro de la familia Icacinaceae a partir de información morfológica de los elementos de los vasos, anatomía nodal y traqueidas, además, desde entonces ya se cuestionaba la relación con los géneros *Ottoschulzia* y *Oecopetalum* del continente americano, ya que la estructura floral de los géneros *Platea* y *Calatola* se considera avanzado (Heintzelman y Howard, 1948); en este mismo sentido, los análisis filogenéticos moleculares más recientes soportan esta relación (Kärehed, 2001; Byng, *et al.*, 2014; Stull, *et al.* 2015). Los resultados obtenidos apoyan la propuesta de autores previos en relación a que los géneros *Calatola* y *Platea* comprenden un grupo hermano destacando en este trabajo la ocurrencia de 4 caracteres sinapomórficos que soportan esta relación: ambos géneros son dioicos (carácter 3), forma del estigma (carácter 26), costillas primarias (carácter 34) y de sutura (carácter 35), además de tres

caracteres autopomorficos que permite separar a *Calatola*: tonalidad morada y/o azul en madera, hojas y fruto (Carácter 5), numero de partes florales masculinas (Carácter 14) y estigma de forma lacinado (carácter 26).

En el caso de las relaciones internas del género *Calatola*, la falta de resolución en el análisis filogenético de caracteres morfológicos puede deberse a la falta de información recabada y a que no se cuenta con las estructuras florales para la especie *Calatola* sp, además, de desconocer el tiempo de coloración de *C. microcarpa* (Duno y Janovec, 2013). En la base de los dos árboles (Figura 4 A y B) aparece una politomía que incluye a *C. laevigata*, *C. microcarpa*, *Calatola* sp. y un clado con tres especies soportado por dos sinapomorfías (Tabla 6, caracteres 35 y 36). Este último clado, incluye a las especies con crestas y costillas desarrolladas (*C. costaricensis* y *C. mollis*) y hojas maduras que conservan su pubescencia (Vera-Caletti, 1999). En el caso de *C. uxpanapensis* esta especie no conserva pubescencia en sus hojas maduras (Vera-Caletti, 1999) (Tabla 6, carácter 33) y presenta una gran plasticidad en el desarrollo de las crestas y costillas, desde individuos con crestas y costillas bien desarrolladas hasta individuos que no presentan las crestas, por lo cual esta especie fue por algún tiempo confundida con *C. laevigata* (carácter 33: ornamentación del endocarpo poco desarrollada) y *C. costaricensis* (carácter 33: ornamentación del endocarpo fuertemente desarrollada).

A pesar de la semejanza entre *Calatola* sp., *C. laevigata* y *C. microcarpa*, hay diferencias, tales como el tiempo de oxidación (carácter 5), número y forma de las flores femeninas y la maduración de las flores masculinas (carácter 15), este carácter descrito para *C. laevigata*, se pone en duda ya que puede corresponder a *Calatola* sp. En el caso del

tiempo de oxidación (Vera-Caletti, 1999), establece que dicho carácter fisiológico ayuda a diferenciar a estas especies en el campo; por ejemplo; en *Calatola* sp., el cambio se presenta el cambio después de los 5 minutos siendo este gradual hasta después de dos horas alcanza el color morado; en *C. laevigata* el cambio de color se da manera inmediata al corte, y en el caso *C. microcarpa* se desconoce este carácter. Estos resultados no son raros ya que los análisis morfológicos en plantas resultan en diversas ocasiones en árboles filogenéticos poco resueltos (con índice de consistencia y retención altos), tales como los encontrados en el género *Emmotum* (Duno y Fernández-Concha, 2011)

Durante los arboles resultantes, se observan diferentes topologías para cada uno de los métodos ya que los procesos de estimación son diferentes. El empleo de diferentes métodos nos permite comparar y nos ayuda a comprender como ha sido el proceso evolutivo que ha dado lugar a las secuencias que observamos (Abascal *et al.*, 2014).

) **Análisis molecular**

El empleo del marcador *matK* para análisis parsimonia (Figura 5) y bayesiano (figura 9) mostraron a *Platea* como el género hermano de *Calatola* con un apoyo robusto (BS=96%) y una alta probabilidad (PP=1), coinciden con los resultados previos (Kärehet, 2001; Byng *et al.*, 2014 y Stull *et al.*, 2015). A pesar de lo anterior, la resolución interna fue baja para ambos métodos, incluso menor a la arrojada con el análisis de parsimonia basada en caracteres morfológicos (Figura 4 A y B). En el análisis de parsimonia (Figura 5), los tres haplotipos de *C. costaricensis* no fueron recuperados como un grupo monofilético, lo que

puede sugerir un taxa diferente. Sin embargo, estos tres haplotipos corresponden a tres individuos de la misma población (Tabla 4 y 9), aunque por el método bayesiano son recuperados dentro del clado B junto con *C. uxpanapensis*, situación similar a la observada en dos haplotipos de *Calatola* sp. (Tabla 4 y 9). Tanto las politomías con la polifilías están relacionadas con una radiación reciente, tasa de mutación reducida y que tienen dispersión limitada de semillas, como la ha documentado Hollingsworth *et al.* (2011). La dificultad que presenta la región *matk* para diferenciar a las especies del género *Calatola*, se ha reportado en otros grupos taxonómicos, por ejemplo, en el género *Protea* (Chase *et al.*, 2007), y también ha mostrado problemas para distinguir algunas especies de la familia, Magnoliaceae (Shi *et al.*, 2000).

El marcador *NdhF* mostró para los análisis de parsimonia y bayesianos dos topologías diferentes, por un lado el árbol de parsimonia recupera al clado A como grupo hermano de *Calatola* con un apoyo robusto (BS=100 %) (Figura 6). En este clado A incluye tanto a miembros de la familia Icacinaceae como Metteniusaceae. No obstante, el soporte de este clado es muy bajo (BS=54%) así que este resultado no invalida necesariamente los resultados previos: morfología (Figura 4 y 5), *matK* (Figura 6) y estudios previos (Byng *et al.*, 2014; Stull *et al.*, 2015). En contraste, la topología del árbol bayesiano muestra nuevamente la separación de las familias Icacinaceae y Metteniusaceae (Figura 10) propuesta por Stull *et al.* (2015) con una probabilidad alta (PP=1). En este análisis el género *Cassinopsis* queda agrupado junto con las Metteniusaceae, aunque esto no se contrapone con los análisis previos (Byng, *et al.*, 2014 y Stull, *et al.*, 2015), ya que la probabilidad es muy baja (PP=0.15). Igual que en el análisis de parsimonia observamos

la formación de dos clados con una probabilidad baja (PP=0.55). En los dos tipos de análisis se recupera un clado B formado por las especies del género *Calatola* (BS=100) (PP=1). Igual que en el caso de los análisis con *matK* nuevamente se observan dos haplotipos de *Calatola* sp. son recuperados como parafiléticos, sugiriendo que son taxa diferentes, a pesar de formar parte de la misma población y de presentar las mismas características morfológicas (Tabla 4 y 9).

En el análisis de las secuencias concatenadas (*ndhF+matK*) por parsimonia (Figura 10) y bayesiano (Figura 11) presentan topologías diferentes, además, la resolución de las familias Icacinaceae y Metteniusaceae no es clara, por un lado en parsimonia la recuperación de dos grupos donde el clado A incluye tanto a miembros de la familia Icacinaceae como Metteniusaceae el cual es muy similar al del análisis de parsimonia con *ndhF* (Figura 7). Este clado A tiene un soporte relativamente bajo de 59 % (BS) e incluye a *Platea latifolia* que también tiene un apoyo de *bootstrap* bajo (BS=52 %). En los métodos bayesianos la topología agrupa a los géneros de la familia Metteniusaceae (Stull *et al.*, 2015), este grupo es recuperado con una probabilidad alta (PP=1), en el interior se tiene al clado A donde la relación de géneros *Platea* es más cercana con los géneros *Oecopetalum* y *Ottoschulzia*, que con el género *Calatola*, esto se puede deber a lo mencionado por Howard (1942). En relación a estructura del metaxilema y xilema secundario tienen una estructura traqueidal primitiva. En el caso de la resolución interna (clado B), los datos combinados tampoco producen una mejor resolución (Figura 7 y 11), en general los apoyos de *bootstrap* son muy bajos y las probabilidades bayesianas son

altas, aunque presenta una topología poco resuelta por la formación de politomías las cuales no dejan clara la relación interna del género *Calatola*.

Las relaciones observadas entre *Calatola* sp y *C. laevigata* se deben a la talla alcanzada por estas especies (30-35 metros de altura) forma de sus hojas glabrescente, endocarpo con la misma ornamentación, lo cual ha llevado que estas poblaciones sean designadas como una misma especie, a pesar de presentar diferencias morfológicas en los tallos. Por un lado, *C. laevigata* presenta contrafuertes muy desarrollados, tiempos de coloración corto (ya mencionado) y tamaños pequeños del endocarpo (Tabla 6), esto difiere de *Calatola* sp. que no presenta contrafuertes, tiempos de coloración largo y tamaño grande del endocarpo. En el siguiente clado, se recupera a *Calatola* sp., *C. costaricensis* y *C. uxpanapensis*, con una PP= 1, aunque la relación que se observa entre *C. uxpanapensis* con *Calatola* sp. y *C. costaricensis* es baja con un PP=0.62. En esta accesión, los taxa comparten la relación de presentar fruto de tallas mayores, presentándose en un promedio de rango latitudinal de (800 y 1200 msnm), exceptuando a *C. uxpanapensis* ya que este taxón se localiza en un rango latitudinal de (100-500 msnm). En este análisis los dos individuos de *Calatola* sp. nuevamente quedan en sitios distintos.

El análisis concatenado (*matK+ndhF+morfología*) para parsimonia reconoce dos grupos correspondientes a las familia Icacinaceae (Clado A), en este caso incluye miembros de *Icacina* y *Mappia*, el clado B está formado por miembros de la familia Metteniusaceae, el apoyo para ambos árboles es muy robusto (BS=100) (Figura 8). Esto coincide con la última propuesta taxonómica de Stull *et al.* (2015). En el clado B, hay una politomía un

taxón terminal (*Platea latifolia*) y dos clados; *Oecopetalum* y *Ottoschulzia* y luego *Calatola*. Aunque los análisis (morfológico y matK) coinciden en relacionar a *Platea* y *Calatola*,

Los géneros *Oecopetalum* y *Ottoschulzia* tienen un apoyo muy alto (BS=99) y comparten varias cosas en común, en especial con relación a caracteres florales (por ejemplo los pétalos con el nervio medio engrosado) pero también la anatomía de la madera tiene semejanzas con *Platea* (Bailey y Howard; 1941; Lens *et al.*, 2008). Nuevamente la información utilizada es insuficiente para resolver las relaciones de grupo hermano a nivel de géneros dentro de la familia Metteniusaceae. *Calatola* es monofilético con un apoyo de *bootstrap* de 100% coinciden con toda la información hasta la fecha acumulada. Tampoco la resolución interna de *Calatola* es suficiente pero al menos se reconocen dos clados uno formado por dos especies; *C. mollis* y *C. costaricensis* (Bs=52) y *C. laevigata* con soporte alto (BS=100). Estas dos especies del primer clado comparten caracteres morfológicos por ejemplo, sus hojas presentan pubescencia persistente, frutos grandes con costillas prominentes y, además, son las especies que se distribuyen más al norte de México junto con *C. laevigata*.

Por otro lado, que las regiones del cloroplasto no hayan podido separar a las especies del género *Calatola*, podría deberse a que la especiación ha sido muy reciente, o a que la tasa de mutación es muy lenta, y por lo tanto las secuencias pueden que sean compartidas entre las especies (Hollingworth 2011). Esto se ha reportado en especies del género *Araucaria*, e *Inga* en dónde se usó siete regiones del cloroplasto encontrando secuencias compartidas entre especies (Hollingworth *et al.*, 2009) Es posible que con

nuevos datos morfológicos (sobre todo los florales y el tiempo de cambio de color) y moleculares, como por ejemplo *rbcL* utilizados por Byng *et al.* (2014) y González *et al.* (2007) y *atpB* utilizado por González *et al.* (2007) incremente la resolución a nivel de género mientras que otros marcadores más variables incrementen la resolución a nivel de especie. Sin embargo, no fue así en este estudio utilizando el marcador *ndhF*, el cual fue empleado para las especies de *Mappia* (Angulo *et al.*, 2013). Hasta la fecha ningún otro marcador se ha utilizado en la familia, es posible que la inclusión de nuevos marcadores como el nuclear ITS o ETS pueda incrementar la resolución a nivel de especies. Estos marcadores se han utilizado extensamente en otras familias (Costeceae: *Costus* subgénero *Costus* y Solanaceae: *Solanum*) con buenos resultados (Volkov *et al.*, 2003; Kay *et al.*, 2005).

A lo largo de los análisis previos se han agrupado a *Calatola* y *Platea* como grupos hermanos entre los diferentes autores basándose en la posición de la antera y la anatomía de la madera (Bailey y Howard, 1941c; Kårehed, 2001), además de su condición dioica con flores indeterminadas (Howard, 1942), lo cual se corrobora con la morfología y el marcador *matK* tanto en los análisis de parsimonia como bayesianos, sin embargo con *ndhF*, *ndhF+matK* y *ndhF+matK+morfologico* no apoya esta relación, pero tampoco excluye que *Platea* sea el grupo hermano de *Calatola* como sugiere el análisis morfológico (Figura 4 A y B), *matK* (Figura 5) y estudios previos (Kårehed, 2001; Byng *et al.*, 2014; Stull *et al.*, 2015).

Finalmente, a pesar de que la resolución interna en el grupo no es clara, se reconocen seis especies ya que se encontraron diferencias entre los ejemplares tales como, el

tiempo de coloración para cada una de las especies, formas florales tanto masculina como femenina, tamaño de endocarpos (Vera-Caletti, 1999), altura alcanzada y la presencia de contrafuertes.

Patrones generales morfología y geografía

La geografía de *Platea* y *Calatola* ha llamado la atención de los sistemáticos desde Standley (1923) y Bailey y Howard (1941a, b, c, d). El primero es un género asiático y el segundo un género americano. La estrecha relación de ambos, sugiere una relación geográfica que debemos asumir que es previa a la separación de los grandes continentes al menos antes del Cretácico temprano (120 millones de años) si la relación espacial es a través del Hemisferio Sur. En el caso del hemisferio norte, se puede asociar a tiempos más recientes geológicamente hablando, ya que hay fósiles de la familia Icacinaceae para el Grupo Clayborne de Tennessee y Mississippi (Eoceno) relacionados con géneros asiáticos (Stull *et al.*, 2011). Aunque no se realizó un análisis biogeográfico todo parece indicar que el origen del género es el Hemisferio Norte.

Los árboles filogenéticos son esquemas de relaciones de grupo hermano (ancestro-descendiente) que muestran algún tipo de patrón; morfológico, geográfico o una combinación de ambos. Por mencionar algunos ejemplos, está el caso del análisis filogenético de *Emmotum* (Duno y Fernández-Concha, 2011); un género de 13 especies distribuido exclusivamente en el norte de Sudamérica hasta Brasil y Bolivia presenta dos secciones con diferencias morfológicas (Engler, 1896) y geográficas (Duno y Fernández-

Concha, 2011). El género incluye dos secciones: *E.* sección *Emmotum* con filamentos basalmente dilatados, apicalmente atenuados, anteras oblonga-lineares; conectivo ovado y ovario con estilo largo, mientras que *E.* sección *Brevistyla* tiene filamentos dilatados en la base y en el ápice, anteras oblongas, conectivos elíptico, prolongado y ovario con estilo corto. La primera sección se distribuye fundamentalmente en el Escudo de Guayana y la segunda en la cuenca Amazónica hasta la mata Atlántica de Brasil. La filogenia basada en caracteres morfológicos refleja una dicotomía principal entre ambos linajes (Duno y Fernández-Concha, 2011). Otro ejemplo, es la filogenia de *Gomphandra* Wall. ex Lindl. basada en caracteres moleculares (*TrnL-F*, *matk*). Este género Paleotropical incluye cerca de 60 especies y este análisis muestra resultados pobres (solo 8 especies) reconoce dos clados, uno para las taxa con inflorescencia terminal y otro para taxa con inflorescencias laterales (Schori, 2010). En el caso de los patrones morfológicos al interior del género *Calatola* el más evidente tiene que ver con la morfología general del fruto. Existen dos grupos; taxa con frutos grandes, costilla primaria y costillas secundarias prominentes y especies con frutos pequeños, la costilla primaria y las costillas secundarias apenas visibles. Una posibilidad es que la topología de los árboles de los análisis filogenéticos (Figuras 4-12) mostraran estos dos linajes. Sin embargo los resultados no reflejan esta dicotomía lo que sugiere que la transformación de un tipo de fruto a otro se ha dado más de una vez en la historia del grupo. Nuevamente el muestreo es incompleto para una conclusión definitiva al respecto.

Los resultados obtenidos en este análisis no muestran un patrón morfológicos claro, pero si un patrón geográfico regional. Las razones posiblemente son dos: 1) un muestreo

asimétrico, entre los taxones o poblaciones del hemisferio norte y del hemisferio Sur, el muestreo realizado se basó fundamentalmente en plantas de México y 2) datos insuficientes, utilizamos caracteres morfológicos y dos secuencias cloroplastos (*matK* y *ndhF*). Ninguna de las tres fuentes de información arrojó árboles completamente resueltos (Figuras 12).

En relación a la geografía, *Calatola* se distribuye desde México y Centro América hasta Sudamérica, Brasil y Bolivia, los árboles filogenéticos podrían alternativamente mostrar un patrón geográfico y no morfológico, en este caso un linaje para las taxa del Hemisferio sur y otro para las taxa del Hemisferio norte. Lamentablemente no se incluyeron muestras del hemisferio sur con la excepción de *Calatola microcarpa*. Sin embargo, en el caso de las taxa mexicanas si se reconoce un patrón geográfico, por un lado las especies de la vertiente del Pacífico: *C. laevigata* y *Calatola* sp. y por otro lado los taxa de la vertiente Atlántica con *C. uxpanapensis* y *C. costaricensis* (Figura 10 y 11). Existen varios estudios que demuestran que el componente geográfico tiene más peso que la morfología, como es el caso del género *Aechmea* (Bromeliaceae) (Sass y Specht, 2010).

Otras preguntas en relación a la distribución del género, origen y fecha no pueden ser abordadas con este análisis. Sin embargo, en el caso de la familia Icacinaceae, estrechamente relacionada con Metteniusaceae (Figura 1, Stull *et al.* 2015), existe un extenso registro fósil correspondiente a la flora boreotropical del Eoceno en latitudes muy altas (50° N) en Norte América y Europa (Stull *et al.*, 2011; 2016; Allen *et al.*, 2015). Para la familia Metteniusaceae, el registro es muy escaso pero coincide con esta flora boreotropical del Eoceno en Europa (Collinson *et al.*, 2012). Esto podría sugerir que el

origen de *Calatola*, es el hemisferio Norte y que posteriormente migro hacia Sudamérica. Tradicionalmente, dos taxa con distribución Amfiatlántica, como *Calatola* y *Platea* relacionadas espacialmente a un origen Godwánico (hemisferio sur), pero parece no ser el caso.

Conclusiones

- 1.- Los marcadores empleados (*matK* y *ndhF*) permiten recuperar al género como monofilético.
- 2.- Los caracteres morfológicos con mayor soporte para determinar a las especies son: flores masculinas y femeninas, tamaño y forma de la reticulación de endocarpos, además del fisiológico que es el tiempo de cambio de coloración.
- 3.- Se reconoce dos clados que corresponde a cada una de las familias. *Calatola* quedando como miembro de la familia Metteniusaceae

Prospectivas.

Calatola sp. es posiblemente una nueva especies para la ciencia pero no es posible su descripción formal hasta contar con material completo de flores masculinas y femeninas. Esta especie ya fue reconocida por Vera-Caletti (1999) como *Calatola wendtii*, pero no descrita formalmente. Por lo cual, este nombre no tiene validez nomenclatural ya que no

cumple con los requisitos del Código Internacional De Nomenclatura Botánica (Artículos 29 y 30) (McNeill *et al.*, 2011).

Por último, un análisis más completo requiere de taxa de Centroamérica y Sudamérica. Aunque Duno y Janovec (2013) reconocieron sólo dos especies para Sudamérica es evidente que *C. costaricensis* es una especie polimórfica y que los sinónimos actuales *Calatola columbiana*, *C. pastazana* y *C. venezolana* sean especies correctas. Incluso es posible que algunas poblaciones sudamericanas, en especial de los Andes de Colombia, requieran nuevos nombres. Además será necesario incluir uno o más marcadores moleculares nuevos para incrementar la resolución de clado *Calatola*

LITERATURA CITADA

- Abascal, F., Irisarri, I. y Zardoya, R. 2014. Bioinformática con ñ. Capítulo 3. Filogenia y Evolución Molecular. Vol. 1 Pp. 57-83
- Allen, S. E., Stull, G. W. and Manchester, R. S. 2015. Icacinaceae from the Eocene of western North America. *American Journal of Botany* 102: 725–744.
- Angulo, D.F., Duno de Stefano, R., & Stull, G.W. 2013. Systematics of *Mappia* (Icacinaceae), an endemic genus of tropical America. *Phytotaxa* 116: 1–18.
- APG [Angiosperm Phylogeny Group]. 1998. An ordinal classification for the families of the flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 85: 531–553.
- Baas, P. 1974. Stomatal types in Icacinaceae. Additional observations on genera outside Malesia. *Acta botanica neerlandica*, 23, 193-200.
- Bailey, I.W. & Howard, R.A. 1941a. The comparative morphology of the Icacinaceae I. Anatomy of the node and internode. *Journal of the Arnold Arboretum* 22: 125–132.
- Bailey, I.W. & Howard, R.A. 1941b. The comparative morphology of the Icacinaceae II. Vessels. *Journal of the Arnold Arboretum* 22: 171–187.
- Bailey, I.W. & Howard, R.A. 1941c. The comparative morphology of the Icacinaceae III. Imperforate tracheary elements and xylem parenchyma. *Journal of the Arnold Arboretum* 22: 432–442.

- Bailey, I.W. & Howard, R.A. 1941d. The comparative morphology of the Icacinaceae IV. Rays and the secondary xylem. *Journal of the Arnold Arboretum* 22: 556–568.
- Byng, J.W., Bernardini, B., Joseph, J.A., Chase, M.W., Utteridge, T.M.A. 2014. Phylogenetic relationships of Icacinaceae focusing on the vining genera. *Botanical Journal of the Linnean Society* 176: 277–294.
- Cadavid, S.I.C. 2013. Tipificación molecular y separación de especies de plantas del subgénero *Leptostemonum* (Solanaceae: *Solanum*), usando regiones barcode. Tesis Magister en Ciencias Biotecnología. Facultad de Ciencias, Departamento Biociencias. Grupo de Investigación en Sistemática Molecular. Universidad Nacional de Colombia. 189 pp.
- Cano, A.L.M., Vázquez, T.M., Jácome, C.E. 1997. Flora Medicinal de Veracruz. 1. Inventario etnobotánico, Universidad Veracruzana, Xalapa, México. 593 pp.
- Collinson, M.E., Manchester, S.R., Wilde, V. 2012. Fossil Fruits and Seeds of the Middle Eocene Messel biota, Germany. *Abhandlungen der Senckenbergischen Gesellschaft Naturforschenden* 570: 1-249
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772.
- Duno de Stefano, R. 2011. Flora Mesoamericana, Volumen 3 (2), Icacinaceae s.l., pp. 24. (publicado en el sitio internet de la Flora Mesoamericana, 19 dic. 2011).

- Duno de Stefano, R. & Fernández-Concha G. C. 2011. Morphology-inferred phylogeny and a revision of the genus *Emmotum* (Icacinaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 98: 1–27.
- Duno de Stefano, R., Janovec, J.P. Can, L.L. 2013. Three decades to connect the sexes: *Calatola microcarpa* (Icacinaceae), a new species from the Southwestern Amazon. *Phytotaxa* 124: 43-49.
- Echevarria-Machado, I., Lucila, A., Sánchez, C., Hernández-Zepeda, C., Rivera-Madrid, R., Moreno-Valenzuela, O.A., 2005. A simple and efficient method for isolation of DNA. In high mucilaginous plant tissues. *Molecular Biotechnology*. 31: 129–135
- Eguiarte, L.E., Souza V., Aguirre, X. 2007. *Ecología Molecular*, Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Primera edición México. 517-537.
- Endara, L., Williams, N.H., Whitten, W.M. 2011 Filogenia molecular preliminar de *Scaphosepalum* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Lankesteriana* 11: 245–252.
- Engler, G.A. 1893. Icacinaceae. In: Engler, A. & Prantl, K. [eds.], 1896. *Die Natürlichen Pflanzenfamilien III* (5). Engelmann, Leipzig, 233–257, 459–460 pp.
- Galtier, N., Gouy, M. and Gautier, C. 1996. SeaView and Phylo_win, two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Applic. Biosci.*, 12, 543-548.

- Givnish, T.J., Pier, J.C., Graham, S.W., McPherson, M.A., Prince, L.M., Patterson, T.B., Rai, H.S., Roalson, E.R., Evans, T.M., Hahn, W.J., Millam, K.C., Meerow, A.W., Molvray, M., Kores, P., O'Brien, H.E., Kress, W.J., Hall J., Sytsma, K.J. 2005. Repeated evolution of net venation and fleshy fruits among monocots in shaded habitats confirms a priori predictions: evidence from an *ndhF* phylogeny. *Proceeding of the Royal Society of London, Series B* 272: 1481-1490.
- Goloboff, P, Farris, J., Nixon, K. 2008. TNT, a free program for phylogeny analysis. *Cladistics* 24: 774-786.
- González, F., Betancur J., Maurin O., Freudenstein, J.V., Chase, M.W. 2007. Metteniusaceae, an early-diverging family in the lamiid clade. *Taxon* 56: 795-800.
- Gutiérrez, B.C., 1994. Icacinaceae. *Flora de Veracruz*. Instituto de Ecología, A.C. fascículo 80. 16pp.
- Gutiérrez B.C.; Duno de Stéfano, R. 2014. LA FAMILIA ICACINACEAE EN MEXICO. *Foresta Veracruzana*, vol. 16, núm. 2, pp. 11-22
- Heintzelman Jr, C.E. & Howard, R.A. 1948. The comparative morphology of the Icacinaceae. V. The pubescence and the crystals. *American Journal of Botany*, 42-52.

- Hernández-Urban, H.A. 2013. Revisión taxonómica de la Familia Icacinaceae Mier. Para México, tesis de Licenciatura, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, D.F. 107 pp.
- Hilu, K.W., Borsch, T., Müller, K., Soltis, D.E., Soltis, P.S., Savolainen, V., Chase, M.W., Powell, M.P., Alice, L.A., Evans, R., 2003. Angiosperm phylogeny based on matK sequence information. *American Journal of Botany* 90: 1758-1776.
- Hollingsworth, P.M., Graham, S.W., Little, D.P., 2011. Choosing and Using a Plant DNA Barcode PLoS ONE 6, e19254.
- Howard, R. A. 1942. Studies of the Icacinaceae III. A Revision of *Emmotum*. *Journal of the Arnold Arboretum* 23:479-494.
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- Kay, K.M., Reeves, P.A., Olmstead, R.G., Schemske, D.W. 2005. Rapid speciation and the evolution of hummingbird pollination in neotropical *Costus* subgenus *Costus* (Costaceae): evidence from nrDNA ITS and ETS sequences. *American Journal of Botany*, 92, 1899-1910.
- Kärehed, J. 2001. Multiple origin of the tropical forest tree family Icacinaceae. *American Journal of Botany* 88: 2259–2274.

- Kärehed, J. 2002. Evolutionary Studies in Asterids Emphasising Euasterids II. Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy in Systematic Botany. Uppsala University. 49 pp.
- Kim, K.J. & Jansen R.K. 1995. *NdhF* sequence evolution and the major clades in the sunflower family. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 92: 10379–10383.
- Lens, F., Kärehed, J., Baas, P., Jansen, S., Rabaey, D., Huysmans, S., Hamann, T., Smets, E. 2008. The wood anatomy of the polyphyletic Icacinaceae s.l., and their relationships within asterids. *Taxon* 57: 525–552.
- Lozano-Contreras, G., y de Lozano, N. B. 1988. Metteniusaceae. *Flora de Colombia*, 11: 9-46.
- McNeill J., Barrie F.R., Buck W.R., et al. (eds). 2011. International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code) adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011. (Regnum Vegetabile No. 154.) Königsten: Koeltz Scientific Books, 2012.
- Martínez, M. *Plantas Medicinales de México*. 2ed. México, S.E., 628 pp.
- Morrone, J.J. 2001. *Biogeografía de América Latina y el Caribe*. M&T–Manuales & Tesis SEA, vol. 3. Zaragoza, 148 pp.
- Nixon, K.C. 2002. Winclada ver. 1.00.08 publicado por el autor, Ithaca, NY.

- Olmstead, R.G. & Sweere, J.A. 1994. Combining data in phylogenetic systematics: An empirical approach using three molecular data sets in the Solanaceae. *Systematic Biology* 43: 467–481.
- Patwardhan A., Ray S., Roy A. 2014. Molecular Markers in Phylogenetic Studies A Review. *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology* 2: 131.
- Reveal, J.L. 1993. New ordinal names for extant vascular plants. *Phytologia* 74: 173–177.
- Sass, C. & Specht, C.D. 2010. Phylogenetic estimation of the core Bromelioids with an emphasis on the genus *Aechmea* (Bromeliaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 559–571
- Savolainen, V., Manene, J.F., Douzary, E., Spichiger, R. 1994. Molecular phylogeny of families related to Celastrales based on rbc 5' flanking sequences. *Molecular Phylogenetics & Evolution* 3: 27–37 pp
- Selvaraj, D., Sarma, R.K., Sathishkumar, R., 2008. Phylogenetic analysis of chloroplast matK gene from Zingiberaceae for plant DNA barcoding. *Bioinformation* 3: 24 pp.
- Sleumer, H. 1969. Materials towards the knowledge of the Icacinaceae of Asia, Malesia, and adjacent areas. *Blumea* 17: 181–264 pp.
- Soltis, D.E. & Soltis P.S. 1998. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. In Soltis, D.E., Soltis, P.S. and Doyle J.J. [eds.], *Molecular*

systematics of plants II, 1–42 pp. Kluwer Academic Publishers, Boston, Massachusetts, USA

Standley, P.C. 1923 Trees and shrubs of México (Oxalidaceae–Turneraceae). Contributions from the United States National Herbarium 23: 517–848.

Standley P.C., & Steyermark, J.A. 1949. Flora of Guatemala, Fieldiana: Botany. Volume 24, part VI: 225-229 pp.

Schori, M. 2010. A Systematic Revision of *Gomphrandia* (Stemonuraceae). Tesis de doctorado, College of Arts and Sciences of Ohio University.

Stull, G. W., Adams, N. F., Manchester, S. R., Sykes, D., Collinson, M. E. 2016. Revision of Icacinaceae from the Early Eocene London Clay flora based on X-ray micro-CT. Botany 94: 713–745

Stull, G.W., Herrera, F., Manchester, S.R., Jaramillo, C., Tiffney, B.H. 2012. Fruits of an “Old World” tribe (Phytocreneae; Icacinaceae) from the Paleogene of North and South America. Systematic Botany 37: 784–794 pp.

Stull, G.W., Moore B.R., Manchester, S.R. 2011. Fruits of Icacinaceae from the Eocene of Southeastern North America and Their Biogeographic Implications. International Journal of Plant Sciences, Vol. 172, 7, 935-947 pp

- Stull, G.W., de Stefano, R.D., Soltis, D.E., Soltis, P.S. 2015. Resolving basal lamiid phylogeny and the circumscription of Icacinaceae with a plastome-scale data set. *American Journal of Botany* 102: 1–20.
- Swofford, D. L. 1999. *Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods)* PAUP* 4.0. Sinauer, Sunderland.
- Takhtaja, A. 1997. *Diversity and classification of flowering plants*. Columbia University Press, New York, New York, USA. 643 pp.
- Van Staveren, M.G.C. & Baas, P. 1973. Epidermal leaf characters of the Malesian Icacinaceae. *Acta botanica neerlandica*, 22: 329 - 359
- Velázquez, L.P.A., Martínez, M.D.C.A., Romero, A.C. 2014. Extracción y purificación de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. Semarnat, INECC, UAM-1. 1-25 pp.
- Vera-Caletti P. 1999. Revisión del género *Calatola* (Icacinaceae) en México, tesis de Maestría en Ciencias, Colegio de Postgraduados, Montecillos, Texcoco, Edo. De México. 107 pp.
- Vera-Caletti, P. & Wendt, T. 2001. Una nueva especie de *Calatola* (Icacinaceae) de México y Centroamérica. *Acta Botánica Mexicana* 54: 39-49.

Volkov, R.A., Komarova, N.Y., Panchuk, I.I., Hemleben, V. 2003. Molecular evolution of rDNA external transcribed spacer and phylogeny of sect. *Petota* (genus *Solanum*). *Molecular phylogenetics and evolution*, 29: 187-202.

Yu, J., Xue, J-H., Zhou, S-L. 2011. New universal *matK* primers for DNA barcoding angiosperms. *Journal of Systematics and Evolution* 49: 176–181.

Anexo 1

Clave para la familia Metteniusaceae en México y Centro América

1. Plantas generalmente con todas sus estructuras aéreas cubiertas de pelos lepidoto-estrellados; pecíolos ligeramente alados; flores con los pétalos unidos formando un tubo hasta la mitad de su longitud, el ápice prolongado en un apéndice en forma de mazo.

..... *Dendrobangia*

1'. Plantas indumentadas pero nunca con pelos lepidoto-estrellados; pecíolos nunca alados; flores con los pétalos libres o solo aglutinados cerca de la base, el ápice nunca prolongado. 2

2. Plantas dioicas; inflorescencia masculina en espigas, inflorescencia femenina en monocasios y dicasios; fruto usualmente de 5 cm de largo. *Calatola*

2'. Plantas monoicas; inflorescencias no espigadas; fruto usualmente menor de 3 cm de largo. 3

3. Flores largas, 2-6 cm de largo; cáliz acrescente en fructificación, corola unida en la base formando un tubo hasta un 1/3 de su longitud, los lóbulos reflexos, casi torcidos; anteras largas moniliformes *Metteniusa*

3'. Flores pequeñas, menos de 1 cm de largo, cáliz no acrescente en fructificación, si acrescente entonces corola libre desde la base, corola apenas unida en la base, ligeramente reflexos; anteras cortas sagitadas. 4

4. Inflorescencias cimbras dicotómicas ramificadas con numerosas flores; pétalos libres; frutos con el cáliz acrescente, ovoides y ligeramente comprimidos en el eje longitudinal y con una ligera cresta en la sutura o unión de los carpelos. *Oecopetalum*

4'. Inflorescencias panículas muy reducidas con 1-3 flores; pétalos aglutinados en la base; frutos sin el cáliz acrescente, ovoides. *Ottoschulzia*

Sinopsis taxonómica del género *Calatola*

Calatola Standl., Contrib. U. S. Nat Herb. 23:688. 1923

Árboles dioicos hasta 30 m. y dap hasta 40 (80) cm. Corteza escamosa, brecha de la corteza laminada, olor característico ligero algo a jícama; la brecha tornándose de un color azul en pocos minutos o unas horas. Ramas jóvenes cilíndricas, generalmente glabras o puberulentas, rara vez densamente pilosas; indumento formado por pelos simples, diminutos, icacináceos, a veces ligeramente malpigiáceos, deciduos, rara vez persistentes. Hojas membranáceas a subcoriáceas, generalmente se tornan negras al secarse; pecíolo profundamente asurcado, sin una línea de abscisión nítida en la base,

glabro, puberulento o densamente piloso; lámina variadamente ovada, oblonga, elíptica y obovada, puberulenta hasta densamente pilosa en el envés, a veces restringida a lo largo del nervio principal y en la base (axilas) de los nervios secundarios, glabra en el haz, el ápice agudo a acuminado, los márgenes enteros, a veces dentados, la base atenuada, aguda o redondeada; nervación penninervia, broquidódroma, el nervio principal visible en el envés, los nervios secundarios alternos, visibles. Inflorescencias estaminadas generalmente axilares, a veces extra-axilares, espiciformes; eje, brácteas y bractéolas seríceo-pilosas o puberulentas. Inflorescencias pistiladas axilares, monocasios con 2(-3) flores o dicasios simples o compuestos, con 4-6(-10) flores; eje, brácteas y bractéolas seríceo-pilosas o puberulentas; brácteas 1 por flor. Flores estaminadas tetrámeras, zigomorfas, articuladas en la base; pedicelos reducidos; cáliz con sépalos apenas unidos en la base, ovados, ligeramente desiguales, cóncavos, pilosos externamente, glabros internamente, ligeramente carnosos, el ápice agudo, a veces ligeramente ciliado; corola con pétalos verdosos, apenas unidos en la base, ovados, cóncavos, pilosos externamente, especialmente a lo largo del nervio principal, a veces glabros o pilosos internamente, el ápice agudo, prolongado en una pequeña punta; estambres con los filamentos cilíndricos, rectos, glabros y reducidos, las anteras basifijas, el conectivo linear, poco desarrollado, a veces prolongado en una pequeña punta; sin disco; pistilo abortivo. Flores pistiladas tetrámeras, zigomorfas, articuladas en la base; cáliz con sépalos apenas unidos en la base, ovados, ligeramente desiguales, cóncavos, densamente pilosos externamente, glabros internamente, ligeramente carnosos, el ápice agudo, ligeramente ciliado; corola con pétalos cremosos o verde-cremosos, 1 o 2 bien desarrollados y 2 mal formados o ausentes, apenas unidos en la base, ovados, cóncavos,

ligeramente carnosos, diminutamente unguiculados en la base, caedizos, pilosos externamente, glabros internamente; estambres abortivos; sin disco; pistilo hasta 1 mm, el ovario cilíndrico, densamente piloso, 1-locular, el estilo apenas diferenciado, el estigma laciniado. Frutos globosos, obovoides o elípticos, generalmente glabros, rara vez densamente seríceo-pilosos; exocarpo delgado, verdoso cuando inmaduro, que se torna negrozco cuando madura; mesocarpo carnosos; endocarpo duro o leñoso, con una cresta ecuatorial crenada, tres o cuatro costillas prominentes y otras secundarias, variando de poco evidentes hasta muy prominentes; semillas solitarias.

Calatola es un género el cual se distribuye en México, Centroamérica y la región norte de Suramérica hasta Brasil y Bolivia, en México hay 5 especies (Vera-Caletti y Wendt, 2001).

Clave para las especies de *Calatola* para México.

1. Envés de las hojas y frutos densamente tomentoso-amarillento. *C. mollis*
- 1'. Envés de las hojas glabro o puberulento sólo en las axilas de las venas laterales; frutos glabros o ligeramente puberulentos. 2
2. Láminas de las hojas 11-35 cm largo, elípticas a oblongo-elípticas; el envés con pelos en las axilas de las venas laterales, generalmente muy conspicuos; espigas estaminadas 9-23 cm largo. *C. costaricensis*
- 2'. Láminas de las hojas 6.5-32 cm largo, elípticas, estrechamente elípticas, ovado elípticas, a oblongo-elípticas, glabras en ambas caras; espigas estaminadas 2-12.5 cm largo. 3

3. Endocarpo con crestas y costillas fuertemente marcadas, delgados o gruesos, con bordes redondéados. Hojas maduras glabras 10-32 cm largo, sin mechones de pelos en las axilas. *C. uxpanapensis*
- 3'. Endocarpo sin crestas y costillas fuertemente marcadas. Hojas maduras glabras, sin mechones de pelos en las axilas..... 4
4. Endocarpo con costillas inconspicua; frutos 2-3.5 cm largo; hojas 10-22 cm largo, elípticas a ovado-elípticas; espigas estaminadas 2-6 cm largo. *C. laevigata*
- 4'. Endocarpo con costillas conspicuas; frutos 4-5 cm largo; hojas 10-28 cm largo, elípticas a ovado-elípticas; espigas estaminadas 2-6 cm largo. *Calatola* sp.

***Calatola costaricensis* Standl**, J. Wash. Acad. Sci. 16: 416 (1926). Costa Rica, Standley y Valerio 50000 (US!, Holotipo).

Árbol de 20 metros de altura; tiempo de coloración después del corte 5 minutos. Lámina de la hoja con el envés pubescente solo en la axila de entre la primera y segunda vena. Inflorescencia espigas () con las flores más jóvenes en el ápice, monocacios () generalmente tres flores pediceladas; endocarpo con crestas y costillas conspicuas.

Nombres comunes. México: azulillo, bone, calatola, jicarilla, mata caballo, nuez, nuez de montaña onmachimte, zapote de mono (Chiapas y Veracruz); Centroamérica: duraznillo, palo de papa, palo azul o repe (Costa rica); haguey (Perú); lirio, azucarina, coquito (Nicaragua).

Distribución y ecología. En México se encuentra en los estados de Chiapas, Oaxaca, Veracruz, con elevaciones de 800-2200 msnm También se ha reportado en Centroamérica y Sudamérica. En los tipos de vegetación de bosque tropical caducifolio, perennifolio y bosque mesófilo de montaña. Floración, enero–abril y fructificación, enero–noviembre.

***Calatola mollis* Standl**, *Contr. U.S. Natl. Herb.* 23:689 (1923). Tipo: México. Puebla: Zacatlán, *F. Salazar s.n.*, 3 abril 1913 (US, holotipo).

Árbol de 15 metros de altura; tiempo de coloración inmediata después del corte. Láminas de la hoja con el envés pubescente. Inflorescencia espigas () con maduración simultánea de las flores, monocacios () con una o dos flores sésiles; endocarpo con crestas y costillas conspicuas.

Nombres comunes. México: calatola, calatolano, cola de rata, Chicaro, duraznillo, durazno de mono, jicarilla, mata caballo, nuez de calatola, nuez de montaña, palo tinta y zapote de mono.

Distribución y ecología. En México se encuentra en los estados de Chiapas, Puebla, Oaxaca, Veracruz, con elevaciones de 500-1700 msnm También se ha reportado en Centroamérica. En los tipos de vegetación de bosque tropical perennifolio y bosque mesófilo de montaña. Floración, febrero-abril y fructificación, agosto-octubre, también se reportan frutos en Enero

Calatola uxpanapensis P. Vera & T. Wendt, Acta Bot. Mex. 54: 40 (2001). México, Veracruz, Wendt et al. 4731 (MEXU, Holotipo).

Árboles de 25 (30) metros de altura, tiempo de coloración después de corte 10 minutos. Lamina de la hoja con el envés glabras; inflorescencia espigas () con maduración de las flores simultánea, monocacios () con tres hasta seis flores pediceladas; endocarpo con crestas y costillas delgadas o gruesos, con bordes redondéalos conspicuas o inconspicuas.

Nombres comunes. México: nuez.

Distribución y ecología. En México se encuentra en el estado de Veracruz, con elevaciones de 100-900 msnm También se ha reportado en Centroamérica. En los tipos de vegetación de bosque tropical caducifolio, perennifolio y bosque mesófilo de montaña. Floración, febrero-mayo y fructificación, agosto-febrero

Calatola laevigata Standl., Contr. U.S. Natl. Herb. 23: 689 (1923). México, Oaxaca, cafetal San Carlos, Cerro Espino, Reko 3440 (US, Holotipo).

Árbol de 35 metros de altura, tiempo de coloración inmediatamente después del corte. Lamina con el envés glabras; Inflorescencia espigas () con mucha variación en la maduración de las flores, monocacios () con cuatro y hasta diez flores pediceladas; endocarpo sin crestas y costillas inconspicuas.

Nombres comunes. México: calatolazno, nuez de calatola, palo de tinta y palo azul (Jalisco).

Distribución y ecología. En México se encuentra en el estado de Jalisco, con elevaciones de 900 a 1900 msnm. En los tipos de vegetación de bosque tropical caducifolio, perennifolio y bosque mesófilo de montaña. Floración, marzo y fructificación, julio.

Es posible que los caracteres de la descripción de esta especie este construida en combinación con *Calatola* sp.

***Calatola* sp.**

Árbol de 35 metros de altura, tiempo de coloración después de corte 10 minutos. Lamina con el envés glabras; espigas () desconocida, monocacios () desconocido; endocarpo sin crestas y costillas conspicuas.

Nombres comunes. México: aguacatillo y chanoj.

Distribución y ecología. En México se encuentra en los estados de Oaxaca y Chiapas con elevaciones de 950-2300 msnm. En el tipo de vegetación bosque mesófilo de montaña. Floración, desconocido y fructificación, febrero-mayo. Para esta especie hasta la fecha ha sido confundida con *C. leavigata* igual que como sucedió con *C. uxpanapensis* (Vera-Caletti & Wendt, 2001), debido a ello es muy probable que de acuerdo a la información previa y a las observaciones propias los periodos de floración y fructificación

son los reportados para *C. leavigata* para los estado de Oaxaca y Chiapas, por lo que los periodos son los siguientes: Floración, en Oaxaca y Chiapas, Septiembre-Diciembre, y fructificación, en Oaxaca y Chiapas, diciembre-marzo.

Anexo 2

Protocolos de extracción de ADN

Protocolo de extracción de ADN kit de Qiagen 2011

1. Pesar 100mg de material.
2. Marcar tubos (por triplicado).
3. Marcar los tubos con columnas de membrana (moradas y blancas).
4. Poner el baño maría a 65°C.
5. Macerar las muestras con Nitrógeno líquido las veces que sea necesario (2 o 3 veces).
6. Agregar 400µl - 650µl del buffer AP1 y seguir macerando y colocar en un tubo sin seguro.
7. Incubar las muestras en baño maría por 10 min a 65°C (invertir el tubo periódicamente 2 o 3 veces).
8. Añadir 130µl de buffer P3, mezclar e incubar 5 min en hielo.
9. Centrifugar 5 min a 14000 rpm
10. Recoger el sobrenadante y colocar en la columna mini spin (las moradas de membrana), centrifugar 2 min a 14000 rpm
11. Transferir todo el contenido en un nuevo tubo sin seguro sin perturbar el pellet, añadir 1.5 volumen de buffer AW1 y mezclar pipeteando (la cantidad dependerá del volumen de muestra en el tubo multiplicado por 1.5).

12. Tomar 650µl de cada muestra y colocar en la columna DNeasy mini spin (tubos de membrana blancos).
13. Centrifugar por 1 min a 8000 rpm.
14. Descargar el contenido y centrifugar nuevamente (si quedo muestra del tubo) por 1 min a 8000 rpm.
15. Tirar el sobrenadante y conservar la columna de membrana.
16. Colocar la columna de membrana en un nuevo tubo sin tapa y añadir 500µl del buffer AW2 y centrifugar por 1 min a 8000 rpm.
17. Tirar el sobrenadante.
18. Añadir a esta misma columna otros 500µl de AW2 y centrifugar 2 min a 14000 rpm.
19. Tirar el sobrenadante y el tubo.
20. Transferir la columna en un nuevo tubo con tapa y añadir 50µl de AE (directamente a la membrana). Incubar 5 min a temperatura ambiente.
21. Centrifugar por 1 min a 8000 rpm.
22. Agregar nuevamente 50µl de AE y centrifugar por 1 min a 8000 rpm
23. El resultado es de aproximadamente 100 µl de ADN.

Continuación del anexo 2

Protocolo de "sílica"

- 1.- Encender el baño maría a 65°C
- 2.- Preparar el buffer de extracción (100 mM de Tris-HCl pH8, 50 mM de EDTA, 500 mM de NaCl) añadir 0.75 µl de βmercaptoetanol por cada 1ml.
- 3.- Macerar aprox. 0.5 gr de tejido con nitrógeno líquido, adicionar una pizca de PVP-40, (por cada muestra).
- 4.- Añadir 1 ml de Buffer de extracción.
- 5.- Adicionar 100 µl de SDS al 20%, mezclar por vortex hasta homogeneizar e incubar a 65°C por 10 min.
- 6.- Añadir 500 µl de acetato de potasio 5M, mezclar por inmersión e incubar en hielo por 1 hora.
- 7.- Centrifugar a 13000 RPM por 21 min.
- 8.- Recuperar 1.4 ml de sobrenadante sin llevarse tejido vegetal, colocar en tubos de 1.5 ml y centrifugar a 13000 RPM por 10 min.

9.- Recuperar todo el sobrenadante sin llevar tejido vegetal si se forma en el tubo de 1.5 ml y añadir 300 µl de sílica (agitar manualmente por 5 min nota: el tubo donde se encuentra la sílica no se agita con fuerza).

10.- Centrifugar por 6 min. A 12000 RPM (Descartar el sobrenadante sin tirar el pellet).

11.- Lavar el pellet con etanol al 96% centrifugar a 12000 por 2 min.

12.- Dejar secar el pellet a temperatura ambiente por 20-30 min.

13.- Para la dilución de la pastilla se coloca un volumen inicial de 55 µl de agua up. Dejar hidratar por 5 min. y resuspender luego centrifugar a 13000 RPM por 4 min.

14.- Recuperar 52 µl de sobrenadante sin tocar el pellet, y centrifugar a 13000 RPM por 4 min.

15.- Recuperar 48 µl de sobrenadante y almacenar a -20°C (ADN).

Preparación de la sílica.

Pesar 2 gr de Dióxido de silicona adicionar 15 ml de agua up, centrifugar a 1000 RPM por 2 min. Tirar el sobrenadante, adicionar 15 ml de agua up. Centrifugar a 1000 RPM, por 2 min. Descartar el sobrenadante y aforar a 45 ml de agua up. Y almacenar.