



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE

LICENCIATURA EN BIOLOGÍA

PARA OBTENER EL GRADO DE

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

“Sistemática molecular de especies de *Dalbergia* presentes en Puebla, México”

QUE PRESENTA LA ALUMNA

Palacios Mora Karla Paola

2172031491

ASESORES

Interno: Dra. Maria Flores Cruz

Departamento El Hombre y su Ambiente

Vo.Bo.

Externo: Dra. Jeny Solange Sotuyo Vasquez

Departamento de Botánica, Instituto de Biología

Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

Vo.Bo.

México, D-F-

Fecha de inicio 20/ 03 / 2022

Fecha de término 20/09/22

RESUMEN

La presente investigación, se basó en emplear la sistemática molecular para poder realizar de una manera más precisa la determinación de las especies del género *Dalbergia* presentes en el estado de Puebla. Para lo cual, se extrajo, amplificó y se obtuvo secuencias de las muestras de ADN de dichas especies (trabajando con una de las regiones más variables ITS). Se construyeron árboles filogenéticos con las muestras de Puebla y de la base de datos Genbank. También por medio de investigación bibliográfica, se obtuvieron mapas de distribución de estas taxa en México. Se estimó su diversidad genética, para descartar o afirmar la presencia de una especie o de nuevos linajes. Después del análisis, se concluyó que los individuos amplificados de las especies de Puebla corresponden a las taxa *Dalbergia cubilquitzensis*, *D. glabra*, especies que se encuentran distribuidas en el sur y centro de la República Mexicana. *Dalbergia cubilquitzensis* y *D. glabra* no estaban registradas para el estado de Puebla. Una vez que se comparen las secuencias de estas especies con las de otras áreas de distribución se podrá saber si es un mismo taxón o son más linajes. Por lo tanto, se recomienda que se sigan realizando más estudios sobre el género *Dalbergia*, para identificar los taxones que lo constituyen y su distribución. Estudios que serán útiles, para facilitar su protección y conservación.

Palabras clave

Dalbergia, Clados, Filogenia, Filogeografía.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	4
MARCO TEÓRICO	5
OBJETIVO GENERAL	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
RESULTADOS	12
DISCUSIÓN	16
CONCLUSIÓN	18
REFERENCIAS	19
ANEXOS	22

INTRODUCCIÓN

El género *Dalbergia* pertenece a la familia de las Fabáceas o Leguminosas, cuenta con aproximadamente 250 especies (Knoblauch, 2001). De acuerdo con Sotuyo *et al.*, (2022), su distribución se encuentra en zonas tropicales del mundo África, Asia, Oceanía y América. En esta última, se distribuyen tanto en Centroamérica y Sudamérica. En México, se registran 20 especies del género *Dalbergia*, de las presentes, 15 son maderables entre ellas *D. granadillo*, *D. congestiflora* y *D. stevensonii*, de las cuales, seis son endémicas de acuerdo con la CONABIO (2015). Las especies de *Dalbergia* son árboles deciduos, lianoides y arbustos decumbentes, se distinguen por su tamaño, el cual varía (Khiem, 2017). Se pueden encontrar, árboles de 10 a 40 metros de altura y diámetros (altura a nivel del pecho) de 40- 70 cm. El tronco es frecuentemente arqueado o sinuoso, muchas veces corto, a veces ramificado desde la parte inferior, especialmente cuando son juveniles (Khiem, 2017). En México, las especies *Dalbergia granadillo*, *D. congestiflora* se distribuyen en el Pacífico desde Jalisco hasta Chiapas y en el Golfo, se encuentran principalmente en Veracruz, aquí se registran las especies *D. brownei*, *D. glabra* y *D. glomerata* (Sotuyo com. pers.). Para México, se reconocen cuatro grupos de especies de *Dalbergia* (clados filogenéticos), los cuáles, no son monofiléticos. El primer clado se conoce como *Dalbergia granadillo*, éste, está constituido por la especie *D. granadillo*, *D. calycina* y *D. retusa*, del último taxón mencionado, se reconocen dos variedades: *D. retusa var. retusa* y *D. retusa var. cuscatlanica*. El segundo Clado *D. glabra* está compuesto por las siguientes especies: *Dalbergia glabra*, *D. brownei*, *D. tabascana* y *D. chontalensis* distribuido principalmente en México, Centroamérica. El tercer Clado denominado *D. ecastaphyllum*, que comprende las especies de *D. ecastaphyllum* y *D. monetaria*, donde hay registro de ellas en África. El cuarto clado, el de *D. congestiflora*, es el más grande, algunas de las especies que lo componen son: *Dalbergia congestiflora* (Romero, 2020), *D. cubilquitzensis*, *D. glomerata*, *D. luteola*, *D. palo-escrito*, *D. rachiflexa* y *D. stevensonii*, las especies se distribuyen en Centroamérica y Sudamérica (Sotuyo *et al.*, 2022). Para el estado de Puebla, Cervantes *et al.*, (2019), menciona que se encuentra la especie *D. congestiflora* (sinónimo, *Amerimnon congestiflorum*). Las especies de *Dalbergia*, se les conoce como granadillos o palo de rosa (CCA, 2017). También cuentan con un alto valor económico y ecológico (Vatanparast *et al.*, 2013). En cuanto su uso, varias especies de *Dalbergia* se han utilizado tradicionalmente para

fabricar muebles de lujo, instrumentos musicales, mangos de cuchillos y artesanías, entre otros objetos (CONABIO, 2021). De acuerdo con Vatanparast *et al.*, (2013), menciona que, en el 2010, se inició con una alta demanda, a nivel mundial de *Dalbergia* como fuente de madera, a causa principalmente por la expansión del mercado chino. Otras de las amenazas que enfrenta el género *Dalbergia* son la sobreexplotación, la pérdida de hábitat e incendios causados por actividades antropogénicas (Díaz-Gallegos *et al.*, 2010). Este grupo de especies se encuentra en peligro de extinción, citados en la Lista Roja de la UICN. Además, están puestas bajo protección por la NOM-059-SEMARNAT-2010 (Romero, 2020), y por la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres (CITES, 2013). Por lo tanto, es recomendable realizar estudios de las especies de *Dalbergia*, para proponer un mejor manejo. En el grupo hacen falta estudios sobre la distribución, la filogenia y la filogeografía, que ayuden a identificar y a conservar las especies. En México, se encuentra solo una mínima cantidad de información sobre el estudio de las especies del género *Dalbergia*, utilizando la sistemática molecular. Este proyecto de servicio social, aportará información al conocimiento del grupo y forma parte del proyecto institucional "Filogenia y filogeografía de especies de *Dalbergia* de México y Centroamérica"; dirigido por la Dra. Solange Sotuyo, Laboratorio de Sistemática Molecular Botánica II, Departamento de Botánica en el Instituto de Biología, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

MARCO TEÓRICO

Historia de la identificación molecular de organismos

El uso de marcadores moleculares para resolver problemas taxonómicos en plantas, se inició en 1970, con la electroforesis de enzimas, (Gottlieb, 1971). Hacia 1980 las técnicas de manipulación y análisis habían avanzado lo suficiente como para poder estudiar la variación de ADN y ARN (Moritz & Hillis, 1996). Las tres grandes áreas de aplicación de la sistemática molecular son la estructura genética de poblaciones (como variación geográfica, heterocigosidad), delimitación de especies (incluyendo híbridos) e inferencia filogenética (Baverstock & Moritz, 1996); estas

técnicas revolucionaron las investigaciones de la diversidad, ya que, a través de las secuencias del ADN, los investigadores las utilizaron para definir reglas y diferenciar taxones, ya que la identificación de especies a partir de características morfológicas, era sumamente difícil (Cardoso *et al.*, 2020).

Importancia de la sistemática molecular filogenética y la filogeografía

La filogenia es una herramienta que tiene la biología evolutiva para expresar las relaciones ancestro-descendiente entre organismos a partir de su ADN y ARN, morfología, embriología, etc. (Martinazzo, 2011; Leopardi-Verde, 2021). Por otro lado, se encuentra la filogeografía, esta trabaja con los componentes históricos o filogenéticos de la distribución espacial de linajes, de genes y considera como ejes al tiempo y al espacio; estos ejes se mapean y ayudan a identificar las barreras geográficas o ambientales que influenciaron en el material genético entre las poblaciones (Martinazzo, 2011).

En los últimos años, ha habido un gran avance en los estudios sobre filogenética y filogeografía, propiciado por las innovaciones tecnológicas como es la Sistemática molecular, dicha sistemática ha permitido disponer de una gran cantidad de información sobre la variabilidad de los seres vivos en forma de secuencias de ADN y la aplicación de herramientas conocidas como marcadores moleculares (un marcador molecular: es un loci genético, una parte del genoma) que puede ser fácilmente rastreado y cuantificado en una población (o en un linaje) y que podría estar asociado con un gen o un carácter de interés de cierta especie (Hayward *et al.*, 2015; Cornejo & Álvarez, 2016). El uso de esta tecnología ha tenido avances teóricos, que han permitido emplear sofisticados algoritmos y herramientas estadísticas en el estudio de los procesos evolutivos, taxonómicos, biogeográficos, ecológicos y de conservación biológica (Cornejo & Álvarez, 2016).

Sistemática molecular en la familia Fabaceae o Leguminosas, género *Dalbergia* en México

La sistemática molecular ha mejorado en gran medida la comprensión de las relaciones evolutivas en las leguminosas en las últimas décadas, proporcionando la base para nuevas

clasificaciones basadas en filogenias (Cardoso *et al.*, 2020).

López-Romero (2019) en su estudio de Leguminosas Colombianas III, menciona que la revista Taxón publicó, una nueva clasificación de subfamilia de las leguminosas, basada en una filogenia integral bajo la autoría general del Grupo de trabajo de filogenia de leguminosas (LPWG); este estudio brinda un fuerte apoyo, al nuevo arreglo de subfamilias. La nueva clasificación abordó la no monofilia de la subfamilia Caesalpinioideae; cabe mencionar que la no monofilia fue descubierta por Lavin *et al.* (2001), ellos fueron los primeros en reconocer la no monofilia de *Aeschynomene* utilizando tres conjuntos de datos moleculares (*ITS*, *matk-trnK* y *tmL*) y morfológicos. Es importante mencionar que este análisis filogenético de leguminosas, es el más completo hasta la fecha, basado en las secuencias del gen *matK* e incluyendo un muestreo casi completo de los géneros de leguminosas. La nueva clasificación reconoce seis subfamilias monofiléticas: Caesalpinioideae (que incluye al clado Mimosoide), Cercidoideae, Detarioideae, Dialioideae, Duparquetioideae y Papilionoideae.

Dentro de las Papilionoideae, existe un grupo muy importante denominado el clado Dalbergioide, conformado por los subclados *Adesmia*, *Dalbergia* y *Pterocarpus*, respaldados e identificados principalmente con base en datos moleculares de cloroplasto (espaciador *trnK/matK* y el intrón *trnL*), uno de los géneros más importantes en las Dalbergioides es *Dalbergia* (Julio, L. 2022).

Por otra parte, Cardoso *et al.* (2020), estudiaron y analizaron todo el género de *Aeschynomene*, analizando al clado *Dalbergioide*, empleando tres marcadores, uno nuclear y dos de cloroplasto (RNA de transferencia ITS/5,8S, los espaciadores intergénicos *tmL* y el gen *matK*). El estudio llega a la conclusión de que *Dalbergia* es hermano de los géneros *Machaerium* y de la sección *Scoparidae* de *Aeschynomene*, a la que los autores nombran como *Ctenodon*.

Para el género *Dalbergia* se han realizado algunos intentos de reconstruir la filogenia, como fue el caso de Vatanparast *et al.*, (2013) y de Sotuyo *et al.* (2022). Así mismo, se han realizado algunos trabajos filogeográficos. Por ejemplo, Santos (2008), quiso corroborar una hipótesis sobre la vicarianza entre *Dalbergia nigra* Allem. ex Benth. y *Dalbergia miscolobium* Benth. Empleando un marcador de cloroplasto (espaciador *trnL*) obtuvieron que los datos moleculares, coinciden con los morfológicos presentados en la literatura, sin embargo, no confirman la hipótesis de vicarianza

entre ambas especies.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar las técnicas de extracción y amplificación del ADN de las muestras de las especies posiblemente nuevas en el estado de Puebla, utilizando secuencias de cloroplasto y marcadores nucleares.

Objetivos particulares

- Realizar extracción de ADN mediante el kit DNeasy Plant Mini Kit, QIAGEN, USA modificado por CBOL (2009).
- Emplear el software MAFFT para la alineación del ADN como base para la construcción de árboles filogenéticos.
- Por medio de investigación bibliográfica obtener mapas de distribución para cada especie con bases de datos de GBIF, datos abiertos MEXU UNAM y los datos de las colectas realizadas en campo.
- Estimar medidas de diversidad genética: riqueza alélica, porción de sitios segregantes, diversidad haplotípica además de la estructura genética y la construcción de las redes de haplotipos para cada especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la presente investigación se utilizaron algunas muestras de hojas que fueron obtenidas de distintos herbarios (MEXU, INIREB, SERBO), complementando con muestras obtenidas en campo en el estado de Puebla, México.

Extracción y secuenciación de ADN

De los individuos colectados en campo fueron almacenados en gel de sílice, se tomaron muestras para la extracción de ADN genómico de acuerdo con el protocolo descrito por el DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN, USA), modificado por CBOL (2009). Para la cuantificación de cantidad y calidad del ADN, se usó el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Posteriormente, para visualizar la integridad del ADN se visualizó con gel de agarosa al 1% teñido con red gel o gel red, un intercalante, seguido de esto se usó una cámara de luz UV para visualizar el gel. Para realizar la amplificación se utilizó la región ITS, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se empleó, la PCR Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific), en un volumen final de 10 μ l, siguiendo los protocolos establecidos por la compañía. A la reacción de PCR se le adicionó suero bovino fetal (BSA) al 4%, así como dimetil sulfóxido (DMSO) al 1% en las reacciones de los ITS. También para poder hacer la limpieza de los productos del (PCR) se empleó el kit de limpieza GF-1 Ambiclean Kit (Gel PCR; Vivantis, Technologies), seguido de esto se preparó la reacción de secuenciación (Sentido 5'- 3' y de 3'- 5') kit BigDye Terminator v3.1. Las reacciones en sentido Forward y Reverse se enviaron a secuenciar al laboratorio de Secuenciación Genómica de Biodiversidad y la Salud del Instituto de Biología, en un secuenciador 3730xl (Thermo Fisher).

Análisis de datos

Las secuencias Forward y Reverse obtenidas se agruparon y ensamblaron por medio del programa Seqtrace (Stucky, 2012), seguido de esto se guardaron en un formato FASTA para posteriormente alinearlas automáticamente utilizando el software MAFFT (Katoh *et al.*, 2019). Los alineamientos fueron revisados a ojo para verificar que cada base diferente era real y no un error de secuenciación. Se utilizó este alineamiento como base para la construcción de árboles filogenéticos utilizando métodos bayesianos y de parsimonia. Por otra parte, para los mapas de distribución, se realizó una investigación bibliográfica, de

información de las georeferencias, en las bases de datos abiertas de la UNAM, Herbario MEXU y GBIF. En cuanto a los análisis filogeográficos se calculó medidas de diversidad genética: riqueza alélica, porción de sitios segregantes, diversidad haplotípica (Rozas *et al.*, 2017) además de la estructura genética y la construcción de las redes de haplotipos para cada especie por medio del software Popart (Leigh & Bryant, 2015). Para la realización de los procesos antes descritos se utilizó información y datos, proporcionados por el grupo de trabajo de la Dra. Sotuyo y el alumno Pedraza-Ortega E. (2022), al igual que su orientación y apoyo en todo momento.

RESULTADOS

Extracción de ADN

De acuerdo a las muestras que ya se encontraban procesadas, extraídas del herbario (MEXU, INIREB, SERVO) (Anexo 1 y 1.1), y algunas de campo, al someterlas al conteo respecto a su calidad y pureza del ADN, en general se obtuvo que se encontraban dentro del rango de aceptación que son (260/280) menor o cercano 1 y (280/260) mayor o cercano a 1, puede observarse en (Anexo 2 y 2.1). También se recaudó información de resultados de muestras procesadas del 2018-2022 donde arrojó el mismo resultado (Anexo 2.2).

Empleo del software MAFFT y construcción de árboles filogenéticos

Las secuencias obtenidas, que fueron agrupadas, ensambladas por medio de software SeqTrace (Stucky, 2012), en su mayoría eran de buena calidad; al ser alineadas por medio del software MAFFT (Kato et al., 2019) y Aliview (Larsson, 2014), (Anexo 2.3), algunas mostraban pequeñas discrepancias entre sí, pero si correspondían los cambios. Como resultado del alineamiento, se pudo observar que estas muestras corresponden a la especie *Dalbergia cubilquitzensis*, cabe de resaltar que esta pertenece al clado *D. congestiflora*; también se encontró una especie que pertenece al clado *D. glabra* (*Dalbergia glabra*).

Con base en estos datos, se realizó la construcción de un árbol filogenético con las muestras de Puebla, México (Anexo 3), en conjunto con las secuencias obtenidas de GenBank, estas especies son grupos externos e internos de los clados encontrados (*D. congestiflora* y *D. glabra*), donde se puede observar que ambos clados *D. congestiflora* y *D. glabra*, comparten mayor parentesco con las especies que se encuentran en Centroamérica y Sudamérica, (Anexo 4)

Mapas de distribución para cada especie en Puebla

De acuerdo a las Bases de datos del herbario MEXU, datos abiertos UNAM y los datos de las colectas realizadas en campo, así es como se encuentra la distribución de la taxa del género *Dalbergia* encontrados en Puebla, México:

NOTA: Más adelante el grupo de trabajo de la Dra. Sotuyo van a incluir los nuevos registros de las especies encontradas en en la base de datos abiertos MEXU, cuando los ejemplares de herbario recolectados se incorporen a la colección.

El siguiente mapa, muestra la distribución de *Dalbergia cubilquitzensis* principalmente al sur de México en los estados de Chiapas y Oaxaca (cuadrados color verde y rojo).



Figura 2. Distribución de especies de *Dalbergia cubilquitzensis* en México (MEXU, 2001)

Por último, se puede apreciar, en el mapa por medio de cuadrados color verde y rojo, la distribución de *Dalbergia glabra* principalmente al sur de México en los estados de Guerrero, Oaxaca, Veracruz, Yucatán, Tabasco y Chiapas.

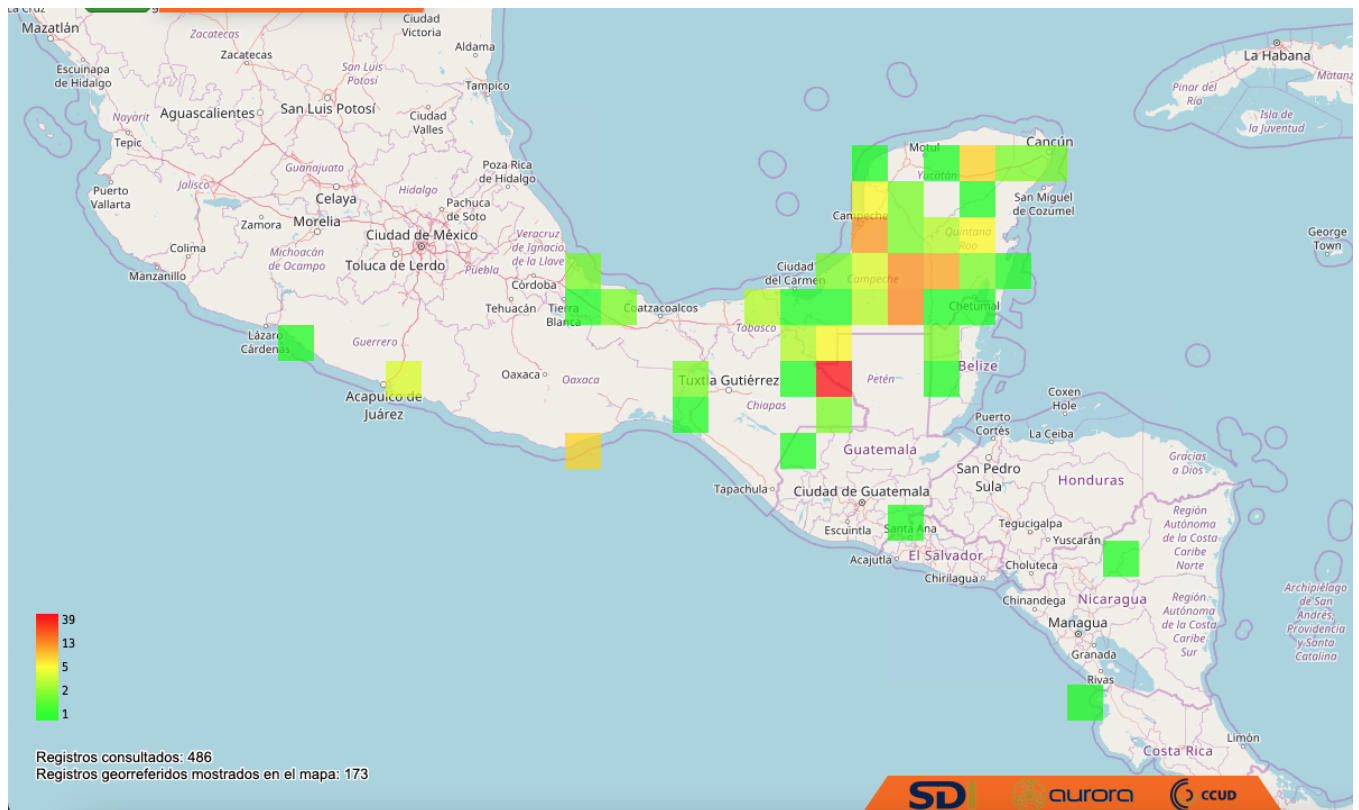


Figura 3. Distribución de especies de *Dalbergia glabra* en México (MEXU, 2001).

Estimación de medidas de diversidad genética

Para las estimaciones de la diversidad haplotípica y nucleotídica, se utilizó el software DnaSP v 6.12.03 (Rozas et al., 2017), para esto fue necesario ocupar las secuencias que tenían mayor calidad, para ello estas fueron alineadas por medio del programa MAFFT y en un formato FASTA; posteriormente, se seleccionaron los datos y parámetros de las secuencias, para finalmente calcular los valores que se pueden observar en la (Cuadro 1). En general se obtuvieron altos valores de diversidad genética, sin embargo, hay que aclarar que el número de muestras que se ocuparon, no son tan significativas para poder establecer dicho resultado como legítimo.

Cuadro 1. Estimación de medidas de Diversidad genética: Riqueza alélica, porción de sitios segregantes, diversidad haplotípica

Estimación de medidas de Diversidad genética	
Diversidad de nucleótidos (por sitio) P_i :	0.01
Varianza de muestreo de P_i :	0.00
Número medio de diferencias de nucleótidos.	8.71
Número de haplotipos, h :	11.00
Diversidad de haplotipos H_d :	0.98
Sitios segregantes	0.00
Varianza de la diversidad de haplotipos:	0,00

Para la construcción de red de haplotipos se empleó el software Popart (Leigh & Bryant, 2015), por medio de círculos están representadas cada una de las muestras, las ramificaciones y las rayitas entre estas muestran cada uno de los cambios o mutaciones que tuvieron cada una de estas especies.

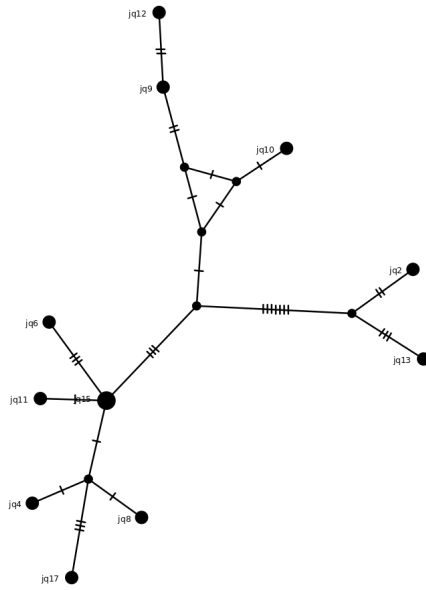


Figura 4. Red de haplotipos para los individuos encontrados en Puebla. El tamaño del nodo es proporcional a la frecuencia de haplotipos, ramas e intersecciones entre ellas proporcionales al número de mutaciones para cada especie.

DISCUSIÓN

De acuerdo con Cardoso *et. al* 2020, esta herramienta ha permitido mejorar en una gran medida nuestra comprensión de las relaciones evolutivas, ya que proporciona la base para nuevos alineamientos filogenéticos. Hayward *et al*, 2015 y Cornejo & Álvarez, 2016, mencionan que la sistemática molecular también ha permitido, poder disponer de una gran cantidad de información sobre la variabilidad de los seres vivos en forma de secuencias de ADN. Un ejemplo de ello en esta investigación fue al poder realizar la alineación por medio del software MAFFT y construcción de árboles filogenéticos, gracias a la obtención de la información genética que arrojó estos estudios de las especies en cuestión, por ejemplo, las secuencias de ADN para el ensamblaje e identificación.

Al poder realizar la construcción de los árboles filogenéticos y el determinar la distribución por medio de mapas, se pudo identificar la relación que tenían entre varias especies pertenecientes a

los clados hermanos que existen en todo el mundo y en México; teniendo así, mayor cercanía con el Clado *Dalbergia congestiflora* y *D. glabra* (Sotuyo *et al.*, 2022). También es importante mencionar que, al realizar la búsqueda bibliográfica en cuanto a la distribución de las taxas en la base de datos The Global Biodiversity Information Facility (GIBF), se pudo encontrar datos mal georeferenciados, donde se puede notar que se encuentra distribuidas en el estado de Durango e incluso en un punto dentro del mar (Anexo 5); sin embargo, en la base de datos abiertos MEXU, UNAM se pudo apreciar de manera precisa las referencias de cada una de las especies encontradas.

De acuerdo con la CONABIO (2022), la diversidad genética es el número total de características genéticas dentro de cada especie, también permite que las especies tengan una mayor probabilidad de sobrevivir a los cambios en el ambiente y permanecer a través del tiempo; para poder medir esta se puede hacer por medio de la estimación de la diversidad de genes o el número de alelos por locus. Por lo tanto, es lo que se realizó con las especies de *Dalbergia* encontradas en Puebla, de esta manera se pudo dar una visión donde se muestra el posible estado en que se encuentran estas especies, ya como se mencionó en el anteriormente, a mayor diversidad genética, mayor probabilidad tienen las especies de este género para sobrevivir y ver los cambios que han sufrido a nivel genético a través del tiempo; aunque es importante mencionar que esta estimación de diversidad genética no cuenta con un número de muestras grande por lo tanto no es una muestra significativa que pueda determinar que la alta diversidad genética sea verdadera.

CONCLUSIÓN

El uso de las técnicas de sistemática molecular, como es la extracción de ADN por medio de un kit estandarizado y uso de marcadores de cloroplastos, es una gran herramienta en la actualidad, para poder identificar de una forma más práctica y asertiva las especies de interés.

El utilizar el software MAFFT, proporcionó una gran ventaja al momento de alinear las secuencias de ADN, facilitando el procesamiento de las secuencias para la construcción de

árboles filogenéticos.

Por otra parte, en esta investigación, se descubrió que las especies (*Dalbergia cubilquitzensis* y *D. glabra*), también se encuentran, distribuidas el Estado de Puebla, México, impactando de una manera positiva, ya que no había registro de estos taxones en a las bases de datos abiertos de la UNAM y Bases de datos de GBIF. Sin embargo, las tres especies están reportadas para los estados colindantes de Oaxaca y Veracruz.

También al calcular la riqueza de medidas de diversidad genética se pudo observar que se encontraban valores altos, sin embargo, se concluyó que es necesario que se comparen con los de las demás poblaciones de la especie para poder determinar con certeza estos resultados, ya que comparar las muestras de un solo sitio para sacar conclusiones sobre la variabilidad y diversidad genética de una especie no son tan significativas.

Por último, aún no se puede concluir que los individuos de las poblaciones analizadas en el presente estudio, corresponden a taxa nuevos. *Dalbergia cubilquitzensis* y *D. glabra*, se encuentran distribuidas en el sur y centro de la República Mexicana y no se encontraban registradas en Puebla. Una vez que, se realice el análisis comparativo con las secuencias generadas para otras partes del país se sabrá si dichos individuos corresponden a linajes nuevos y el número de diferencias pueden considerarse como taxa potencialmente nuevos. Por lo tanto, se recomienda que se sigan realizando más estudios sobre el género *Dalbergia* en todo el país, la delimitación de taxa que constituyen el género y su distribución, para poder facilitar su protección y conservación.

REFERENCIAS

- Baverstock P. & Moritz C. (1996). Project design. 17-27. En: Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K. Eds. Molecular Systematics. Segunda Edición. Sinauer Associates Inc. Massachusetts.
- Biodiversity Information System of Mexico (2001). América Latina y el Caribe; UNIBIO, IBUNAM. MEXU/Herbario Los Tuxtlas. Occurrence dataset <https://doi.org/10.15468/v5pwjg> accessed via GBIF.org on 2022-10-04. <https://www.gbif.org/occurrence/46423649>.
- Cervantes, A., Linares, J., & Quintero, E. (2019). An updated checklist of the Mexican species of *Dalbergia* (Leguminosae) to aid in its conservation efforts. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 90, e902528. Epub 31 de enero de 2019. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2019.90.2528>
- Knoblauch, B. (2001). Estudio ecológico, silvícola y de utilización del Granadillo (*Dalbergia tucurensis* J.D. Smith) en bosques latifoliados de Honduras. Zamorano Carrera De Desarrollo Socioeconómico Y Ambiente. (9 - 19pp.).
- CBOL Plant Working Group (2009) A DNA Barcode for Land Plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 12794-12797. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0905845106>
- CCA (2017). Plan de acción de América del Norte para un comercio sustentable de especies maderables, Comisión para la Cooperación Ambiental, Montreal, 44 pp.
- Cardoso D., Mattos C., Filardi F., Delgado-Salinas A., Lavin M., Moraes P., Tapia-Pastrana F. & Lima H. (2020). A molecular phylogeny of the pantropical papilionoid legume *Aeschynomene* supports reinstating the ecologically and morphologically coherent genus *Ctenodon*; *Neodiversity: A Journal of Neotropical Biodiversity*; Instituto de Biologia, Universidade Federal da Bahia, Rua Barão de Jeremoabo, sn, Ondina, 40170-115, Salvador, Bahia, Brazil.
- Convención Sobre El Comercio Internacional De Especies Amenazadas De Fauna Y Flora Silvestres [CITES], (2013). Examen De Las Propuestas De Enmienda A Los Apéndices I Y II; Decimosexta Reunión De La Conferencia De Las Partes Bangkok (Tailandia). CoP16 Prop. 61.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad [Conabio] (2015). Taller para la evaluación del riesgo de extinción de las *Dalbergia* maderables de México en el marco de la NOM-059-SEMARNAT-2010. Retrieved of http://conabioweb.conabio.gob.mx/webservice/dalbergias/Dalbergia_granadillo.pdf
- Cornejo C. & Álvarez S. (2016). Sistemática filogenética, filogeografía y ecología molecular; Su importancia para el estudio actual de la biodiversidad: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, Baja California Sur, Instituto Politécnico Nacional, 128-135.

Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad [Conabio] (2021). Autoridad Científica CITES de México Manual de procedimientos para emitir consideraciones técnicas por especie para la formulación de Dictámenes de Extracción No Perjudicial (NDF): Palo de rosa (*Dalbergia* spp.), México.

Díaz-Gallegos, J., Mas F. & Velázquez A. (2010). Trends of tropical deforestation in Southeast Mexico. *Singapore Journal of Tropical Geography* 31: 180-196.

Comisión [Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad](#), CONABIO (2020). Diversidad genética; Biodiversidad Mexicana. [Liga Periférico - Insurgentes Sur, Núm. 4903, Col. Parques del Pedregal, Alcaldía Tlalpan, 14010, Ciudad de México.](#)

Fariello, R. (2008). Modelos aleatorios en Genética de Poblaciones, estimación de parámetros de mutación. Facultad de Ciencias Universidad de la República de Uruguay.

Gottlieb, L. (1971). Gel electrophoresis: new approach to the study of evolution. *BioScience* 21:939-944.

Hayward, C., Tollenaere, R., Dalton-Morgan, J. & Batley, J. (2015). Molecular marker applications in plants. En Batley (Ed.), *Plant genotyping: Methods and protocols* (13-27). New York: Springer. doi: 10.1007/978-1-4939-1966-6:2

Julio, L. (2022). Relaciones Filogenéticas Y Filogeográficas Del Clado *Dalbergia* Granadillo (Fabaceae; Papilionoideae); Posgrado En Ciencias Biológicas Instituto De Biología Unam Sistemática. Universidad Nacional Autónoma De México. México.

Katoh, K., Asimenos, G. & Toh, H. (2009). Multiple Alignment of DNA Sequences with MAFFT. In: Posada, D. (eds) *Bioinformatics for DNA Sequence Analysis. Methods in Molecular Biology*, vol 537. Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-251-9_3

Larsson, A. (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*, 30(22) 3276–3278. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>.

Lavin, M., Pennington, R.T., Klitgaard, B.B., Spret, J.I., Lima, H.C. & Gasson, P.E. (2001). The dalbergioid legumes (Fabaceae): Delimitation of a pantropical monophyletic clade. *American Journal of Botany* 88: 503-533.

Leopardi-Verde, C., & Escobedo-Sarti, G. (2021). Filogenias: conceptos y generalidades. Tequio. *Revista de divulgación, investigación e innovación*, 4(11), 7-25.

Leigh, W. y & Bryant, D. (2015). PopART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110–6. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.1241>.

Linares J., & Sousa M. (2007). Nuevas especies de *Dalbergia* (Leguminosae: Papilionoideae: Dalbergieae) en México y Centroamérica. México.

López-Romero, J. (2019). Sinopsis del género *Chamaecrista* en Colombia: Estudios en Leguminosas Colombianas III; Páginas. 165-246. En: Forero, E. & C. Castelianos (eds.). Biblioteca Jorge Álvarez Lleras N° 37. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Colombia. 2019_Buschbom20.pdf 2 2019 Buschbom20.pdf V

Khiem M. (2017). Biología y Silvicultura de las especies de *Dalbergia* en América Central; Departamento de Estado y el USFS-IP.

Martinazzo, B. (2011). Sistemática, Filogenia y Filogeografía de Las Ranas Patagónicas: Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata (UNLP), 12-13.

Moritz C. Hillis D. (1996). Molecular systematics: context and controversies. 1-12. En: Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K. Eds. Molecular Systematics. Segunda Edición. Sinauer Associates Inc. Massachusetts.

Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. & Sánchez-Gracia, A., (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12), 3299-3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>

Romero, B. (2020). Género *Dalbergia* en México; evaluación poblacional y estudio de campo en la Región Costa de Oaxaca. Universidad Politécnica de Madrid.

Santos, S. (2008). Analysis of vicariance hypothesis between *Dalbergia nigra* Allem. ex Benth. and *Dalbergia miscolobium* Benth. (Fabaceae) based on chloroplast DNA sequences. 2008. 43 f. Tese (Doutorado em Botânica estrutural; Ecologia e Sistemática) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

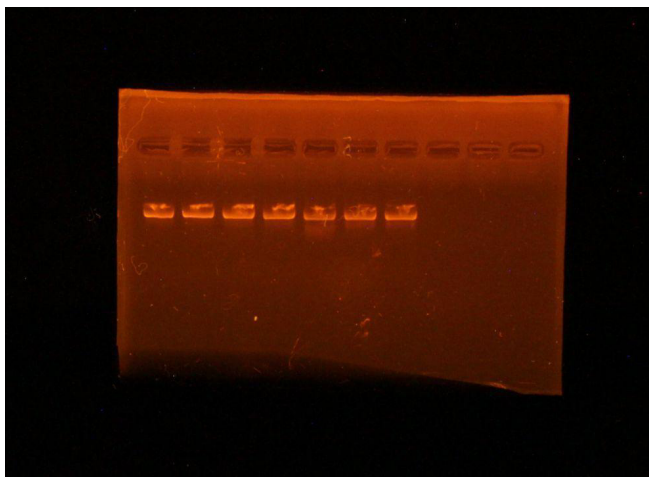
Sotuyo S., Pedraza-Ortega E., Martínez-Salas & Cabrera L. (2022). Insights into phylogenetic divergence of Mexican *Dalbergia* (Leguminosae: Dalbergiae). *Frontiers in Plant Systematics*. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.910250>

Stucky B. (2012). SeqTrace: A graphical tool for rapidly processing DNA sequencing chromatograms. *J. Biomolecular Technology*. 2012;23:90–93. doi:10.7171/jbt.12-2303-004seqtrace

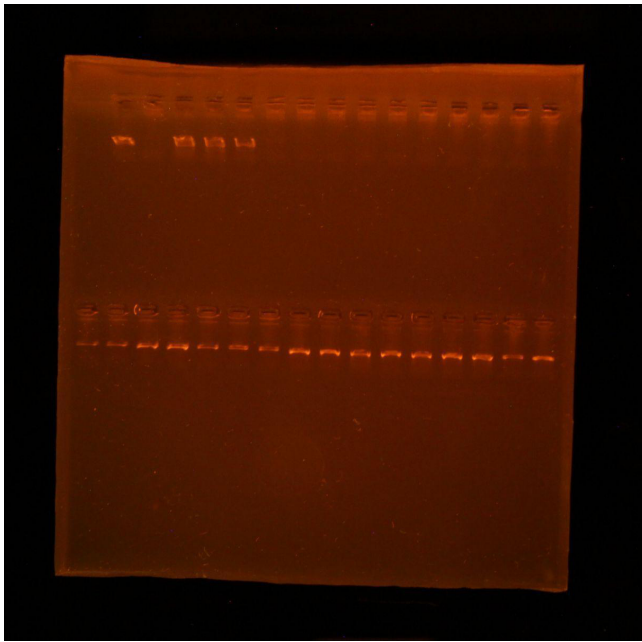
Valdés Miguel, (2009). Análisis De La Estructura Genética Poblacional Del Dorado, Del Noroeste Del Pacifico Mexicano Y Golfo De California Mediante El Uso De Microsatélites; Uso, Manejo Y Preservación De Los Recursos Naturales; Centro de investigaciones, S.C.

Vatanparast, M., Klitgård, B., Adema, FACB, Pennington, R., Yahara, T. & Kajita, T. (2013). First molecular phylogeny of the pantropical genus *Dalbergia*: Implications for infrageneric circumscription and biogeography. *South African Journal of Botany*, 89, 143-149. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2013.07.001>.

ANEXOS



ANEXO 1. Gel limpieza PCR y amplificación trnL



ANEXO 1.1. Gel de PCR trnLF

09/06/2022

11:07 a.m.

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Sample Type	Factor
1	170	Lidia	09/06/2022 09:25:26 a.m.	670.3	ng/μl	13.405	9.478	1.41	0.58	DNA	50.00
2	171	Lidia	09/06/2022 09:27:43 a.m.	165.0	ng/μl	3.300	1.675	1.97	1.18	DNA	50.00
3	172	Lidia	09/06/2022 09:30:37 a.m.	678.5	ng/μl	13.570	7.258	1.87	1.11	DNA	50.00
4	173	Lidia	09/06/2022 09:32:50 a.m.	67.6	ng/μl	1.352	0.665	2.03	1.35	DNA	50.00
5	174	Lidia	09/06/2022 09:34:57 a.m.	13.4	ng/μl	0.268	0.160	1.67	0.93	DNA	50.00
6	175	Lidia	09/06/2022 09:36:51 a.m.	7.5	ng/μl	0.149	0.078	1.91	0.75	DNA	50.00
7	176	Lidia	09/06/2022 09:38:52 a.m.	10.5	ng/μl	0.209	0.125	1.67	0.67	DNA	50.00
8	177	Lidia	09/06/2022 09:40:48 a.m.	234.5	ng/μl	4.690	2.308	2.03	1.40	DNA	50.00
9	178	Lidia	09/06/2022 09:42:54 a.m.	13.1	ng/μl	0.262	0.135	1.93	1.43	DNA	50.00
10	179	Lidia	09/06/2022 09:44:42 a.m.	203.5	ng/μl	4.071	2.039	2.00	1.47	DNA	50.00
11	180	Lidia	09/06/2022 09:46:39 a.m.	50.5	ng/μl	1.009	0.534	1.89	1.97	DNA	50.00
12	181	Lidia	09/06/2022 09:47:55 a.m.	9.6	ng/μl	0.193	0.114	1.70	1.04	DNA	50.00
13	182	Lidia	09/06/2022 09:49:07 a.m.	57.5	ng/μl	1.150	0.575	2.00	1.99	DNA	50.00
14	183	Lidia	09/06/2022 09:50:19 a.m.	19.2	ng/μl	0.385	0.234	1.64	0.56	DNA	50.00
15	184	Lidia	09/06/2022 09:52:15 a.m.	20.7	ng/μl	0.414	0.205	2.01	1.72	DNA	50.00
16	185	Lidia	09/06/2022 09:53:26 a.m.	323.1	ng/μl	6.461	3.159	2.05	1.42	DNA	50.00
17	186	Lidia	09/06/2022 09:54:47 a.m.	344.5	ng/μl	6.890	3.530	1.95	1.60	DNA	50.00
18	187	Lidia	09/06/2022 09:56:06 a.m.	543.9	ng/μl	10.878	5.561	1.96	1.74	DNA	50.00
19	188	Lidia	09/06/2022 09:57:17 a.m.	222.9	ng/μl	4.458	2.224	2.00	1.86	DNA	50.00
20	189	Lidia	09/06/2022 09:58:49 a.m.	389.8	ng/μl	7.795	3.835	2.03	1.96	DNA	50.00
21	190	Lidia	09/06/2022 10:00:27 a.m.	697.5	ng/μl	13.950	7.205	1.94	1.70	DNA	50.00
22	191-1	Lidia	09/06/2022 10:01:46 a.m.	123.4	ng/μl	2.469	1.345	1.84	0.91	DNA	50.00
23	191-2	Lidia	09/06/2022 10:03:03 a.m.	755.3	ng/μl	15.105	7.282	2.07	2.01	DNA	50.00
24	192	Lidia	09/06/2022 10:04:53 a.m.	737.7	ng/μl	14.753	7.120	2.07	2.01	DNA	50.00
25	193	Lidia	09/06/2022 10:07:05 a.m.	635.2	ng/μl	12.705	6.387	1.99	1.78	DNA	50.00
26	194	Lidia	09/06/2022 10:08:24 a.m.	713.8	ng/μl	14.276	7.303	1.95	1.75	DNA	50.00
27	196	Lidia	09/06/2022 10:11:31 a.m.	149.7	ng/μl	2.995	1.477	2.03	1.21	DNA	50.00
28	197	Lidia	09/06/2022 10:13:22 a.m.	20.9	ng/μl	0.417	0.230	1.81	1.37	DNA	50.00
29	198	Lidia	09/06/2022 10:14:40 a.m.	3.1	ng/μl	0.063	0.034	1.84	0.02	DNA	50.00
30	199	Lidia	09/06/2022 10:15:46 a.m.	54.0	ng/μl	1.079	0.601	1.80	1.42	DNA	50.00
31	200	Lidia	09/06/2022 10:23:42 a.m.	10.5	ng/μl	0.209	0.105	2.00	1.28	DNA	50.00
32	201	Lidia	09/06/2022 10:25:16 a.m.	35.3	ng/μl	0.705	0.387	1.82	1.38	DNA	50.00
33	202	Lidia	09/06/2022 10:26:28 a.m.	206.8	ng/μl	4.136	2.200	1.88	1.38	DNA	50.00
34	203	Lidia	09/06/2022 10:27:23 a.m.	329.7	ng/μl	6.593	3.116	2.12	1.23	DNA	50.00

ANEXO 2. Tabla de concentraciones de ADN de las especies de *Dalbergia*.

09/06/2022

11:07 a.m.

#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Sample Type	Factor
35	204	Lidia	09/06/2022 10:28:32 a.m.	43.1	ng/μl	0.862	0.453	1.90	1.63	DNA	50.00
36	205	Lidia	09/06/2022 10:29:39 a.m.	6.4	ng/μl	0.129	0.076	1.70	0.66	DNA	50.00
37	205-1	Lidia	09/06/2022 10:31:10 a.m.	157.9	ng/μl	3.158	2.074	1.52	0.58	DNA	50.00
38	206	Lidia	09/06/2022 10:32:24 a.m.	22.0	ng/μl	0.440	0.233	1.89	1.65	DNA	50.00
39	207	Lidia	09/06/2022 10:33:35 a.m.	168.3	ng/μl	3.366	1.730	1.95	1.20	DNA	50.00
40	208	Lidia	09/06/2022 10:34:41 a.m.	6.6	ng/μl	0.132	0.069	1.91	0.99	DNA	50.00
41	209	Lidia	09/06/2022 10:35:46 a.m.	19.6	ng/μl	0.391	0.248	1.58	0.21	DNA	50.00
42	210	Lidia	09/06/2022 10:37:04 a.m.	280.3	ng/μl	5.606	2.729	2.05	2.02	DNA	50.00
43	212	Lidia	09/06/2022 10:38:30 a.m.	26.7	ng/μl	0.534	0.292	1.83	0.96	DNA	50.00
44	213	Lidia	09/06/2022 10:40:05 a.m.	24.6	ng/μl	0.492	0.247	1.99	0.64	DNA	50.00
45	214	Lidia	09/06/2022 10:41:11 a.m.	67.1	ng/μl	1.342	0.829	1.62	0.80	DNA	50.00
46	215	Lidia	09/06/2022 10:42:32 a.m.	16.9	ng/μl	0.339	0.219	1.55	0.23	DNA	50.00
47	1105	Lidia	09/06/2022 10:46:44 a.m.	414.7	ng/μl	8.294	4.211	1.97	1.75	DNA	50.00
48	2813	Lidia	09/06/2022 10:47:57 a.m.	398.7	ng/μl	7.974	3.824	2.09	1.92	DNA	50.00
49	2814	Lidia	09/06/2022 10:49:26 a.m.	397.7	ng/μl	7.954	3.969	2.00	1.75	DNA	50.00
50	2816	Lidia	09/06/2022 10:50:52 a.m.	360.7	ng/μl	7.214	3.555	2.03	1.84	DNA	50.00
51	2817	Lidia	09/06/2022 10:52:07 a.m.	165.3	ng/μl	3.306	1.742	1.90	1.41	DNA	50.00
52	1225	Lidia	09/06/2022 10:53:30 a.m.	80.3	ng/μl	1.606	0.798	2.01	1.89	DNA	50.00
53	13-1	Lidia	09/06/2022 10:55:11 a.m.	48.2	ng/μl	0.963	0.528	1.82	1.36	DNA	50.00
54	13-2	Lidia	09/06/2022 10:56:47 a.m.	175.2	ng/μl	3.504	1.821	1.92	1.29	DNA	50.00
55	13-3	Lidia	09/06/2022 10:58:06 a.m.	199.5	ng/μl	3.990	1.954	2.04	1.67	DNA	50.00
56	22	Lidia	09/06/2022 10:59:31 a.m.	4.7	ng/μl	0.094	0.061	1.53	0.64	DNA	50.00
57	50	Lidia	09/06/2022 11:00:47 a.m.	67.2	ng/μl	1.344	0.678	1.98	1.66	DNA	50.00
58	DO	Lidia	09/06/2022 11:02:30 a.m.	2.7	ng/μl	0.054	0.037	1.46	0.55	DNA	50.00
59	DO	Lidia	09/06/2022 11:03:49 a.m.	1.4	ng/μl	0.028	0.006	5.02	0.42	DNA	50.00

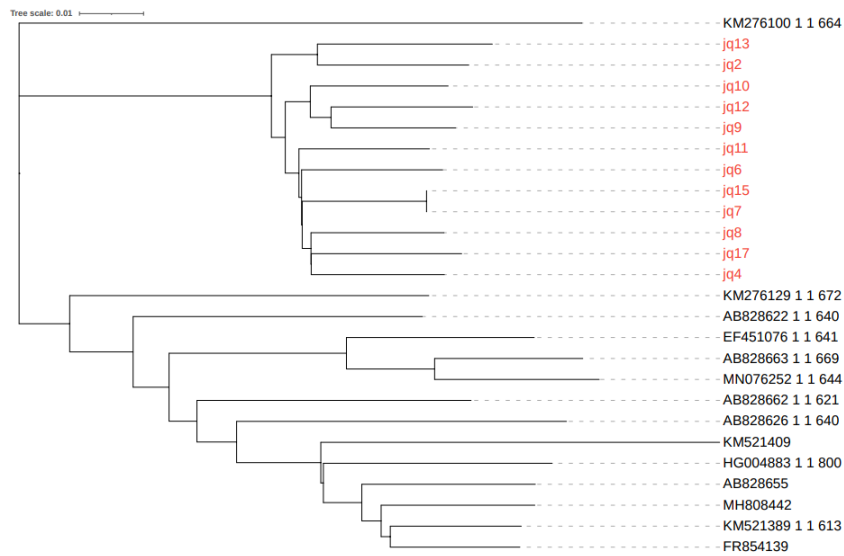
ANEXO 2.1. Tabla de concentraciones de ADN de las especies de *Dalbergia*.

ANEXO 2.2. Tabla de concentraciones de ADN de las especies de *Dalbergia*.

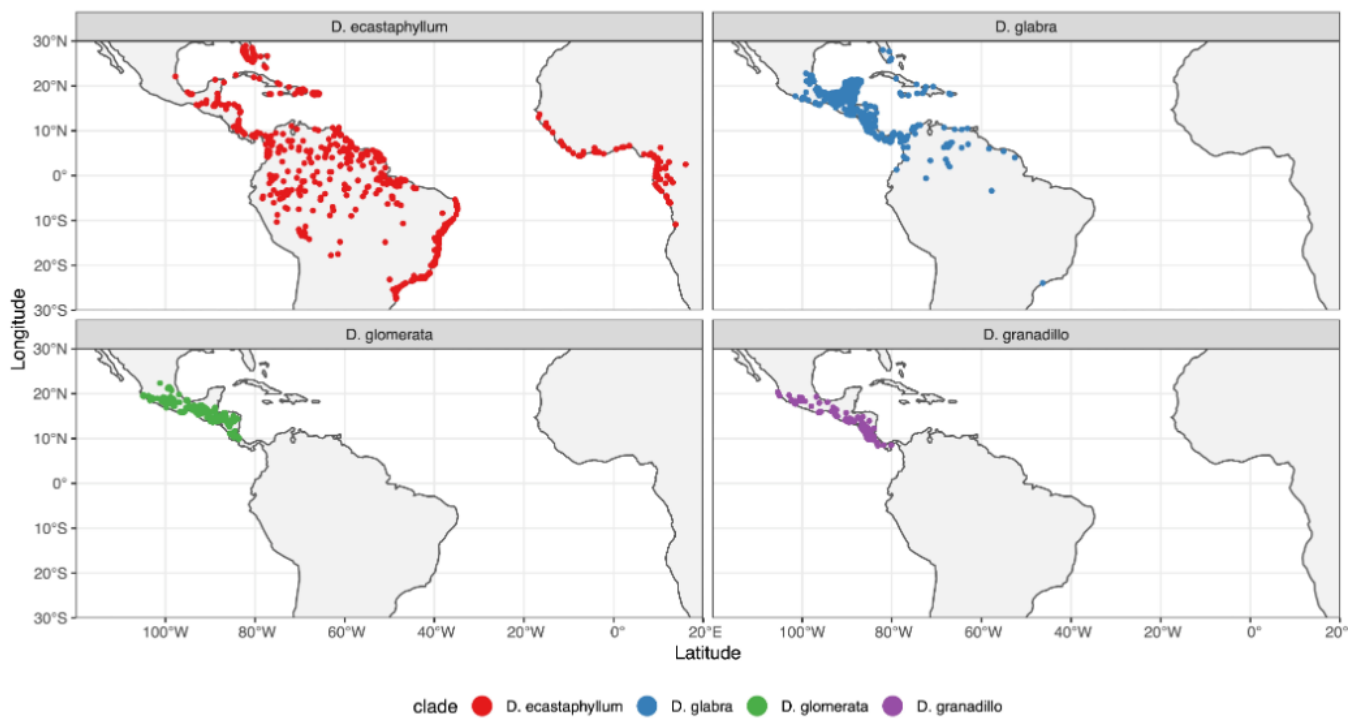
#	Sample ID	User name	Date and Time	Nucleic Acid	Unit	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Sample Type	Factor
1	140-3	Lidia	09/03/2018 12:38:17 p.m.	22.6	ng/μl	0.452	0.263	1.72	1.26	DNA	50.00
2	140-1	Lidia	09/03/2018 12:32:14 p.m.	16.7	ng/μl	0.333	0.199	1.67	1.01	DNA	50.00
3	140-2	Lidia	09/03/2018 12:36:03 p.m.	25.0	ng/μl	0.500	0.284	1.76	1.32	DNA	50.00
4	140-4	Lidia	09/03/2018 12:41:14 p.m.	9.7	ng/μl	0.194	0.115	1.69	1.07	DNA	50.00
5	140-6	Lidia	09/03/2018 12:45:32 p.m.	20.5	ng/μl	0.411	0.242	1.70	1.27	DNA	50.00
6	140-5	Lidia	09/03/2018 12:43:52 p.m.	17.4	ng/μl	0.348	0.207	1.68	1.05	DNA	50.00
7	141-1	Lidia	09/03/2018 01:02:13 p.m.	14.6	ng/μl	0.292	0.173	1.69	0.39	DNA	50.00
8	agua	Lidia	09/03/2018 12:47:35 p.m.	0.7	ng/μl	0.015	0.000	117.65	0.51	DNA	50.00
9	141-2	Lidia	09/03/2018 01:04:13 p.m.	19.7	ng/μl	0.395	0.190	2.08	1.26	DNA	50.00
10	141-3	Lidia	09/03/2018 01:06:18 p.m.	34.1	ng/μl	0.682	0.355	1.92	0.93	DNA	50.00
11	141-4	Lidia	09/03/2018 01:08:31 p.m.	14.9	ng/μl	0.297	0.153	1.95	0.61	DNA	50.00
12	141-5	Lidia	09/03/2018 01:10:53 p.m.	11.9	ng/μl	0.237	0.113	2.11	0.95	DNA	50.00
13	141-5	Lidia	09/03/2018 01:11:01 p.m.	12.1	ng/μl	0.241	0.118	2.05	0.93	DNA	50.00
14	141-6	Lidia	09/03/2018 01:12:36 p.m.	91.8	ng/μl	1.836	1.013	1.81	0.66	DNA	50.00



ANEXO 2.3. Vista de alineamiento manual en el software Aliview.



ANEXO 3. Árbol filogenético de muestras de *Dalbergia* en el estado de Puebla (en color rojo) y especies de grupos hermanos internos-externos secuencias GenBank (color negro).



ANEXO 4. Mapa de distribución de los clados pertenecientes al género *Dalbergia*: *D. ecastaphyllum* (rojo), *D. glabra* (azul) y *D. granadillo* (morado). (tomado de Sotuyo et al., 2022).



ANEXO 5. Distribución de la especie *Dalbergia glabra* en México, según la base de datos The Global Biodiversity Information Facility (GBIF) (2021).



ANEXO 5.1. Distribución de la especie *Dalbergia cubilquitzensis* en México, según la base de datos The Global Biodiversity Information Facility (GBIF) (2021).