



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

EL ANÁLISIS DE LA GENÉTICA MOLECULAR
REVELA PATRONES CONTRASTANTES DE LA
ESTRUCTURA POBLACIONAL, LA DIVERGENCIA
MEDIADA ECOLÓGICAMENTE Y LA DISPERSIÓN A
LARGA DISTANCIA EN PALMERAS ICÓNICAS DE
AMÉRICA DEL NORTE

TESIS

Que para obtener el grado de

Doctor en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Ecología)

Presenta

Anastasia Klimova

La Paz, Baja California Sur, Febrero de 2018

ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12 horas del día 29 del Mes de Enero del 2018, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

" El análisis de la genética molecular revela patrones contrastantes de la estructura poblacional, la divergencia mediada ecológicamente y la dispersión a larga distancia en palmeras icónicas de América del Norte "

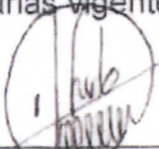
Presentada por el alumno:

Anastasia Klimova

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Ecología

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

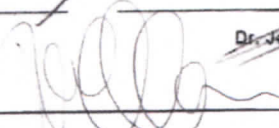
LA COMISIÓN REVISORA

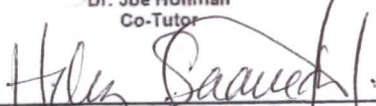

Dr. Alfredo Ortega Rubio


Dr. Eduardo Romero Vivas


Dra. Patricia Galina Tessaro


Dr. José Luis León de la Luz


Dr. Joe Hoffman
Co-Tutor


Dra. Norma Yolanda Hernández Saavedra,
Directora de Estudios de Posgrado y
Formación de Recursos Humanos

Comité Tutorial

Dr. Alfredo Ortega Rubio
Director de Tesis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Dr. Eduardo Romero Vivas
Co-Tutor
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Dra. Patricia Galina Tessaro
Co-Tutor
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C.

Dr. José Luis León de la Luz
Co-Tutor
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C..

Dr. Joe Hoffman
Co-Tutor
Universidad de Bielefeld, Bielefeld, Alemania.

Comité Revisor De Tesis

Dr. Alfredo Ortega Rubio
Dr. Eduardo Romero Vivas
Dr. José Luis León de la Luz
Dra. Patricia Galina Tessaro
Dr. Joe Hoffman

Jurado De Examen

Dr. Alfredo Ortega Rubio
Dr. Eduardo Romero Vivas
Dr. José Luis León de la Luz
Dra. Patricia Galina Tessaro
Dr. Ricardo Vázquez Juárez

Suplente

Dra. Aurora Breceda Solís Cámara

Resumen

Los estudios comparativos de especies co-distribuidas y con los requisitos ecológicos similares pueden proporcionar información valiosa sobre los procesos que afectan la estructura de la población, y de ese modo ayudar a dilucidar los mecanismos potenciales por los cuales las poblaciones contemporáneas pueden responder a los cambios ambientales actuales y futuros. En este sentido, la península de Baja California, con su variedad de paisajes y hábitats que van desde bosques caducifolios tropicales y oasis méxicos hasta montañas de matorral xérico y llanuras áridas, es de interés particular. Los complejos procesos geológicos y ecológicos que han generado altos niveles de diversidad biológica y endemismo en Baja California han sido objeto de un intenso estudio. Sin embargo, aún se sabe relativamente poco sobre la filogeografía y la estructura genética de las especies emblemáticas de palmas endémicas de esta región. Las poblaciones de palmeras en la Baja California son consideradas reliquias de poblaciones históricamente más extendidas y continuas que ahora están confinadas en gran parte a sitios donde existe agua permanente ya sea sobre o debajo del suelo. Actualmente, hay dos géneros nativos de palma de América del Norte, *Washingtonia* y *Brahea* presentes en la península de Baja California. Sin embargo, a pesar del estatus emblemático de estas palmas del desierto, muchos aspectos de su taxonomía, límites de especies y estructura de la población siguen siendo ambiguos. Dichas palmas proporcionan un sistema atractivo para investigar las contribuciones de efectos neutros, no neutrales y mediados por humanos hacia la estratificación de la población en un contexto comparativo. Por lo tanto, en la presente tesis se utilizó tanto la secuenciación clásica de Sanger como el enfoque de Genotipificación por Secuenciación (GBS) para proporcionar una perspectiva genómica sobre la estructura poblacional de dos géneros icónicos de palma de América del Norte, *Washingtonia* y *Brahea*, en la península de Baja California, el territorio continental adyacente e Isla Guadalupe. Los resultados revelaron algunas similitudes, así como sorprendentes diferencias, no solo en la fuerza y el patrón de la estructura poblacional, sino también en los posibles impulsores subyacentes. Se evidenció que las palmas *Washingtonia* y *Brahea* presentan bajos niveles de diversidad genética y están altamente estructuradas, con las principales regiones geográficas aisladas genéticamente. No obstante, se encontró apoyo mixto para las relaciones taxonómicas actualmente reconocidas dentro de cada género. Por ejemplo, el análisis filogenético Bayesiano apoyó la clasificación de *B. edulis* como una especie distinta, pero este no fue el caso de *W. filifera*-*W. robusta* y *B. armata*-*B. brandegeei*. A nivel poblacional, los datos de secuencias no fueron particularmente útiles debido a la baja diversidad y discordancia entre los datos de cloroplastos y nucleares. GBS, por otro lado, presentó una resolución más alta y permitió hacer varios hallazgos importantes. Por ejemplo, se descubrieron dos poblaciones distintas de *Washingtonia* en la península de Baja California y también se identificó un conjunto de loci atípicos que resolvió una filogenia contrastante con los loci neutrales, consistente con una fuerte divergencia mediada

ecológicamente. Por el contrario, las palmas de *Brahea* estaban fuertemente estructuradas, con GBS resolviendo con éxito sierras individuales (cadenas montañosas) en la península junto con un fuerte señal de aislamiento por distancia. Finalmente, se encontraron elementos que prueban eventos de dispersión a larga distancia en *Washingtonia* pero no en *Brahea*, en apoyo de la hipótesis que sostiene que los humanos podrían haber dispersado a *Washingtonia* como fuente de alimentos y materiales de construcción. En general, nuestro estudio demuestra el poder de GBS en combinación con un enfoque comparativo para dilucidar patrones de divergencia del genoma marcadamente distintos, mediados por diversos efectores.

Palabras clave: *Arecaceae*, península de Baja California, genotipificación por secuenciación (GBS), dispersión mediada por humanos, polimorfismo de un solo nucleótido (SNP)

Vo. Bo. Dr. Alfredo Ortega Rubio
Director de tesis

Summary

Comparative studies of co-distributed species with similar ecological requirements can provide powerful insights into the processes that affect population structure and thereby help to elucidate the potential mechanisms by which contemporary populations may respond to current and future environmental changes. In this regard, the Baja California peninsula, with its heterogeneous array of landscapes and habitats varying from tropical deciduous forests and mesic oases to xeric desert scrub mountains and low altitude arid plains, is of particular interest. The complex geological and ecological processes that have generated high levels of biological diversity and endemism in the Baja California have been the subject of intensive study. However, relatively little is still known about phylogeography and population genetics structure of the iconic endemic palm species of this region. Palm populations on the Baja California are widely considered to be relicts of historically more widespread and continuous populations that are now largely confined to sites where permanent water exists either above or below the ground. Currently, there are two native North American palm genera, *Washingtonia* and *Brahea* present on the Baja peninsula. However, despite the emblematic status of these desert palms, many aspects of their taxonomy, species limits and population structure remain ambiguous. These palms provide an attractive system for investigating the contributions of neutral, non-neutral and human-mediated effects towards population stratification in a comparative context. We therefore used both the classical Sanger sequencing and GBS approaches to provide a genome-wide perspective on the comparative species and population structure of two iconic North American palm genera, *Washingtonia* and *Brahea*, on the Baja California peninsula, the adjacent Mexican mainland and Guadalupe Island. Our results reveal some similarities, as well as striking differences, not only in the strength and pattern of population structure, but also in the likely underlying drivers. We found that *Washingtonia* and *Brahea* palms had low levels of genetic diversity and were highly structured, with the major geographic regions being genetically isolated. Nonetheless, mixed support was found for currently recognized taxonomic relationships within each genus. For example, Bayesian phylogenetic analysis supported the classification of *B. edulis* as a distinct species but this was not the case for *W. filifera*–*W. robusta* and *B. armata*–*B. brandegeei*. At the population level sequence data was not particularly useful due to low diversity and discordances between chloroplast and nuclear data. GBS, on the other hand, presented higher resolution and allowed several important findings to be made. For example, we uncovered two distinct *Washingtonia* populations on the Baja peninsula and also identified a suite of outlier loci that resolved a contrasting phylogeny to the neutral loci, consistent with strong ecologically mediated divergence. By contrast, *Brahea* palms were strongly structured, with GBS

successfully resolving individual sierras (mountain ranges) on the peninsula coupled with strong isolation by distance signal. Finally, we found clear evidence for long-distance dispersal events in *Washingtonia* but not in *Brahea*, in support of the hypothesis that humans may have dispersed *Washingtonia* as a source of food and building materials. Overall, our study demonstrates the power of GBS in combination with a comparative approach to elucidate markedly different patterns of genome-wide divergence mediated by a variety of different effectors.

Key words: *Arecaceae*, Baja California peninsula, genotyping by sequencing (GBS), human-mediated dispersal, single nucleotide polymorphism (SNP)

Vo. Bo. Dr. Alfredo Ortega Rubio
Director de tesis

Agradecimientos

A todas las instituciones que posibilitaron la realización de mi trabajo.

A CONACyT, por el otorgamiento de la beca de manutención (No. 390503), y al CIBNOR por ser la institución en la cual se me permitió llevar a cabo los estudios y darme la formación necesaria, así como por apoyo otorgado. A Universidad de Bielefeld y al Dr. Joe Hoffman, por la oportunidad de trabajar en su laboratorio y todo el apoyo que me ha brindado.

A los proyectos Red Temática de Investigación del proyecto CONACyT # 280030, y el proyecto de Ciencia Básica CONACYT # 251919 (liderados por el Dr. Alfredo Ortega Rubio) por los fondos necesarios.

Al Dr. Alfredo Ortega Rubio, por todos los conocimientos adquiridos de su parte durante mi formación, pero principalmente por haberme dado la oportunidad de realizar mi trabajo.

A mis cotutores, el Dr. Eduardo Romero Vivas, Dr. José Luis León de la Luz y la Dra. Patricia Galina Tessaro, por todos los consejos que contribuyeron a mejorar el presente trabajo.

También a los técnicos del Herbario del CIBNOR, el Dr. Alfonso Medel Narváez y Dr. Raymundo Domínguez Cadena, por apoyo durante la recolecta de muestras.

Al técnico de Laboratorio de Biología Molecular, el Dr. Jesús Neftalí Gutiérrez Rivera, por apoyo en el trabajo de laboratorio.

Contenido	
Resumen	i
Abstract	iii
Agradecimientos	v
Lista de figuras	viii
Lista de tablas	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
3. JUSTIFICACIÓN	11
4. HIPÓTESIS	12
5. OBJETIVOS	12
5.1 Objetivo general.....	12
5.2 Objetivos particulares.....	12
6. MATERIAL Y MÉTODOS	13
6.1 Evaluación de la utilidad de genes nucleares y de cloroplasto en estudios genéticos de <i>Washingtonia</i> y <i>Brahea</i>	13
6.1.1 Trabajo de campo.....	13
6.1.2 Aislamiento de secuencias nucleares y de cloroplasto.....	17
6.2 Límites de distribución, variabilidad y estructura genética de palmas nativas de la península de Baja California e Isla Guadalupe, mediante marcadores convencionales.....	18
6.2.1 Variabilidad genética.....	18
6.2.2 Límites de distribución y estructura genética.....	18
6.3 Relaciones taxonómicas dentro de <i>Washingtonia</i> y <i>Brahea</i> distribuidas en la península de Baja California e Isla Guadalupe y los límites geográficos de cada especie en la península, mediante marcadores SNPs.....	21
6.3.1 Aislamiento de SNPs.....	21
6.3.2 Análisis de secuencias crudas.....	21
6.3.3 Análisis filogenético.....	22
6.4 Estructura poblacional y conectividad genómica de las poblaciones de dos géneros de palmas: <i>Washingtonia</i> y <i>Brahea</i> , mediante los marcadores SNPs.....	23
6.4.1 Estructura poblacional y pruebas de asignación.....	23
6.4.2 Divisiones de las poblaciones y modelos de migración.....	25
6.5 Efectos ecológicos sobre el aislamiento y la divergencia genómica de las poblaciones de <i>Washingtonia</i> y <i>Brahea</i> en la península de Baja California.....	26
6.5.1 Aislamiento por distancia y la divergencia ecológica.....	26
6.5.2 Detección de <i>loci</i> atípicos asociados a las variables ambientales.....	27
6.5.3 Modelado de nicho ecológico (ENM).....	28
7. RESULTADOS	31
7.1 Evaluación de la utilidad de genes nucleares y de cloroplasto en estudios genéticos de <i>Washingtonia</i> y <i>Brahea</i>	31

7.1.1 Trabajo de campo.....	31
7.1.2 Aislamiento de secuencias nucleares y de cloroplasto.....	31
7.2 Límites de distribución, variabilidad y estructura genética de palmas nativas de la península de Baja California e Isla Guadalupe, mediante marcadores convencionales.....	32
7.2.1 Variabilidad genética.....	32
7.2.2 Límites de distribución y estructura genética.....	33
7.3 Relaciones taxonómicas dentro de <i>Washingtonia</i> y <i>Brahea</i> distribuidas en la península de Baja California e Isla Guadalupe y los límites geográficos de cada especie en la península, mediante marcadores SNPs.....	43
7.3.1 Aislamiento de SNPs y Análisis de secuencias crudas.....	43
7.3.2 Análisis filogenético.....	43
7.4 Estructura poblacional y conectividad genómica de las poblaciones de dos géneros de palmas: <i>Washingtonia</i> y <i>Brahea</i> , mediante los marcadores SNPs.....	45
7.4.1 Estructura de la población y pruebas de asignación.....	46
7.4.2 Divisiones de las poblaciones y modelos de migración.....	52
7.5 Efectos ecológicos sobre el aislamiento y la divergencia genómica de las poblaciones de <i>Washingtonia</i> y <i>Brahea</i> en la península de Baja California.....	55
7.5.1 Aislamiento por distancia y la divergencia ecológica.....	55
7.5.2 Detección de loci atípicos asociados a las variables ambientales.....	56
7.5.3 Modelado de nicho ecológico (ENM)	59
8. DISCUSIÓN	64
8.1 Delimitación de las especies.....	64
8.2 Patrones de diversidad y estructura genética a nivel poblacional.....	67
8.3 Estructura genética de escala fina.....	71
8.4 Divergencia ecológica.....	74
8.5 Congruencia con los escenarios históricos.....	76
9. CONCLUSIONES	79
10. LITERATURA CITADA	80

Lista de figuras

Figura 1. Mapas que muestran los oasis (puntos negros) y las sierras (formas de color) de los cuales (a) *Washingtonia* y (b) *Brahea* fueron recolectadas. Los nombres completos de los oasis y el tamaño de las muestras se presentan en la tabla I. Los colores corresponden a especies (tal como se definen en Minich *et al.*, 2011): (a) *W. robusta* en la península de Baja California y continente de México, y *W. filifera* en SJ; (B) *B. edulis* en la Isla Guadalupe (GI), *B. armata* en SL, SA, CAT, SSPM y SJ, y *B. brandegeei* en SLL, SM, SPP y SSF.....16

Figura 2. Mapas de la península de Baja California. Panel (a) Baja California y Sonora continental con poblaciones de *Washingtonia* muestreadas. Cada uno de los mapas representa un escenario hipotético de divergencia probado con AMOVA. Las regiones definidas *a priori* están separadas por tres rupturas filogenéticas hipotéticas. Panel (b) Baja California y la Isla Guadalupe con poblaciones de *Brahea* muestreadas. Cada uno de los mapas representa un escenario hipotético de divergencia probados con AMOVA. Las regiones definidas *a priori* están separadas por tres rupturas filogenéticas hipotéticas. Las flechas indican especies o cada una de las nueve sierras muestreadas.....20

Figura 3. Las curvas de acumulación de haplotipos. Los intervalos de confianza del 95% se muestran como barras de error. El panel (a) muestra una curva de acumulación de haplotipos para las secuencias de cloroplastos y el panel (b) para las secuencias nucleares de *Washingtonia* y *Brahea*.....33

Figura 4. Distribución de especie y distribución geográfica de haplotipos de cloroplastos de *Washingtonia* y *Brahea*. El panel (a) muestra una red de haplotipos en la que el tamaño de cada gráfico circular es proporcional al número de individuos que llevan el haplotipo. Cada marca en las líneas continuas indica una única mutación de ADN. Los colores que se muestran en el cuadro corresponden a delineaciones de especies basadas en caracteres morfológicos como se describe en Minnich *et al.* (2011). Distribución geográfica de los haplotipos de cloroplastos de (b) muestras de *Washingtonia* y (c) *Brahea*. En los paneles (b) y (c) los colores corresponden a los diferentes haplotipos.....34

Figura 5. Distribución de especies y distribución geográficas de los haplotipos nucleares de *Washingtonia* y *Brahea*. El panel (a) muestra una red de haplotipos en la que el tamaño de cada gráfico circular es proporcional al número de individuos que llevan el haplotipo. Cada marca en las líneas continuas indica una única mutación de ADN. Los colores que se muestran en el cuadro corresponden a delineaciones de especies basadas en caracteres morfológicos como se describe en Minnich *et al.* (2011). Distribución geográfica de los haplotipos

nucleares de (b) muestras de *Washingtonia* y (c) *Brahea*. En los paneles (b) y (c) los colores corresponden a los diferentes haplotipos.....36

Figura 6. Agrupación Bayesiana de individuos de *Washingtonia* y *Brahea* según lo estimado con BAPS sin considerar la información geográfica: (a) cloroplasto y (b) datos nucleares. Las abreviaturas: BB (Cabo) - *B. brandegeei* de Sierra Laguna, BEL - *B.elegans*, BB - *B.brandegeei*, BA - *B.armata*, BE - *B.edulis*, WF - *W.filifera*, WR - *W.robusta*.....41

Figura 7. Análisis de agrupamiento espacial Bayesiano de las muestras de *Washingtonia* y *Brahea* utilizando teselación de Voronoi como se implementa en BAPS. Cada panel representa los géneros y marcadores correspondientes: (a) *Washingtonia spp.* datos de cloroplasto, (b) *Brahea spp.* datos de cloroplasto, (c) *Washingtonia spp.* datos nucleares, y (d) *Brahea spp.* datos nucleares. Los colores corresponden a los grupos recuperados con el análisis.....42

Figura 8. Árbol filogenético basado en la información de SNPs. Los colores representan especies de *Washingtonia* y *Brahea* como se describe en Minnich *et al.* (2011). Los números sobre las ramas corresponden al soporte bootstrap.....44

Figura 9. Reconstrucción filogenética Bayesiana basada en un subconjunto de individuos de *Washingtonia* y *Brahea* seleccionados al azar. Panel (a) las muestras de *Washingtonia* y *Brahea* en conjunto; panel (b) las muestras de *Washingtonia*; panel (c) las muestras de *Brahea*. Los colores representan especies de *Washingtonia* y *Brahea* como se describe en Minnich *et al.* (2011)45

Figura 10. Estructura de la población de las palmas de *Washingtonia* estimado usando datos SNPs. Los paneles (a) y (b) muestran los resultados del análisis de agrupamiento Bayesiano en sNMF. Los gráficos de pastel indican la distribución geográfica de seis grupos genéticos inferidos (cada uno codificado por un color diferente) mientras que los coeficientes de pertenencia individuales se muestran en el gráfico de barras. El panel (c) muestra una red filogenética generada en SPLITSTREE.....49

Figura 11. Estructura poblacional de *Brahea*. El panel (a) muestra las membresías del clúster del conjunto de datos completo, mientras que (b) muestra los resultados equivalentes restringidos solo a los individuos de la Isla Guadalupe. El panel (c) muestra la distribución geográfica de los grupos genéticos inferidos dentro de la Isla Guadalupe. Los paneles (d) y (e) muestran los resultados del análisis de agrupamiento Bayesianos dentro de sNMF. Los gráficos de pastel indican la

distribución geográfica de tres grupos genéticos inferidos (cada uno codificado por un color diferente) mientras que los coeficientes de pertenencia individuales se muestran en el gráfico de barras.....50

Figura 12. Redes filogenéticas que representan las relaciones entre individuos de *Brahea* de (a) la península de Baja California y la Isla Guadalupe; y (b) solo de la península de Baja California. En el segundo panel, los grupos coloreados y abreviaciones corresponden a las nueve sierras de las que se tomaron las muestras.....51

Figura 13. Resultados de los análisis Bayesianos de la estructura de la población estimados dentro de BAPS utilizando marcadores SNPs para (a) *Washingtonia*; (b) *Brahea*, y (c) el conjunto de datos de *Brahea* después de excluir la Isla Guadalupe. Las líneas negras separan diferentes sierras. Los colores de las graficas representan los grupos genéticos inferidos.....52

Figura 14. Árboles de máxima verosimilitud que muestran patrones de divergencia genética entre (a) palmas de *Washingtonia* agrupadas en ocho sierras y (b) palmas de *Brahea* agrupadas en nueve poblaciones con individuos de la Isla Guadalupe utilizados como grupo externo. Los eventos de migración inferidos están indicados por líneas discontinuas, con la dirección del flujo de genes indicada por flechas e intensidad de color que refleja la intensidad del flujo de genes.....53

Figura 15. Aumento de la probabilidad logarítmica en función de número de eventos de migración entre uno y diez estimado en TREEMIX para *Washingtonia* en gris y para *Brahea* en negro. Los asteriscos indican el punto después del cual las comparaciones sucesivas de los valores de verosimilitud logarítmica se vuelven no significativos (pruebas de verosimilitud, $P > 0.05$).....54

Figura 16. Redes filogenéticas construidas por separado para (a) *Washingtonia* usando *loci* neutrales; (b) *Washingtonia* usando *loci* atípicos (asociados significativamente con temperatura); (c) *Brahea* usando *loci* neutrales; y (d) *Brahea* usando *loci* atípicos (asociados significativamente con precipitación).....57

Figura 17. Árboles filogenéticos para *Washingtonia* basados en tres subconjuntos diferentes de 252 *loci* neutrales seleccionados aleatoriamente.....58

Figura 18. Árboles filogenéticos para *Brahea* basados en tres subconjuntos diferentes de 373 *loci* neutrales seleccionados al azar.....59

Figura 19. Probabilidad de ocurrencia de *Washingtonia* en Baja California: (a) en la actualidad; (b) durante el Holoceno medio; (c) durante el último máximo glacial; (d) durante el último interglacial. Ver el texto principal para más detalles.....61

Figura 20. Probabilidad de ocurrencia de *Brahea* en Baja California: (a) en la actualidad; (b) durante el Holoceno medio; (c) durante el último máximo glacial; (d) durante el último interglacial. Ver el texto principal para más detalles.....62

Figura 21. Diagrama de pruebas de identidad de nicho ecológico entre *Washingtonia* y *Brahea* cuantificado usando (a) la distancia Hellinger estandarizada, H y (b) Schoener's D . Las líneas verticales en cada gráfica representan los valores reales de superposición de nicho, mientras que los histogramas representan aquellos de 1,000 pseudoreplicados.....63

Lista de tablas

- Tabla I.** Las poblaciones de *Washingtonia* y *Brahea* incluidas en el presente estudio, con geo-referencias y el número de muestras analizadas para cada uno de los métodos (SNP, secuencias de cloroplasto y nucleares).....13
- Tabla II.** Estadísticos descriptivos de (a) cloroplasto y (b) secuencias nucleares aisladas de cinco especies de palma. Incluye: n número de muestras; número de haplotipos; número de sitios variables; h-diversidad de haplotipos y π -diversidad de nucleótidos. Se excluyeron *B. elegans* de estos análisis.....32
- Tabla III.** Estimaciones de diferenciación genética entre ocho poblaciones de *Washingtonia*. Los valores pares de F_{st} y Φ_{st} (por encima y por debajo de la diagonal, respectivamente) se muestran por separado para (a) cloroplasto y (b) gen nuclear. Valores P corregidos por FDR: * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001. La codificación corresponde a las sierras muestreadas (Fig. 1 y Tabla I para más detalles).....37
- Tabla IV.** Estimaciones de diferenciación genética entre las diez poblaciones de *Brahea* basados en los datos nucleares. Los valores de F_{st} y Φ_{st} se muestran por encima y por debajo de la diagonal, respectivamente. Valores P corregidos por FDR: * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001. La codificación corresponde a las sierras muestreadas (Fig. 1 y Tabla I para más detalles).....38
- Tabla V.** Estimaciones de la diferenciación genética entre las tres especies de *Brahea* (Minich *et al.*, 2011). Los valores de F_{st} y Φ_{st} se muestran por encima y por debajo de la diagonal, respectivamente. Valores P corregidos por FDR: * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001.....38
- Tabla VI.** Resultados de análisis de varianza molecular (AMOVA) para *Washingtonia spp.* basado en (a) cloroplasto y (b) datos nucleares. El conjunto de datos dividido en especies taxonómicamente designadas, tres regiones geográficas principales y ocho poblaciones.....39
- Tabla VII.** Resultados de análisis de varianza molecular (AMOVA) para *Brahea spp.* basado en los datos nucleares. El conjunto de datos dividido en especies taxonómicamente designadas, *B. brandegee* restringida a SLL y diez poblaciones.....40

Tabla VIII. Estimaciones de diferenciación genética para <i>Washingtonia</i> entre sierras usando marcadores SNPs. El <i>Fst</i> y los valores de P asociados después de la corrección de FDR se muestran arriba y debajo de la diagonal, respectivamente (* P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001).....	46
Tabla IX. Estimaciones de diferenciación genética para <i>Brahea</i> entre sierras usando marcadores SNPs. El <i>Fst</i> y los valores de P asociados después de la corrección de FDR se muestran arriba y debajo de la diagonal, respectivamente (* P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001).....	47
Tabla X. Resultados de las pruebas de asignación de individuos a las sierras de la procedencia implementadas en GENODIVE y STRUCTURE, para (a) <i>Washingtonia</i> y (b) <i>Brahea</i>	47
Tabla XI. Resultados de las pruebas de mezcla de tres poblaciones para <i>Washingtonia</i> . Solo se muestran puntajes Z por debajo de -1.96, P <0.05.....	55
Tabla XII. Los resultados de pruebas de mantel y mantel parcial que resumen las relaciones (r) y los valores de P entre la distancia genética, la distancia geográfica y las variables climáticas en <i>Washingtonia</i> y <i>Brahea</i>	56
Tabla XIII. Las contribuciones relativas de diferentes variables ambientales a los modelos MAXENT de la distribución contemporánea de <i>Washingtonia</i> y <i>Brahea</i>	60

1. INTRODUCCIÓN

La península de Baja California es uno de los lugares en la Tierra más activos geológicamente. Durante los últimos 6 millones de años la península ha sido objeto de movimientos de placas tectónicas, separación del continente, subducción y elevación. Por otro lado, durante el pleistoceno (últimos dos millones de años), las reiteradas fluctuaciones climáticas han moldeado la composición de comunidades biológicas y el rango de distribución de muchas especies de organismos, particularmente de plantas, afectando su diversidad y estructura genética (Hewitt, 2000). La última transición en la península fue hace unos 15-18 mil años cuando las condiciones de bosques subtropicales y pastizales cambiaron hacia una vegetación xérica de arbustos desérticos y precipitación errática (Axelrod, 1979). Varios trabajos sobre biota de la península han revelado una historia biogeográfica intrincada, la cual incluye eventos vicariantes, dispersión gradual y aislamiento por distancia, así como expansión-reducción del rango de distribución (Fehlberg y Ranker, 2009; Nason *et al.*, 2002; Riddle *et al.*, 2000). Sin embargo, pocos estudios se han enfocado en aclarar la demografía histórica y la estructura genética de especies relictas; especies que aunque tienen afinidades tropicales han sobrevivido en la península de Baja California en pequeños sitios mésicos como son los oasis (Bernardi *et al.*, 2007; González-Rubio *et al.*, 2016; Grismer y McGuire, 1993; Grismer, 1994; Riddle *et al.*, 2000). Hoy en día el enfoque genómico ofrece una oportunidad única para estudios de las especies y poblaciones, y representa una herramienta revolucionaria en comparación con marcadores genéticos convencionales. Mediante el uso de los marcadores distribuidos en todo el genoma es posible caracterizar historias demográficas de especies y poblaciones, así como obtener perspectivas únicas sobre los mecanismos genéticos de la adaptación y especiación (Luikart *et al.*, 2003; Nadeau y Jiggins, 2010; Rietzel *et al.*, 2013).

El principal propósito del presente trabajo es utilizar los marcadores genéticos y genómicos para profundizar el estudio de las especies y poblaciones de palmas nativas de la península de Baja California. Se abordan los temas de distribución y diversidad de dos géneros de palmas nativas (*Washingtonia* y *Brahea*), su estructura poblacional, buscando entender que variables ecológicas han influido en la distribución de dichas especies.

2. ANTECEDENTES

Las evidencias paleo-climáticas indican que a través del tiempo la temperatura de la tierra ha estado en un cambio continuo. Los ciclos glaciales e interglaciares que han caracterizado el periodo Cuaternario (desde 2.6 millones de años hasta el presente) han afectado significativamente la distribución de muchas especies de plantas y animales (Hewitt, 1996, 2004). El análisis de los movimientos históricos de las especies nos puede ayudar a entender como los cambios ambientales, presentes y futuros, afectarían el rango de distribución de las especies, cuáles serían más propensos a extinción, y cuales podrían beneficiarse con el cambio (Feliner, 2011; Stewart *et al.*, 2010). Actualmente, existen estudios que demuestran que el cambio climático inducido por el hombre está causando fragmentación de hábitat, extinción, y cambios en la distribución de muchas especies (Hampe y Jump, 2011; Pepper *et al.*, 2011).

La península de Baja California ha sido considerada una área importante para los estudios de filo y bio-geografía (Hafner y Riddle, 1997, 2011; Leaché *et al.*, 2007; Munguia-Vega, 2011). Varios trabajos han reportado una discontinuidad en la variabilidad genética y frecuencia alélica en la región, revelando procesos de divergencia críptica (Garrick *et al.*, 2009; González-Rubio *et al.*, 2016; Gutiérrez-Flores *et al.*, 2016; Munguia-Vega, 2011). En general, las discontinuidades filo-geográficas corresponden a los fenómenos geológicos (Lindell *et al.*, 2006; Munguia-Vega, 2011; Riddle *et al.*, 2000). Por ejemplo, Riddle *et al.* (2000) identificaron dos eventos geológicos principales asociados con la historia evolutiva de la biota de la región: el primero se refiere a las fuerzas tectónicas que dieron lugar al Golfo de California y separaron una parte estrecha de la tierra de la parte continental de México. Mientras que el segundo hace referencia a las transgresiones marinas que dieron lugar a dos posibles vías marítimas: una en el Istmo de La Paz, y otra en la mitad de la península. Sin embargo, los procesos ecológicos y biológicos podrían también dejar la misma señal de discontinuidad genética (Grismer, 2002). En este contexto, la estructura genética puede ser

influenciada por los atributos de historia de vida de los organismos en cuestión, tales como la capacidad de dispersión e hibridación (Loveless y Hamrick, 1984). Por lo tanto, el estudio de las fuerzas evolutivas que han estado moldeando la biodiversidad en la península de Baja California representa un reto científico interesante.

Las palmas (*Arecaceae*) son una familia de plantas modelo en estudios evolutivos y ecológicos en los trópicos (Baker y Couvreur, 2013; Couvreur *et al.*, 2011; Kissling *et al.*, 2012a). Debido a las limitaciones funcionales de su biología estructural las palmas no son frecuentes en las zonas áridas o frías (Kissling *et al.*, 2012b; Tomlinson, 2006), y en su mayoría se distribuyen en las regiones tropicales y subtropicales (Couvreur *et al.*, 2011). Sin embargo, las palmas presentan una gran riqueza específica (Eiserhardt *et al.*, 2011) y, a menudo, juegan el papel de especies claves, proporcionando servicios ecosistémicos y moldeando su entorno (Fadini *et al.*, 2009; Peters *et al.*, 2004). La familia *Arecaceae* contienen alrededor de 2,400 especies (Govaerts y Dransfield, 2005) siendo la sexta familia de monocotiledóneas más grande. Aun cuando en las últimas décadas, la taxonomía de esta familia ha sido notablemente mejorada (Couvreur *et al.*, 2011; Dransfield *et al.*, 2008), la controversia persiste (Baker y Couvreur, 2013), especialmente a nivel de géneros cercanos y complejos de especies.

Actualmente en la península de Baja California se distribuyen dos géneros de palmas: *Washingtonia* y *Brahea*. La primera es nativa de la península, mientras que la segunda es nativa de Norte América. Dentro del género *Washingtonia* se reconocen dos especies: *W. robusta* y *W. filifera* (Henderson *et al.*, 1995). Ambas son especies de palma desérticas, que se distribuyen de manera natural desde el sur de California (USA) y por toda la península de Baja California hasta la Región del Cabo. También se ha reportado la existencia de poblaciones pequeñas de *Washingtonia* en Sierra Aguaje, Sonora (México) (Felger y Joyal, 1999; Minnich *et*

al., 2011). En Sonora, *W. robusta* está restringida a unos pocos cañones en el extremo sur del desierto Sonorense y parece representar poblaciones relictas (Felger y Joyal, 1999; Harley, 2006). Se ha indicado que el género necesita una revisión taxonómica moderna más rigurosa (Bacon *et al.*, 2012; Henderson *et al.*, 1995). El último intento de describir las diferencias morfológicas entre las dos especies de *Washingtonia* fue hecho por Bailey (1936), indicando que las especies están muy cercanamente relacionadas y sus diferencias morfológicas son sutiles. Basándose en el análisis de aloenzimas de 16 poblaciones de *W. filifera* en California (McClenaghan y Beauchamp, 1986) no se han encontrado diferencias genéticas entre las poblaciones estudiadas. Los autores concluyeron que una posibilidad es que las poblaciones actuales de palmas en California representan una colonización reciente desde refugios climáticos en la península de Baja California (McClenaghan y Beauchamp, 1986). Desgraciadamente el trabajo mencionado no incluyó ningún individuo de *W. robusta* o de *W. filifera* de la península.

El género *Brahea* incluye nueve especies, de las cuales todas se distribuyen en México, incluyendo una especie endémica de la Isla Guadalupe (Minnich *et al.*, 2011). Dos de estas especies extienden su distribución hasta Belice, Honduras, Nicaragua. Sin embargo, en la península de Baja California se encuentran únicamente dos especies endémicas: *B. armata*, nativa del norte de la península, y *B. brandegeei*, nativa de la parte sur (Bailey, 1937). El rango de distribución de *B. armata* se extiende desde la frontera Estados Unidos-México hacia el sur, hasta la frontera entre los estados de Baja California y Baja California Sur (Franco-Vizcaíno *et al.*, 2007; Wiggins, 1980). *B. brandegeei* se extiende desde el norte de Baja California Sur hasta la Región del Cabo (Felger *et al.*, 2001; Felger y Joyal, 1999). Sin embargo, los límites exactos de la distribución de estas dos especies no están claras debido a las incertidumbres taxonómicas (Felger *et al.*, 2001; Felger y Joyal, 1999). *Brahea* es uno de los géneros de palmas de América menos estudiados y

su variación intra-específica e inter-específica no están claramente descritas (Henderson *et al.*, 1995).

Las poblaciones de *Washingtonia* y *Brahea* generalmente forman comunidades locales, o galerías prolongadas, con individuos que crecen en áreas con presencia de agua superficial o subterránea en los sitios; como por ejemplo en cañones u oasis (Minnich *et al.*, 2011). *Brahea* y *Washingtonia* poseen características únicas, como por ejemplo su distribución del extremo norte de rango de distribución de la familia Arecaceae, o sus adaptaciones para sobrevivir el clima desértico. Sin embargo, poco se sabe sobre sus orígenes, taxonomía, distribución, y particularmente sobre qué variables ecológicas han afectado la distribución y diversidad de estas especies de palmas icónicas.

En las últimas décadas la utilización de marcadores moleculares ha revolucionado los estudios de conservación, ecología, y evolución de diversas clases de organismos. Un ejemplo de las ventajas de la utilización de marcadores moleculares en los estudios de biogeografía, taxonomía y ecología de plantas, y en particular de Arecaceae, son los trabajos realizados en el género *Livistona* (Crisp *et al.*, 2010; Kondo *et al.*, 2012). Los autores de estos trabajos exitosamente estimaron el tiempo de divergencia entre más de 30 especies de *Livistona*, reconstruyeron su historia demográfica y así determinaron el origen del género. Por otro lado, se aclaró el origen de *L. mariae*, una especie de *Livistona* endémica y aislada, descartando la hipótesis de ser una especie relictiva, e incorporando la posible dispersión por la población nativa de Australia (Kondo *et al.*, 2012).

Uno de los métodos más socorridos en estudio de diversidad y relaciones filogenéticas es el uso de código de barras de ADN. El código de barras de ADN usa regiones específicas de ADN para identificar especies mediante el uso de herramientas bioinformáticas. La búsqueda de un código de barras de ADN para plantas ha sido un reto (CBOL Plant Working Group, 2009). El locus mitocondrial

de citocromo oxidasa I (COI) que es rutinariamente utilizado como código de barras para los animales, tienen una utilidad limitada en las plantas, debido a la baja variación, y las diferencias en la estructura del genoma mitocondrial entre especies de plantas (Fazekas *et al.*, 2012). Hasta la fecha, no se ha encontrado un marcador universal único para identificación de especies de plantas, sino un grupo de genes ha sido propuesto y evaluado (psbA-trnH, matK, rbcL, rpoC1, accD, ndhJ, rpoB, ycf5, ITS2 e ITS) (Chen *et al.*, 2010). El Consorcio para el Código de Barras de la Vida (CBOL) llevó a cabo un estudio amplio sobre el desempeño de distintas regiones genómicas como candidatos para un código de barras para plantas (CBOL Plant Working Group, 2009). Este análisis de 907 muestras, incluyendo 445 angiospermas, 38 gimnospermas, 67 especies de criptógamas, y siete loci candidatos, demostró que la utilización de una combinación de dos loci: rbcL + matK cumple con requisitos de un código de barras universal para plantas. En un trabajo posterior que incluyó 6,286 muestras procedentes de 1,757 especies de 75 familias de plantas, se evaluaron los marcadores de código de barras principales rbcL y matK, junto con otros dos marcadores: la región de cloroplasto trnH-psbA y el ADN ribosomal nuclear (nrDNA ITS). La principal conclusión de este trabajo indica que la utilización de la región ITS incrementa la resolución en la identificación de especies desde 55% hasta 70%. Por lo tanto, el uso de ITS puede ser necesario en los estudios que incluyen especies y géneros filogenéticamente relacionados (China Plant BOL Group, 2011; Hollingsworth, 2011). Sin embargo, la región ITS puede presentar varias dificultades (Hollingsworth *et al.*, 2011). En primer lugar, la contaminación por hongos: los primers que se utilizan para la amplificación y secuenciación de ITS en plantas y hongos son lo suficientemente similares, de tal manera que ADN fúngico es a menudo inadvertidamente amplificado (China Plant BOL Group, 2011). Segundo, copias de genes parálogos: la región de ITS puede estar presente en múltiples copias dentro de cada célula. Estas copias generalmente evolucionan de forma concertada, que implica una sola secuencia detectable por planta. Sin embargo, en algunos grupos de plantas, copias divergentes co-ocurren dentro del mismo

individuo. Esto puede dar lugar a la presencia de múltiples variantes, o peor aún, inadvertida secuenciación de diferentes variantes entre las muestras de la misma especie. Este proceso puede llevar a que los miembros de las mismas especies serán separados como especies diferentes (Álvarez y Wendel, 2003). Sin embargo, la principal limitación de la región de ITS es que, a veces, es simplemente difícil de amplificar y secuenciar, con una tasa de recuperación de alrededor de 76 %, lo cual es 10-15% menor que para los otros marcadores de código de barras (Kress *et al.*, 2005). Por lo tanto, se ha sugerido que el desarrollo de códigos de barras de ADN, específico para especies de la familia Arecaceae, sería muy útil para los taxónomos y ecólogos (Valentini *et al.*, 2009).

Además del desarrollo de un marcador universal, se han hecho intentos de desarrollar un marcador para estudios ecológicos y evolutivos exclusivamente de la familia Arecaceae. Así por ejemplo, Bacon *et al.* (2008) evaluaron 96 loci nucleares de los cuales siete parecen ser útiles para estudios a nivel de subfamilias de Arecaceae, y solo cuatro a nivel de género. Por primera vez se llevó a cabo una prueba de código de barras del ADN en Caryoteae (subfamilia Coryphoideae) una tribu asiática de Arecaceae. Los resultados presentados fueron alentadores. La combinación de tres marcadores - matK, rbcL e ITS2 – resultaron en la discriminación exitosa de 92% de especies (Jeanson *et al.*, 2011). Esto indica que tan solo ITS2 tiene poder de discriminación por encima de 90%, sin embargo su éxito de amplificación no supera los 75%. No obstante, Yang *et al.* (2012) al evaluar la utilidad de cuatro marcadores (ITS2, matK, rbcL, trnH-psbA) en el género de palmeras *Calamus* encontraron que la región de ITS2 está presente en varias copias y, por lo tanto, no puede ser considerado para los estudios posteriores de dicho género. Por otro lado, a nivel de especie, el poder de resolución fue diferente entre los loci y bastante bajo: matK (37,5%), rbcL (6,3%) y trnH-psbA (56,3%). Por otro lado, Naeem *et al.* (2014) al estudiar la aplicación de código de barras para estudio de diez especies de Arecaceae indicaron que rbcL tiene un poder de discriminación superior (90%) que matK (66,6%). Sin embargo,

las secuencias de dos especies estrechamente relacionadas como *Phoenix dactylifera* y *P. sylvestris* eran idénticas. Lo que indica que se debe tener cuidado al evaluar los grupos con historia evolutiva reciente o poco conocida.

Aunque los avances en el desarrollo de código de barras pueden beneficiar los estudios de biodiversidad, el descubrimiento de nuevas especies y de la distribución espacial de las especies, este tiene limitantes para el entendimiento más profundo de dinámica y demografía histórica de las poblaciones. Así, la mayoría de estudios moleculares se han limitado a regiones reducidas del genoma (en general uno o dos fragmentos de genes), lo cual implica inferencias limitadas, dificultad en la generalización acerca de los organismos y su historia evolutiva (Luikart *et al.*, 2003; Nadeau y Jiggins, 2010; Narum *et al.*, 2013; Rietzel *et al.*, 2013). Sin embargo, grandes avances en la tecnología de secuenciación masiva (secuenciación de próxima generación o NGS) han dado lugar a la posibilidad de muestrear el genoma a mayor profundidad y observar los patrones de variación genética que resultan de procesos evolutivos neutrales y funcionales como adaptación a una variable ecológica particular (Allendorf *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012; Stapley *et al.*, 2010). Para un estudio de genética de las poblaciones, es deseable incluir decenas, cientos, o incluso miles de individuos. Aunque es posible secuenciar genomas completos de decenas de individuos con genomas pequeños, la secuenciación de cientos de individuos con genomas grandes sigue siendo una opción onerosa. Además, para la mayoría de los estudios, la información generada de secuenciación de genoma completo será innecesaria y simplemente incrementaría los costos computacionales y bioinformáticos. Un avance reciente e importante ha sido el desarrollo de la metodología de Genotipificación por Secuenciación o GBS que permite hacer secuenciación de una fracción sin sesgo del genoma, incluso en especies con genomas grandes o de las que no existe información genética previa (Davey y Blaxter, 2011; Davey *et al.*, 2011). El método de GBS ofrece una perspectiva innovadora en los estudios de genómica poblacional produciendo miles de marcadores polimórficos, distribuidos a lo largo

del genoma y que están sujetos a deriva genética, selección, recombinación, y mutación (Keller *et al.*, 2013; Milano *et al.*, 2014; Narum *et al.*, 2013). Aunque el método de GBS presenta ventajas indiscutibles en comparación con los métodos moleculares convencionales, existen errores y sesgos de la técnica que deberían ser tomados en cuenta. Por ejemplo, la omisión de alelos (allele dropout) se manifiesta cuando se produce un polimorfismo en un sitio de reconocimiento de enzimas de restricción, lo que da como resultado una falla al cortar el ADN genómico en esa ubicación. Los alelos que carecen del sitio de reconocimiento no se secuenciarán y son por lo tanto "alelos nulos". Si ocurre un SNP dentro de un alelo nulo, la falta de secuencia del alelo podría causar errores de genotipo, con individuos heterocigotos para el alelo nulo que aparece como homocigotos. Adicionalmente, GBS como la mayoría de los protocolos de preparación de bibliotecas de secuenciación de próxima generación, tiene una etapa de PCR durante la cual se generan fragmentos de ADN clonal ("PCR duplicados") a partir de los fragmentos de ADN genómicos originales ("fragmentos parentales"). Durante PCR, los procesos estocásticos pueden causar que un alelo amplifique más que el otro en un locus dado. Este sesgo potencial puede conducir a errores de genotipificación en sentido que los heterocigotos pueden aparecer como homocigotos o que un error de amplificación sea considerado como alelo auténtico (Andrews *et al.*, 2016).

Conocer la proporción de intercambio genético entre poblaciones y la distribución espacial de la diversidad genética de las poblaciones de especies silvestres es fundamental para entender la biodiversidad, poder tomar las decisiones de conservación y manejo, así como para poder predecir la respuesta de las poblaciones ante el cambio climático e impacto antropogénico (Botsford *et al.*, 2009; Palumbi, 2003, 2004). Por otro lado, el estudio de la estructura genética de las poblaciones relictas, que sobreviven en refugios climáticos, puede proveer información valiosa acerca de consecuencias evolutivas del cambio climático y procesos ecológicos relacionados tal como la fragmentación de hábitat.

3. JUSTIFICACION

Washingtonia y *Brahea*, son dos géneros icónicos de palmas, nativas de la península de Baja California y de Norte América, respectivamente. Dichas especies de afinidad tropical, han podido prosperar en ambiente desértico y sobrevivir en el límite norte de la distribución principal de la familia Arecaceae. Por otro lado, ambas presentan requerimientos ecológicos parecidos y en muchos sitios en la península comparten el mismo hábitat. Por lo tanto, *Washingtonia* y *Brahea* representan un estudio de caso idóneo de biogeografía y filogeografía comparativas que permitirá identificar que variables ecológicas, geológicas e intrínsecas han sido importantes en la formación de la estructura y diversidad genética de estas especies. Por otro lado, el conocimiento sobre *Washingtonia* y *Brahea* nos puede ayudar a entender como otras especies y poblaciones podrían responder a los cambios ambientales actuales provocados por el hombre.

4. HIPÓTESIS

Debido que las especies de palmas de *Washingtonia* y *Brahea* tienen requerimientos ecológicos parecidos, y ambas han sido sometidas a las mismas fuerzas ecológicas y geológicas, su distribución y estructura genética van a ser similares.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Utilizando métodos moleculares determinar y comparar la distribución, diversidad, estructura poblacional y conectividad genética de dos géneros de palmas (*Washingtonia* y *Brahea*) en la península de Baja California e Isla Guadalupe.

5.2 Objetivos particulares

- Amplificar siete genes de cloroplasto y tres nucleares y determinar su utilidad para los estudios genéticos de *Washingtonia* y *Brahea*.
- Determinar los límites de distribución, variabilidad y estructura genética de las especies de palmas nativas a la península de Baja California e Isla Guadalupe.
- Resolver las relaciones taxonómicas dentro de palmas de *Washingtonia* y *Brahea* distribuidas en la península de Baja California e Isla Guadalupe y delimitar los límites geográficos de cada especie en la península con el uso de los marcadores SNPs.
- Comparar la estructura poblacional y evaluar la conectividad genómica de poblaciones de dos géneros de palmas: *Washingtonia* y *Brahea*, con base en los marcadores SNPs.
- Evaluar los efectos ecológicos sobre aislamiento, divergencia y diversidad genómica de las poblaciones de palmas de *Washingtonia* and *Brahea* nativas de la península de Baja California.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Evaluación de la utilidad de genes nucleares y de cloroplasto en estudios genéticos de *Washingtonia* y *Brahea*

6.1.1 Trabajo de campo

Se llevó a cabo la recolecta de hoja de palma en 42 sitios en la península de Baja California, dos en Sonora, y tres en la Isla Guadalupe (Fig. 1, Tabla I).

Tabla I. Las poblaciones de *Washingtonia* y *Brahea* incluidas en el presente estudio, con geo-referencias y el número de muestras analizadas para cada uno de los métodos (SNP, secuencias de cloroplasto y nucleares).

Genero	Sierra	Sitio de Muestreo	SNPs	Nuclear, 738bp	Cloroplasto, 2,294bp	Latitud	Longitud
<i>Washingtonia</i>	Sierra La Laguna (SLL)	SLL1	4	5	2	23.65115	-109.92985
		SLL2	3	3	3	23.7358694	-109.8433778
		SLL3	3	3	3	23.2783056	-110.0375556
		SLL4	2	3	2	24.0813917	-110.1125667
		SLL5	3	2	1	24.2391583	-110.2031806
	Sierra Mechudo (SM)	SM1	3	3	3	24.3339861	-110.9142389
		SM2	3	3	3	24.4493972	-110.7975083
		SM3	3	5	2	24.47165	-111.0027889
		SM4	3	2	4	24.4929972	-110.8073778
		SM5	3	2	3	24.4941611	-110.8123583
		SM6	2	4	3	24.7703194	-110.7470833
		SM7	3	2	3	24.8121389	-110.8141306
		SM8	2	4	2	24.8485222	-111.0791306
		SM9	3	3	3	24.9908611	-110.964311
	Sierra Giganta (SG)	SG1	2	1	1	25.7176722	-111.4340167
		SG2	3	2	2	25.755778	-111.516958
		SG3	3	3	3	25.935722	-111.409793
SG4		4	3	4	25.97617	-111.466954	

Genero	Sierra	Sitio de Muestreo	SNPs	Nuclear, 738bp	Cloroplasto, 2,294bp	Latitud	Longitud
		SG5	2	3	2	26.0169417	-111.8621472
	Sierra San Pedro (SSP)	SSP1	4	4	3	26.9219139	-112.4075167
	Sonora (SON)	SON1	4	4	4	28.0170417	-111.0553167
		SON2	5	6	5	28.0069472	-111.1305389
	Sierra San Francisco + Sierra Libertad (SFSL)	SFSL1	4	4	3	28.0495	-113.084225
		SFSL2	3	3	4	28.7401417	-113.7531278
	Cataviña (CAT)	CAT1	3	2	3	29.743054	-114.673552
		CAT2	2	3	2	29.749688	-114.742954
	Sierra Juárez (SJ)	SJ1	4	2	2	32.1535667	-115.7888833
		SJ2	2	2	3	32.2634111	-115.8383611
		SJ3	4	3	3	32.3515944	-115.8281667
<i>Washingtonia</i> total	-	-	89	89	81	-	-
<i>Brahea</i>	Isla Guadalupe (GI)	GI1	8	10	7	28.9326278	-118.2837389
		GI2	4	3	3	29.0056861	-118.2495361
		GI3	10	1	7	29.1612556	-118.3213333
	Sierra La Laguna (SLL)	SLL1	2	2	2	23.2218722	-109.8695028
		SLL2	3	2	2	23.228125	-109.8889611
		SLL3	3	2	2	23.2381111	-109.9518333
		SLL4	2	3	3	23.65115	-109.92985
		SLL5	4	2	2	23.6855528	-109.9450639
		SLL6	4	4	3	24.0813917	-110.1125667
		SLL7	3	3	3	24.2391583	-110.2031806
	Sierra Mechudo (SM)	SM1	2	2	2	24.47165	-111.0027889
		SM2	4	3	3	24.7703194	-110.7470833
		SM3	3	4	3	24.8121389	-110.8141306
	Sierra San Pedro (SSP)	SSP1	4	5	3	26.88801	-112.43786
	San Francisco de la Sierra (SSF)	SFS1	7	5	6	27.5942083	-113.0333444
		SFS2	4	1	1	28.0495	-113.084225
	Sierra Libertad (SL)	SL1	4	2	2	28.3109583	-113.5291361
		SL2	1	2	1	28.354546	-113.489647
		SL3	4	3	4	28.7401417	-113.7531278

Genero	Sierra	Sitio de Muestreo	SNPs	Nuclear, 738bp	Cloroplasto, 2,294bp	Latitud	Longitud
	Sierra Asamblea (SA)	SA1	4	4	2	29.2616472	-114.0187889
	Cataviña (CAT)	CAT1	5	2	3	29.743054	-114.673552
		CAT2	3	2	2	29.749688	-114.742954
	Sierra San Pedro Mártir (SSPM)	SSPM1	2	1	2	30.2765917	-115.2237278
		SSPM2	2	1	2	30.3169639	-115.2629694
		SSPM3	2	1	1	30.3240333	-115.2055861
		SSPM4	2	2	2	30.4983778	-115.7677306
	Sierra Juárez (SJ)	SJ1	4	5	5	32.1535667	-115.7888833
		SJ2	1	1	1	32.2634111	-115.8383611
<i>Brahea total</i>	-	-	101	78	79	-	-

En cada localidad se tomaron muestras de 2 a 3 individuos de cada especie de palmas presentes. En el muestreo se incluyó los sitios ubicados en principales sierras de la región: Sierra La Laguna (SLL), Sierra del Mechudo (SM), Sierra la Giganta (SG), Sierra San Pedro (SSP), San Francisco de la Sierra (SSF), Sierra Libertad (SL), Sierra Asamblea (SA), Sierra San Pedro Mártir (SSPM) y Sierra Juárez (SJ) (Fig. 1, Tabla I). Debido a que algunos autores (por ejemplo, Henderson *et al.*, 1995) han argumentado que *B.brandegeei* puede ser sinónimo de *B.elegans* de la parte continental de México, también incluimos un espécimen de herbario de esta especie que fue recolectado en 1997 en Sonora. Los datos genéticos se generaron a partir de muestras de hojas secas preservadas con el gel de sílice, recolectadas en el campo durante los años 2015 y 2016.

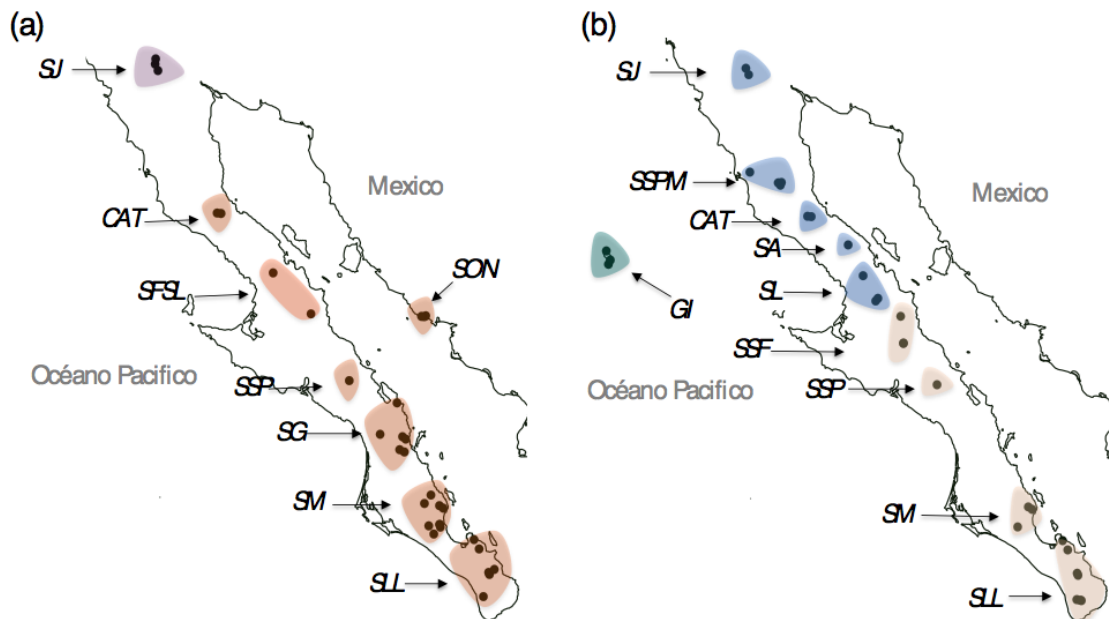


Figura 1. Mapas que muestran los oasis (puntos negros) y las sierras (formas de color) de los cuales (a) *Washingtonia* y (b) *Brahea* fueron recolectadas. Los nombres completos de los oasis y el tamaño de las muestras se presentan en la tabla I. Los colores corresponden a especies (tal como se definen en Minnich *et al.*, 2011): (a) *W. robusta* en la península de Baja California y continente de México, y *W. filifera* en SJ; (B) *B. edulis* en la Isla Guadalupe (GI), *B. armata* en SL, SA, CAT, SSPM y SJ, y *B. brandegeei* en SLL, SM, SPP y SSF.

Los especímenes fueron asignados a taxones basándose en distribuciones de especies dadas por Minnich *et al.* (2011). Dentro de las especies, las poblaciones se definieron en función de la sierra de donde se tomaron las muestras. Para *Washingtonia*, se especificó ocho poblaciones correspondientes a palmas de: México continental (SON), Sierra La Laguna (SLL), Sierra del Mechudo (SM), Sierra Giganta (SG), Sierra San Pedro (SSP), sitios combinados de Sierra Libertad y Sierra San Francisco (SFSL), Cataviña (CAT) y Sierra Juárez (SJ). Para *Brahea*, se especificaron diez regiones geográficas. Nueve de ellas correspondían a

diferentes sierras en la península de Baja California: Sierra La Laguna (*SLL*), Sierra del Mechudo (*SM*), Sierra San Francisco (*SSF*), Sierra San Pedro (*SSP*), Sierra Libertad (*SL*), Sierra Asamblea (*SA*), Cataviña (*CAT*), Sierra San Pedro Mártir (*SSPM*) y Sierra Juárez (*SJ*); la región geográfica final correspondió a la Isla de Guadalupe (*GI*). Para más detalles, véase (Tabla I, Fig. 1).

6.1.2 Aislamiento de secuencias nucleares y de cloroplasto

La extracción de ADN se realizaron utilizando QIAGEN DNeasy planta mini kit (Valencia, CA). Dado que no existe ningún estudio genético a nivel de población de *Washingtonia* o *Brahea*, primero se evaluó la utilidad de tres *loci* nucleares y siete de cloroplasto que se han utilizado previamente en estudios filogenéticos y biogeográficos de *Arecaceae* (Bacon *et al.*, 2008, 2011; CBOL Plant Working Group 2009; Jeanson *et al.*, 2011; Shaw *et al.*, 2005; Taberlet *et al.*, 1991). Se seleccionaron estos *loci* (ITS 2, CISP 4, CISP 8, matK, rbcL, trnT-trnD, trnG-trnS, trnC-rpoB, trnF-trnL, trnM-trnS), basándose en el nivel de diversidad intragénica que ellos poseen. Para el primer ensayo, se utilizaron 40 muestras de cinco especies de las palmas previamente mencionadas y se amplificaron los diez marcadores genéticos vía PCR. Cada reacción de PCR contenía 12,5 μ L, incluyendo 1 μ L de ADN 50-100 ng, 1X de buffer de PCR, MgCl₂ 1,5 mM, 200 mM de mezcla de dNTP, 0,4 mM de cada cebador y 0,5 U de DNA polimerasa GoTaq Flexi (Promega). Los *loci* se amplificaron utilizando cebadores y protocolos de termociclado descritos previamente (Bacon *et al.*, 2008; Jeanson *et al.*, 2011; Shaw *et al.*, 2005; Taberlet *et al.*, 1991). Al final se escogieron cinco *loci* (uno nuclear y cuatro cloroplastos), debido a que resto de marcadores presentaron amplificación o secuenciación deficiente o baja diversidad. Para determinar la utilidad de un marcador se tomaron en cuenta: éxito de amplificación, número de amplicones presentes en el gel de agarosa, éxito de secuenciación y número de sitios polimórficos. Dichos *loci* (CISP 4, matK, trnT-trnD, trnG-trnS, trnF-trnL) fueron amplificados y secuenciados en el resto de las muestras. La presencia de

fragmentos de ADN amplificados, se verificó en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio. Todos los productos de PCR positivos se enviaron a Arizona GeneCore para su secuenciación en ambas direcciones. Las secuencias resultantes se alinearon y se editaron manualmente con BIOEDIT 7 (Hall, 1999). Los cuatro fragmentos de secuencias de cloroplasto se concatenaron en una secuencia única, al igual que las secuencias nucleares, permitiendo que los análisis subsiguientes se llevaran a cabo por separado para estos dos tipos de marcadores.

6.2 Límites de distribución, variabilidad y estructura genética de palmas nativas de la península de Baja California e Isla Guadalupe, mediante marcadores convencionales

6.2.1 Variabilidad genética

Para evaluar si el diseño de muestreo fue eficaz y era suficiente para recuperar la mayor parte de la diversidad genética dentro de las poblaciones estudiadas se construyó las curvas de acumulación de haplotipos. Las cuales fueron construidas por separado para los datos de la secuencia nuclear y cloroplasto usando la función haploAccum en el paquete SPIDER (R Development Core Team, 2008) con un total de 10,000 permutaciones. Las estadísticas de diversidad molecular, incluyendo el número de sitios variables, el número de haplotipos, diversidad de nucleótidos y haplotipos, y el número de haplotipos compartidos se calcularon utilizando DNASP 5.1 (Librado y Rozas, 2009) y ARLEQUIN 3.5.1.3 (Excoffier y Lischer, 2010).

6.2.2 Límites de distribución y estructura genética

Las relaciones filogenéticas entre las muestras fueron inferidas mediante la construcción de una red de haplotipos en POPART (<http://popart.otago.ac.nz>).

También se utilizó GENGIS 2.1.1 (Parks *et al.*, 2009) para visualizar la distribución geográfica de haplotipos.

Para determinar los niveles de divergencia genética entre especies taxonómicas y las poblaciones definidas *a priori* (Fig. 1), se cuantificó la diferenciación utilizando los índices de F_{st} (Weir y Cockerham, 1984) y Φ_{st} (Kimura, 1980). El primer índice sólo toma en cuenta las diferencias de frecuencias de haplotipos (Excoffier *et al.*, 1992), mientras que el segundo también incorpora similitud de secuencias. Los valores de F_{st} y Φ_{st} se calcularon dentro de ARLEQUIN.

También se utilizó el análisis jerárquico de la varianza molecular (AMOVA) para dividir la variación genética dentro de *Washingtonia* y *Brahea* utilizando ARLEQUIN. El AMOVA se empleó para estimar el apoyo relativo para dos escenarios alternativos iguales para palmas *Washingtonia* y *Brahea*, y un escenario específico para cada género de palmas (Fig. 2). El primer escenario se basó en la delimitación taxonómica actual de las especies (es decir, se especificaron dos grupos para *Washingtonia*, correspondientes a *W. filifera* y *W. robusta* y tres grupos para *Brahea* correspondientes a *B. edulis*, *B. armata* y *B. brandegeei*). En segundo lugar, para las palmas de *Washingtonia*, se construyó un escenario basado en el aislamiento de las poblaciones del continente y de la Península después de la formación del Mar de Cortés. Tercero, para las palmas de *Brahea*, se dividió todas las muestras en tres grupos: Isla Guadalupe, región de Cabo (SLL) y resto de la península. En cuarto lugar, para ambos géneros de *Washingtonia* y *Brahea*, se trató cada sierra como una población distinta (es decir, ocho grupos fueron especificados para *Washingtonia* y diez para *Brahea*) (Fig. 2). Cada escenario representó una partición jerárquica de las poblaciones dentro de las regiones estudiadas, y el esquema de anidación que maximizó el componente de varianza entre grupos fue considerado el mejor escenario de divergencia.

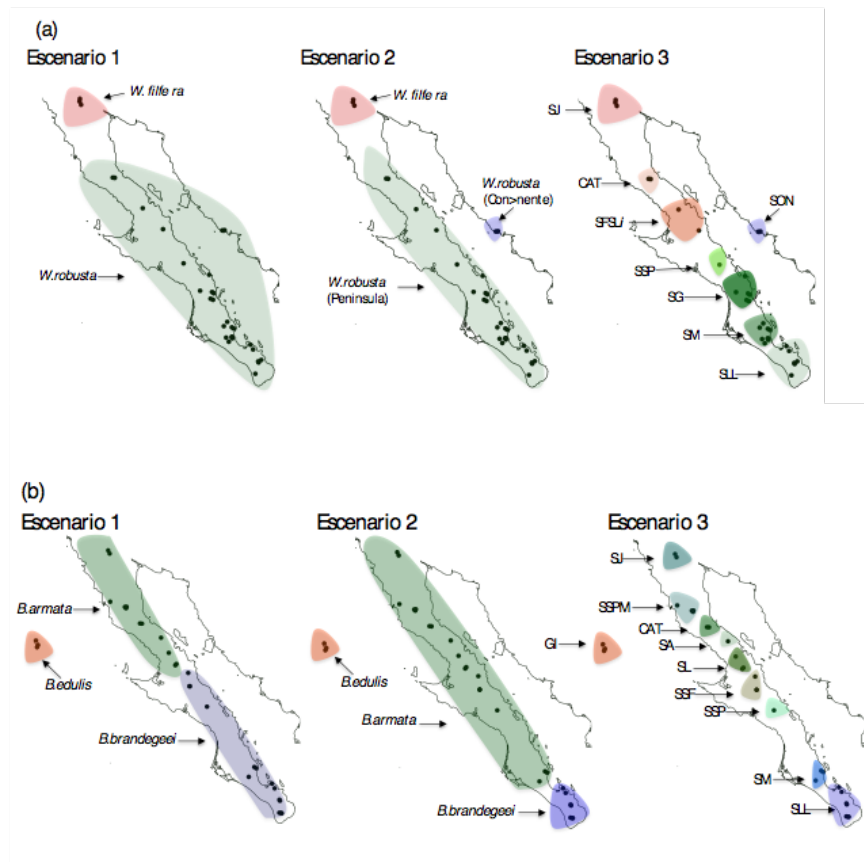


Figura 2. Mapas de la península de Baja California. Panel (a) Baja California y Sonora continental con poblaciones de *Washingtonia* muestreadas. Cada uno de los mapas representa un escenario hipotético de divergencia probado con AMOVA. Las regiones definidas *a priori* están separadas por tres rupturas filogenéticas hipotéticas. Panel (b) Baja California y la Isla Guadalupe con poblaciones de *Brahea* muestreadas. Cada uno de los mapas representa un escenario hipotético de divergencia probados con AMOVA. Las regiones definidas *a priori* están separadas por tres rupturas filogenéticas hipotéticas. Las flechas indican especies o cada una de las nueve sierras muestreadas.

Los análisis de AMOVA y de diferenciación genética no se llevaron a cabo para los datos de cloroplasto de *Brahea*, ya que sólo tres haplotipos estaban presentes y casi todos los individuos compartieron el mismo haplotipo. La muestra única de

B.elegans también se excluyó de estos análisis. Para análisis de AMOVA, se determinó la significación estadística utilizando 10,000 permutaciones.

Finalmente, se utilizó un enfoque bayesiano para estimar el número más probable de clústeres genéticos presentes en los datos utilizando BAPS 6 (Corander *et al.*, 2003, 2008 a,b). Para este análisis, se utilizaron todos los individuos de ambos géneros sin incorporar la información geográfica. Este análisis se realizó utilizando el modelo de mezcla “mixture” para determinar el número más probable de clusters (K). K se fijó entre 1 a 10 y se realizaron cinco repeticiones para cada valor de K. Finalmente, se repitieron el análisis, pero esta vez utilizando los datos de la ubicación geográfica de cada muestra. Los análisis espaciales se realizaron por separado para *Washingtonia* y *Brahea*.

6.3 Relaciones taxonómicas dentro de *Washingtonia* y *Brahea* distribuidas en la península de Baja California e Isla Guadalupe y los límites geográficos de cada especie en la península, mediante marcadores SNPs

6.3.1 Aislamiento de SNPs

Para aislar los marcadores de SNP, el ADN se extrajo de hojas secas usando un protocolo CTAB modificado (Gutiérrez-Rivera, en preparación) y se enviaron 50 µL de ADN de cada muestra al Instituto de Diversidad Genómica de Cornell para la preparación de las bibliotecas genómicas y GBS (Genotipificación por Secuenciación). Cada extracto de ADN se digirió usando la enzima de restricción *Pst*I y posteriormente se ligaron un adaptador específico para cada muestra y un adaptador común a los extremos de los fragmentos. A continuación, se mezclaron las muestras de cada género en dos diferentes bibliotecas genómicas que fueron secuenciadas en un sentido de 100 pb en un carril de un Illumina HiSeq 2000.

6.3.2 Análisis de secuencias crudas

Las secuencias crudas se procesaron utilizando TASSEL 3 (Bradbury *et al.*, 2007) el cual implementa el flujo de trabajo personalizado diseñado específicamente para los datos de GBS descrito en Glaubitz *et al.* (2014). Específicamente, utilizando códigos de barras individuales se colapsaron secuencias únicas para cada individuo. Las etiquetas resultantes se fusionaron en una lista "maestra" y sólo se conservaron aquellas presentes en al menos tres individuos. Posteriormente, se utilizó como referencia el genoma de *Phoenix dactylifera* (palma de dáttil, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) y las etiquetas se alinearon utilizando el software BWA (Li y Durbin, 2009). A continuación, se anotó el número de individuos con etiqueta en la lista maestra. Posteriormente, esta información se utilizó para buscar SNPs con la frecuencia de alelos menores (MAF) mayor a 0.01. Después de la aplicación de estos criterios iniciales, el conjunto de datos variante se filtró para eliminar SNP de cloroplasto y mitocondria, e incluir sólo sitios polimórficos bialélicos sin InDels. Finalmente, los SNP resultantes se dividieron en dos conjuntos de datos correspondientes a los dos géneros de palmas aquí analizados y los *loci* con más del 20% de genotipos faltantes fueron eliminados. La manipulación de los archivos VCF se llevó a cabo utilizando VCFTOOLS (Danecek *et al.*, 2011).

6.3.3 Análisis filogenético

Para resolver las relaciones taxonómicas entre las especies definidas morfológicamente y delimitar los límites geográficos de cada especie, se utilizó dos enfoques filogenéticos. En primer lugar, se construyó un árbol filogenético empleando datos de todas las muestras con el paquete APE en R (Paradis *et al.*, 2004). La función `dist.gene` se usó para calcular distancias genéticas por pares entre las muestras, que luego se agruparon utilizando el método de Ward. Finalmente, los valores de soporte bootstrap para cada uno de los nodos se calcularon en base a 1,000 permutaciones. Con fines comparativos, también se

realizó la reconstrucción filogenética Bayesiana utilizando el paquete SNAPP (Bryant *et al.*, 2012), dentro del programa BEAST 2 (Bouckaert *et al.*, 2014). Debido a limitaciones computacionales se restringió el análisis a una selección aleatoria de tres individuos por población, lo que resultó en 54 individuos que representaron dos géneros de palma. Se usaron los parámetros predeterminados, incluidos los valores para u y v . Se utilizó una única cadena de Markov de Monte Carlo (MCMC) de 2,000,000 de iteraciones, con muestreo cada 1,000 pasos. Después se repitió el mismo análisis, pero por separado en cada género utilizando los mismos parámetros. La mezcla aceptable (tamaño de muestra efectivos de al menos 200) y la convergencia se determinó mediante inspección visual de las muestras posteriores utilizando TRACER (Rambaut *et al.*, 2014). Finalmente con un burn-in del 10% se visualizó la distribución de árboles usando DENSITREE (Bouckaert, 2010).

6.4 Estructura poblacional y conectividad genómica de las poblaciones de dos géneros de palmas: *Washingtonia* y *Brahea*, mediante los marcadores SNPs

6.4.1 Estructura de la población y pruebas de asignación

Las muestras de cada una de las sierras se definieron como poblaciones *a priori*, tal como se describe previamente (Fig. 1). Para estimar la distancia genética entre los sitios, se calculó F_{st} entre todas las sierras por separado para cada género de palma. Esto se implementó utilizando el programa GENODIVE (Meirmans y Tienderen, 2004) con significación estadística determinada sobre la base de 10,000 permutaciones. A continuación, se utilizaron pruebas de asignación para asignar palmas individuales a sus sierras de origen más probable de origen. Para este análisis se utilizó la opción de prueba de asignación individual en GENODIVE (Meirmans y Tienderen, 2004), que implementa el método de Paetkau *et al.* (1995, 2004). Se fijó el umbral alfa a 0.01 y el número de permutaciones a 10,000.

Además, para corroborar los resultados de asignación se utilizó el enfoque Bayesiano de Hubisz *et al.* (2009) en STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000). Para este análisis, se utilizó un inicio de 100,000 iteraciones para minimizar el efecto de la configuración inicial, seguido de 1,000,000 iteraciones con cinco repeticiones y el número de grupos genéticos (k) ajustados al número de sierras de referencia. Las pruebas de asignación se restringieron a sierras que estaban representadas por al menos cinco individuos.

También se utilizó sNMF 1.2 (Frichot *et al.*, 2014) para estimar los coeficientes de mezcla genética individual y para determinar el número más probable de clústeres genéticos (k) presentes en *Washingtonia* y *Brahea*. Se eligió sNMF con preferencia a los otros enfoques más demandantes en poder computacional, ya que utiliza algoritmos rápidos y eficientes que reducen considerablemente la carga computacional sin pérdida apreciable de precisión (Frichot *et al.*, 2014; Popescu *et al.*, 2014). El mejor valor de k se dedujo calculando valores de entropía cruzada de múltiples ejecuciones con k establecido entre 1 y 10. La robustez de los resultados se evaluó mediante la ejecución de cinco repeticiones para el mejor valor de k utilizando un parámetro de regularización α de 1,000.

También realizó el análisis Bayesiano de la agrupación genética espacial utilizando BAPS 6 (Corander *et al.*, 2008 a,b). Este enfoque adicional fue empleado, ya que permite la incorporación de información espacial. Se incorporaron los datos geográficos para todas las muestras y se utilizó la opción de "agrupamiento espacial de individuos" con el número máximo de grupos genéticos (k) establecido en 10. Se realizaron cinco ejecuciones independientes para cada valor de k. Por último, se convirtieron los datos de SNPs en una matriz de distancias genéticas utilizando el paquete STAMPP en R (Pembleton *et al.*, 2013) y se generó una red filogenética utilizando el algoritmo NEIGHBORNET (Bryant y Moulton, 2004) utilizando SPLITTREE 4.14.4 (Huson y Bryant, 2006). Los análisis realizados con sNMF, BAPS y de la red filogenética se llevaron a

cabo con el conjunto completo de datos de *Washingtonia*. Para *Brahea*, se analizó el conjunto de datos completo y también todos los análisis para individuos de la península de Baja California e Isla Guadalupe se repitieron por separado.

6.4.2 Divisiones de las población y modelos de migración

Se utilizó el enfoque de Pickrell y Pritchard (2012) para inferir la historia de las palmas usando datos de frecuencia de alelos como se implementa en TREEMIX 1.12 (Pickrell y Pritchard, 2012). TREEMIX infiere el flujo de genes entre poblaciones al analizar simultáneamente la divergencia y la mezcla genética entre las población. En el árbol resultante de máxima verosimilitud (ML), los eventos de migración están representados por flechas que conectan poblaciones. Los datos de SNP para *Washingtonia* y *Brahea* se convirtieron de un formato de genotipos diploide a un conteo de alelos poblacionales usando la secuencia de comandos python `plink2treemix.py` (disponible con TREEMIX). Cada población estaba representada por individuos de una sierra dada, tal como se describió anteriormente, y las poblaciones más divergentes se especificaron como grupos externos (*SJ* para *Washingtonia* y *GI* para *Brahea*). Primero se generó un árbol de máxima verosimilitud sin eventos de migración basados en 1,000 repeticiones de bootstrap. Luego se probó entre uno y diez eventos de migración por taxón (m1-m10) y se realizaron pruebas de relación de verosimilitud para permitir la comparación por etapas de los valores logarítmicos de probabilidad entre cada par de eventos de migración. Después se llevó a cabo la prueba de la mezcla genética utilizando la "prueba de tres poblaciones" (Patterson *et al.*, 2012) implementado en TREEMIX: cuando el valor de $f_3(X, A, B)$ es negativo, la desviación de "treeness" es detectado y la población denominada X aparece como una mezcla entre poblaciones A y B.

6.5 Estructura poblacional y conectividad genómica de las poblaciones de dos géneros de palmas: *Washingtonia* y *Brahea*, mediante los marcadores SNPs

6.5.1 Aislamiento por distancia y divergencia ecológica

Se sabe que el aislamiento por distancia (IBD) y las barreras de dispersión contribuyen a la estructuración geográfica de la variación genética en muchos organismos. Por lo tanto, se ha utilizado el aislamiento por distancia Web Service 3.23 (Jensen *et al.*, 2005) para llevar a cabo la prueba de Mantel para cada género de palmas separadamente. La distancia geográfica y las distancias genéticas entre individuos fueron calculadas usando el Generador de Matrices de Distancia Geográfica 1.2.3 (Ersts, 2016) y el paquete STAMPP en R (Pembleton *et al.*, 2013), respectivamente. Las adaptaciones locales también pueden manifestarse en correlaciones entre distancias genéticas y variables ambientales (Frankham *et al.*, 2002). Por lo tanto, se utilizaron pruebas de Mantel y Mantel parcial implementadas en el paquete VEGAN 2.4 en R (Oksanen *et al.*, 2016) para probar correlaciones entre distancias genéticas y ambiental, siendo estas últimas generadas usando la función 'dist' en R. Debido a que *Washingtonia* y *Brahea* se distribuyen en el límite norte de la distribución principal de Arecaceae, están afiliados a climas tropicales húmedos, y son sensibles a las heladas, en esta tesis se propone que las variables climáticas tales como la temperatura media del trimestre más frío, la precipitación del trimestre más seco y el índice de aridez tendrán la mayor influencia en estas especies. La información ecológica antes mencionada se obtuvo de WorldClim con una resolución de ~1 km (Hijmans *et al.*, 2005) y de la base de evapotranspiración y aridez potencial global (Zomer *et al.*, 2008) como un conjunto de capas ráster. Se realizaron pruebas de Mantel entre cada matriz de distancia genética y ambiental, y los análisis se repitieron como pruebas parciales de Mantel controlando por distancia geográfica. La significación

estadística se determinó mediante pruebas de Pearson basadas en 10,000 permutaciones de los datos.

6.5.2 Detección de *loci* atípicos asociados con las variables ambientales

Las variables ambientales que mostraron asociaciones significativas con la distancia genética en el análisis anterior (temperatura media del trimestre más frío en *Washingtonia* y precipitación del trimestre más seco en *Brahea*) fueron investigadas más a fondo mediante pruebas para determinar la adaptación local, usando BAYESCENV (Villemereuil y Gaggiotti, 2015), LEA (Frichot *et al.*, 2013; Frichot y François, 2015) y SAMBADA (Stucki *et al.*, 2016). El primero de estos programas implementa un enfoque Bayesiano que utiliza datos genotípicos y salto reversible de la cadena de Markov Monte Carlo para detectar asociaciones entre las frecuencias de los alelos y las variables ambientales (Villemereuil y Gaggiotti, 2015). Dado que BAYESCENV se basa en un modelo escalonado, requiere la especificación del número de poblaciones. Para *Washingtonia* se establecieron las cuatro poblaciones principales identificadas por SPLITSTREE y BAPS que comprenden: (i) sur de la península (*SLL*, *SM*, *SG*), (ii) norte de la península (*SSP*, *SFSL*, *CAT*), (iii) *SJ* y (iv) *SON*. Para *Brahea*, se corrió BAYESCENV dos veces, especificando: (i) dos poblaciones distintas que comprenden Isla Guadalupe y la península de Baja California, y nueve poblaciones en la península identificadas con SPLITSTREE. Se utilizaron veinte pruebas piloto de 5,000 iteraciones cada una, con un burn-in de 50,000 iteraciones y muestras tomadas cada diez iteraciones. Se utilizó una probabilidad para el modelo neutral de 0.5 y una tasa de detección de falsos (FDR) de 5%.

A continuación, se utilizaron el modelo de factor latente mezclado (LFMM) como se implementa en el paquete LEA en R (Frichot y François, 2015). Este enfoque detecta los *loci* que muestran asociaciones inusuales con variables ambientales, en comparación con el fondo genómico. La función de LFMM en LEA se realizó

usando el número de factores latentes ($k=4$) para *Washingtonia* y se realizaron dos ejecuciones separadas para *Brahea*: con $k=2$ con el conjunto de datos completo, y $k=9$ para las palmas peninsulares. Para cada análisis, 10,000 iteraciones del algoritmo de muestreo de Gibbs se ejecutaron con 5,000 iteraciones descartadas como burn-in. Se combinaron el estimador de Z de diez repeticiones independientes, y los valores de probabilidad resultantes se ajustaron a la tasa de descubrimiento de falsos (FDR) como se describe en Benjamini y Hochberg (1995) con un nivel α de 0.05.

Para probar más a fondo las asociaciones entre las variables ambientales y las frecuencias alélicas en *Washingtonia* y *Brahea*, se utilizó un enfoque implementado en SAMBADA (Stucki *et al.*, 2016). Este programa utiliza regresiones logísticas para modelar la probabilidad de observar un genotipo particular dadas las condiciones ambientales en los sitios de muestreo (Joost *et al.*, 2007). Se aplicó el enfoque univariante, donde el modelo considera un genotipo y una variable ambiental, y después los compara con un modelo constante en el que la probabilidad de la presencia del genotipo es la misma en cada lugar del paisaje y es igual a su frecuencia. La significancia estadística se determinó utilizando log-probabilidad y la prueba de Wald (Joost *et al.*, 2007). FDR se aplicó a los valores de probabilidad resultantes con un nivel α de 0.05.

6.5.4 Modelado de nicho ecológico (ENM)

Para entender mejor la dinámica poblacional actual y pasada de las palmas de *Washingtonia* y *Brahea* a lo largo de la península de Baja California e incorporar al estudio un enfoque no genético, se realizó Modelado de Nichos Ecológicos (ENM) usando el método de máxima entropía implementado en MAXENT 3.4.0 (Phillips *et al.*, 2006, 2017). MAXENT intenta estimar una distribución de probabilidad de la ocurrencia de la especie más cercana al uniforme mientras que esta está sujeta a restricciones ambientales (Elith *et al.*, 2011). La información sobre la distribución

geográfica de *Washingtonia* y *Brahea* se basó en un total de 49 y 44 registros de presencia únicos, respectivamente. Se combinaron datos de campo de la presente tesis, información de la ocurrencia natural de *Washingtonia* en los EE.UU., descrita en Cornett *et al.* (1986) y los datos de ocurrencia georeferenciada de gbif.org y bajaflora.org. Cada modelo incluyó siete variables bioclimáticas, que en esta tesis se ha considerado que podrían tener un efecto importante en la distribución de estas especies (temperatura media del trimestre más húmedo, temperatura media del trimestre más seco, temperatura media del trimestre más cálido, temperatura media del trimestre más frío, precipitación del trimestre más seco y precipitación del trimestre más frío). Al restringir el análisis a un subconjunto de las variables más prometedoras, se evitó el sobrecargo potencial del modelo de MAXENT (Peterson y Nakazawa, 2008). Para obtener una mejor perspectiva de los cambios temporales en las distribuciones de las palmas de *Washingtonia* y *Brahea*, se pronosticaron envolturas climáticas adecuadas para cada género utilizando las condiciones ecológicas actuales (1960-1990) y los tres períodos históricos: Holoceno Medio (~ 6.000 años AP), el Último Máximo Glacial (~ 22.000 años AP) y el Último Interglacial (~ 130.000 años AP). Todos los datos bioclimáticos se descargaron de WorldClim como un conjunto de capas ráster con una resolución espacial de 30 s (aproximadamente 1 km) o en el caso de los datos de LGM, 2,5 min (aproximadamente 5 Km) (Hijmans *et al.*, 2005; Otto-Bliesner *et al.*, 2006; Watanabe *et al.*, 2011). Para cada modelo, se utilizó la configuración predeterminada con 30 réplicas. El área bajo la curva de operación del receptor (AUC) se calculó para evaluar la precisión del modelo, con valores entre 0.7 y 0.9 indicando buena discriminación (Swets, 1988). Se realizaron análisis de Jackknife para determinar la contribución relativa de cada variable ambiental al modelo de distribución de corriente proyectada (Phillips, 2017).

Con el fin de determinar si *Washingtonia* y *Brahea* de la península de Baja California ocupan nichos ecológicos idénticos, se realizó una prueba de identidad de nicho con ENMTOOLS 1.4.4 (Warren *et al.*, 2010) con 1,000 pseudoreplicas.

Luego se comparó distribución de similitudes de nicho obtenidas a partir de pares de pseudo-nichos basados en puntos de ocurrencia aleatoriamente muestreados con la superposición de nicho real entre *Washingtonia* y *Brahea* (Warren *et al.*, 2010). Este último se cuantificó utilizando D de Schoener (Schoener, 1968) y la distancia estandarizada de Hellinger (I) (Warren *et al.*, 2008). La D de Schoener asume que las puntuaciones de adecuación son proporcionales a la abundancia de especies, mientras que la de I, de Hellinger, cuantifica las distribuciones de probabilidad de dos modelos de nicho ecológico. Ambas métricas de similitud varían desde 0 (sin superposición de nicho) hasta 1 (nichos idénticos) (Warren *et al.*, 2010).

7. RESULTADOS.

7.1 Evaluación de la utilidad de genes nucleares y de cloroplasto en estudios genéticos de *Washingtonia* y *Brahea*

7.1.1 Trabajo de campo

En total se recolectaron 190 muestras de cinco especies de palmas (Tabla I). Se cubrió el rango completo de distribución de *W. robusta*, *B. armata*, *B. edulis* y *B. brandegeei*, sin embargo *W. filifera* fue representada únicamente por muestras de México recolectadas en Sierra Juárez (SJ) (Fig. 1). En total se recolectaron 89 muestras de *Washingtonia*, de las cuales 10 correspondieron a *W. filifera* y 79 a *W. robusta*. Para *Brahea*, se recolectaron 101 muestras de nueve poblaciones (sierras) y de la Isla Guadalupe, de las cuales 22 pertenecían a *B. edulis*, 34 a *B. armata* y 45 a *B. brandegeei*. Debido a que algunos autores (por ejemplo, Henderson *et al.*, 1995) han argumentado que *B. brandegeei* puede ser sinónimo de *B. elegans* de la parte continental de México, también se incluyó un espécimen de herbario de esta especie que fue recolectado en 1997 en Sonora.

7.1.2 Aislamiento de secuencias nucleares y de cloroplasto

Se evaluaron un total de diez *loci* de cloroplasto y nucleares que se han propuesto previamente para estudios moleculares en Arecaceae (Bacon *et al.*, 2008; CBOL Plant Working Group 2009; Jeanson *et al.*, 2011). De los marcadores evaluados, se seleccionaron cinco *loci* informativos: *matK*, *CISP 4*, *trnT-trnD*, *trnG-trnS* y *trnF-trnL* para el análisis posterior. Dichos marcadores tuvieron un éxito de ampliación de aproximadamente 95% y presentaron un único amplicon, su éxito de secuenciación fue de aproximadamente 90%. Adicionalmente, los marcadores seleccionados, presentaron una diversidad aceptable entre las especies analizadas (para más detalle vea el resultado del segundo objetivo). El resto de los

marcadores carecían de variación en una muestra representativa de individuos de las especies de palma incluidas en la presente tesis (*rbcL* y *trnC-rpoB*), fallaron en amplificación por PCR (*trnM-trnS*) o amplificaron más de un producto de PCR (*ITS2* y *CISP 8*).

7.2 Límites de distribución, variabilidad y estructura genética de palmas nativas de la península de Baja California e Isla Guadalupe, mediante marcadores convencionales

7.2.1 Variabilidad genética

El conjunto final de datos incluyó 2,294 pb de secuencia concatenada de cloroplasto y 738 pb de secuencia nuclear. De todas las secuencias se habían eliminado los InDels. En total, se obtuvieron 89 secuencias nucleares y 81 de cloroplasto para *Washingtonia* y 80 secuencias nucleares y 80 de cloroplasto para *Brahea*, incluyendo una muestra de *B. elegans* de México continental (ver métodos y Tabla I para más detalles).

Tabla II. Estadísticos descriptivos de (a) cloroplasto y (b) secuencias nucleares aisladas de cinco especies de palma. Incluye: n número de muestras; número de haplotipos; número de sitios variables; h-diversidad de haplotipos y π -diversidad de nucleótidos. Se excluyeron *B. elegans* de estos análisis.

		<i>W. robusta</i>	<i>W. filifera</i>	<i>B. armata</i>	<i>B. brandegeei</i>	<i>B. edulis</i>
(a)	n	73	8	27	35	17
	Cloroplasto					
	n	5	2	1	2	1
	haplotipos					
	Sitios variables	4	1	-	6	-
	<i>h</i>	0.53	0.43	-	0.51	-
(b)	π	0.0003	0.0002	-	0.001	-
	n	82	7	27	38	14
	Nuclear					
	n	7	1	5	7	1
	haplotipos					
	Sitios variables	6	-	4	5	-
<i>h</i>	0.34	-	0.72	0.70	-	
π	0.0006	-	0.0013	0.0014	-	

Agrupando todas las muestras, se obtuvo un total de 10 y 19 haplotipos únicos de cloroplasto y nucleares, respectivamente (Tabla II). En general, los niveles de diversidad de secuencias fueron bajos, y las especies definidas morfológicamente fueron representadas por un solo haplotipo común o un puñado de haplotipos estrechamente relacionados a baja frecuencia (Tabla II). Como se muestra por las curvas de acumulación de haplotipos, nuestro tamaño de la muestra fue lo suficientemente grande para abarcar la mayoría de la diversidad genética presentes en las especies estudiadas (Fig. 3).

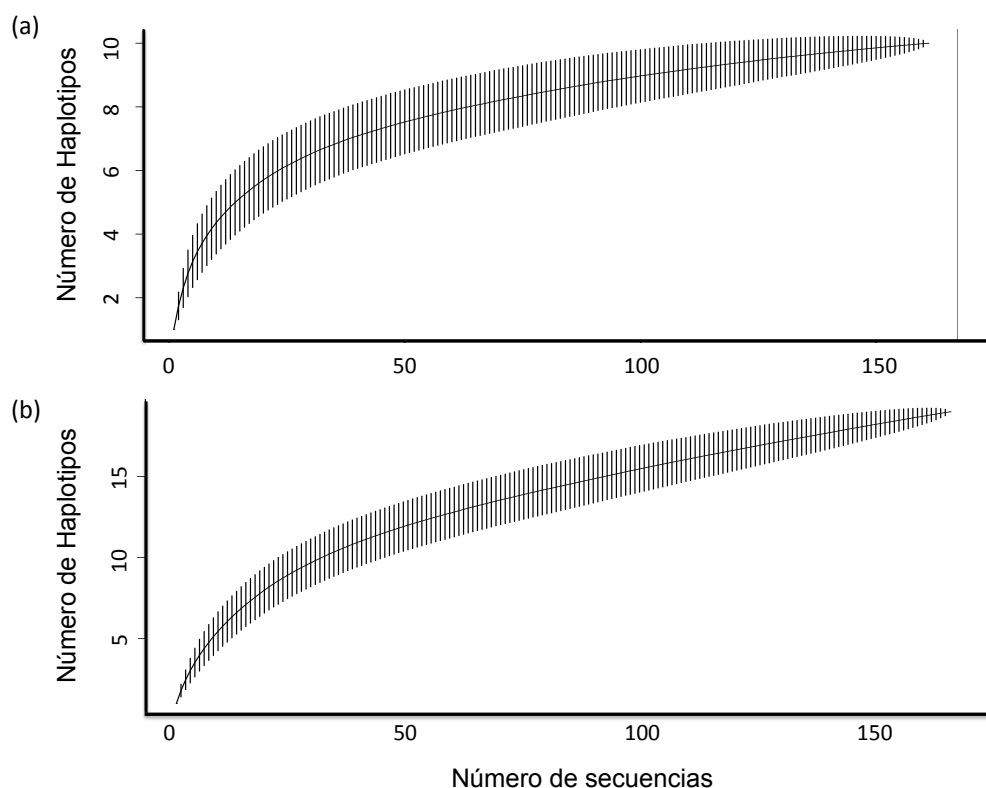


Figura 3. Las curvas de acumulación de haplotipos. Los intervalos de confianza del 95% se muestran como barras de error. El panel (a) muestra una curva de acumulación de haplotipos para las secuencias de cloroplastos y el panel (b) para las secuencias nucleares de *Washingtonia* y *Brahea*.

7.2.2 Límites de distribución y estructura genética

Se utilizaron las redes de haplotipos para visualizar las relaciones filogenéticas entre los individuos de especies de palmas estudiadas (Figs. 4a y 5a).

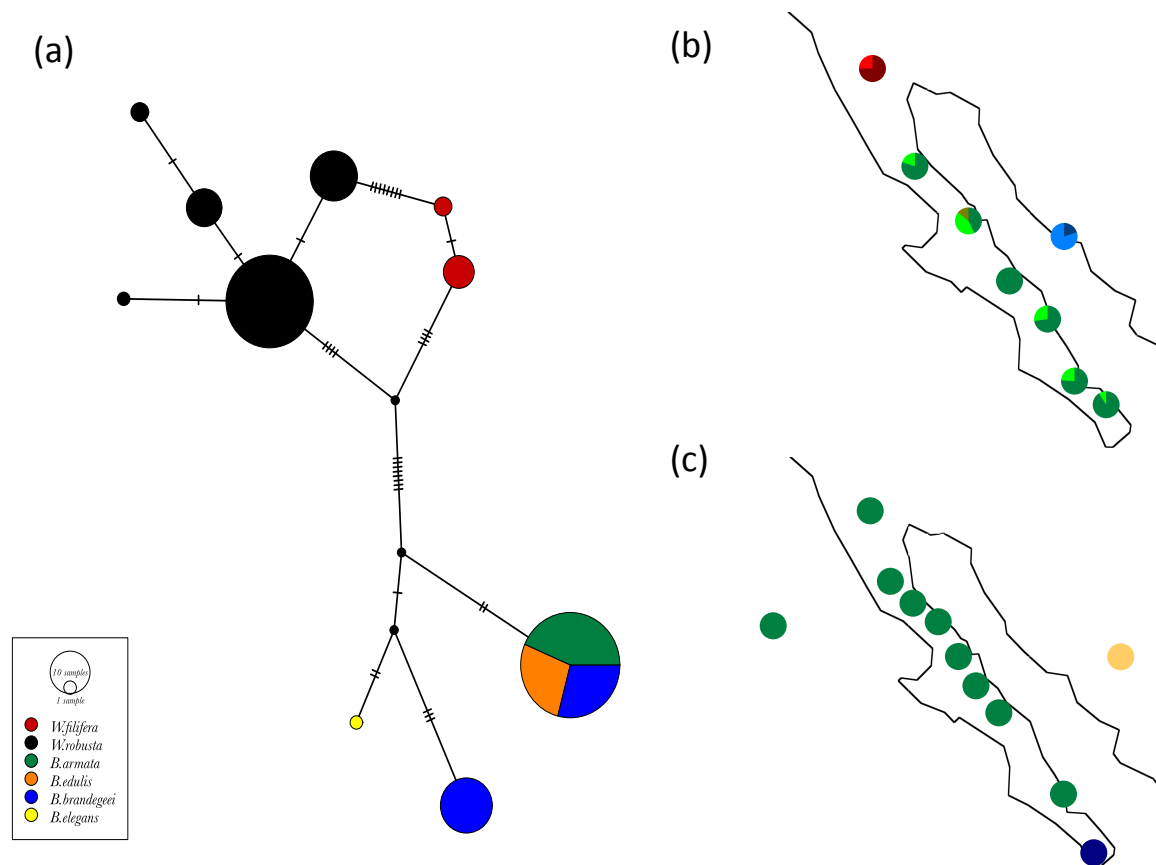


Figura 4. Distribución de especie y distribución geográfica de haplotipos de cloroplastos de *Washingtonia* y *Brahea*. El panel (a) muestra una red de haplotipos en la que el tamaño de cada gráfico circular es proporcional al número de individuos que llevan el haplotipo. Cada marca en las líneas continuas indica una única mutación de ADN. Los colores que se muestran en el cuadro corresponden a delineaciones de especies basadas en caracteres morfológicos como se describe en Minnich *et al.* (2011). Distribución geográfica de los haplotipos de cloroplastos de (b) muestras de *Washingtonia* y (c) *Brahea*. En los paneles (b) y (c) los colores corresponden a los diferentes haplotipos.

Como era de esperar, *Washingtonia* y *Brahea* fueron profundamente divergentes entre sí, tanto en el ADN de cloroplasto como en nuclear. Además, dentro del género *Washingtonia*, *W. robusta* y *W. filifera* se diferenciaron por nueve

(cloroplasto) y dos (nucleares) nucleótidos fijos y no presentaron haplotipos compartidos. En el análisis de la distribución espacial de los haplotipos, tanto de cloroplasto como nucleares, las muestras de *Washingtonia* formaron tres grupos distintos sin haplotipos compartidos (Figs. 4b y 5b). Estos comprendían (i) un grupo septentrional de *Washingtonia* de la Sierra Juárez (SJ), (ii) un grupo de la península de Baja California y (iii) un grupo de las poblaciones del continente (SON).

Dentro del complejo de *Brahea*, se obtuvieron resultados contrastantes para los datos del cloroplasto y las secuencias nucleares (Figs. 4a,c y 5a,c). A pesar del amplio muestreo y de la secuenciación de más de 2,000 pares de bases de ADN de cloroplasto, todas las muestras de *B. armata*, *B. edulis* y *B. brandegeei* del norte compartían un haplotipo único (Fig. 4a,c) y, por tanto, no fue posible distinguir estas especies. La única muestra de *B. elegans* que se recolectó en el continente mexicano llevaba un haplotipo de cloroplasto único separado por cinco pasos mutacionales de *B. armata* y *B. edulis*. *B. brandegeei* fue representado por dos haplotipos, uno de los cuales fue compartido con *B. armata* y *B. edulis*, mientras que otro sólo se encontró en las muestras de la población SLL (Fig. 4c).

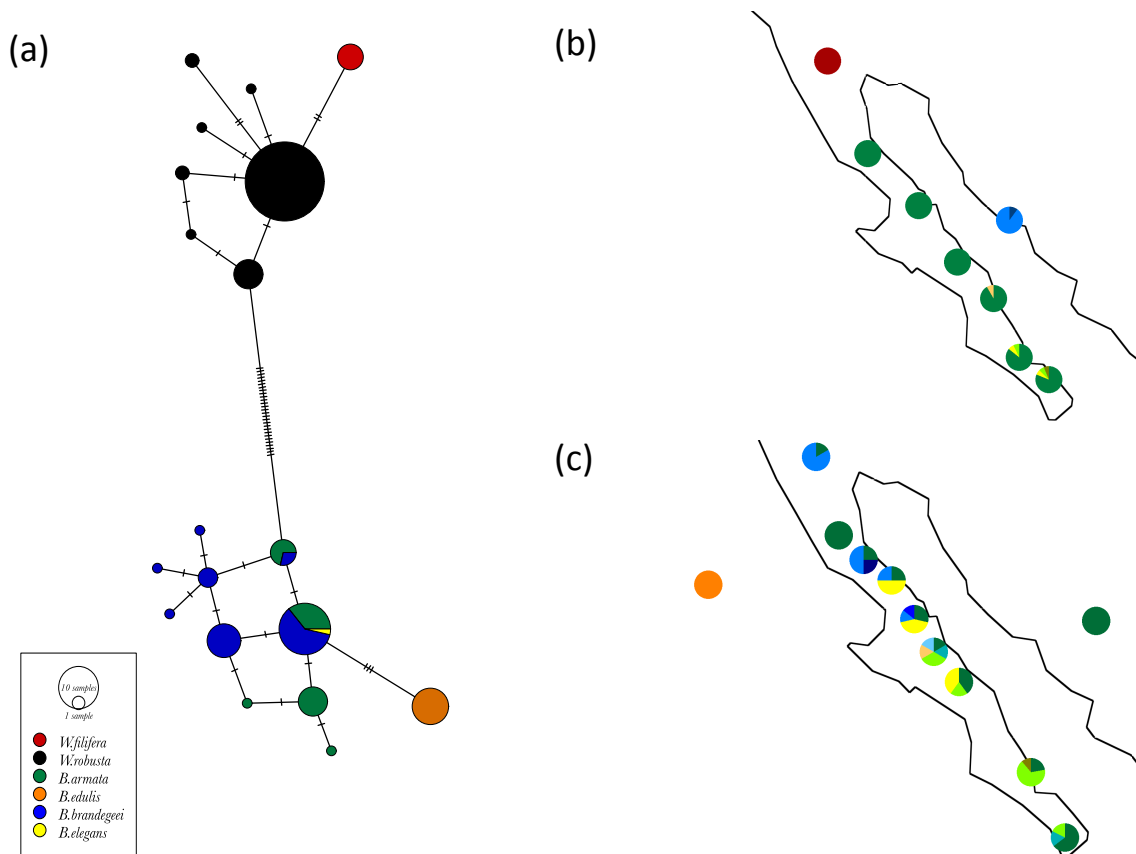


Figura 5. Distribución de especies y distribución geográficas de los haplotipos nucleares de *Washingtonia* y *Brahea*. El panel (a) muestra una red de haplotipos en la que el tamaño de cada gráfico circular es proporcional al número de individuos que llevan el haplotipo. Cada marca en las líneas continuas indica una única mutación de ADN. Los colores que se muestran en el cuadro corresponden a delineaciones de especies basadas en caracteres morfológicos como se describe en Minnich *et al.* (2011). Distribución geográfica de los haplotipos nucleares de (b) muestras de *Washingtonia* y (c) *Brahea*. En los paneles (b) y (c) los colores corresponden a los diferentes haplotipos.

Se encontró una mayor diversidad de haplotipos nucleares, con un total de 11 haplotipos detectados, aunque la mayoría de ellos estaban presentes en frecuencias bajas. Hubo también un mayor número de haplotipos compartidos entre las especies de *Brahea*, y sólo *B. edulis* fue claramente separada del resto de las *Braheas* de la península y continente (Fig. 5a). La distribución espacial de los haplotipos nucleares de *Brahea* no reveló patrones geográficos claros a lo

largo de la península, pero confirmó la singularidad de las palmas de la Isla Guadalupe (Fig. 5c).

Los estadísticos de diferenciación genética proporcionaron soporte cuantitativo adicional para los patrones geográficos descritos (Tablas III y IV). Por ejemplo, dentro de *Washingtonia* y tanto para los datos de cloroplastos como nucleares, los valores de *Fst* y Φst fueron altos y significativos para las comparaciones entre *W. filifera* (SJ), así como para las poblaciones peninsulares y continentales de *W. robusta*. En contraste, ninguna de las comparaciones entre las sierras de la península de Baja California fue significativa (Tabla III a,b).

Tabla III. Estimaciones de diferenciación genética entre ocho poblaciones de *Washingtonia*. Los valores pares de *Fst* y Φst (por encima y por debajo de la diagonal, respectivamente) se muestran por separado para (a) cloroplasto y (b) gen nuclear.

	Sierra (Población)	SJ	CAT	SFSL	SSP	SG	SM	SL	SON
(a) Cloroplasto	SJ	-	0.97***	0.96***	0.98**	0.97***	0.97***	0.98***	0.97***
	CAT	0.58***	-	-0.15	-0.13	-0.12	-0.13	-0.11	0.74***
	SFSL	0.46**	-0.11	-	-0.06	-0.08	-0.04	0.03	0.68***
	SSP	0.69**	-0.13	0.05	-	0.06	-0.02	-0.19	0.77**
	SG	0.54***	-0.12	-0.09	0.06	-	-0.04	0.08	0.72***
	SM	0.61***	-0.13	-0.03	-0.02	-0.04	-	0.00	0.74***
	SL	0.71***	-0.11	0.11	-0.19	0.08	0.00	-	0.79***
	SON	0.61***	0.63***	0.51***	0.73**	0.58***	0.63***	0.74***	-
(b) Nuclear	SJ	-	1.00**	1.00***	1.00**	0.91***	0.92***	0.85***	0.96***
	CAT	1.00**	-	0.00	0.00	-0.10	-0.11	-0.10	0.87***
	SFSL	1.00**	0.00	-	0.00	-0.06	-0.07	-0.06	0.89***
	SSP	1.00**	0.00	0.00	-	-0.13	-0.14	-0.14	0.86**
	SG	0.81***	-0.06	-0.02	-0.10	-	0.01	0.00	0.76***
	SM	0.89***	-0.09	-0.06	-0.13	0.00	-	-0.03	0.82***
	SL	0.77***	-0.05	-0.01	-0.09	-0.03	-0.01	-	0.72***
	SON	0.87***	0.86**	0.87***	0.84**	0.72***	0.83***	0.71***	-

Nota: Valores P corregidos por FDR: * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001. La codificación corresponde a las sierras muestreadas (Fig. 1 y Tabla I para más detalles).

Dentro de *Brahea*, se enfocó en los datos nucleares, ya que sólo tres haplotipos de cloroplasto estaban presentes, uno de los cuales se encontró en el 78% de las muestras. Para los datos nucleares, las muestras de *Brahea* se agruparon en diez

poblaciones definidas *a priori* (ver Tabla I y Figs. 1 y 2 para más detalles). Los valores F_{st} y Φ_{st} resultantes entre muestras de la Isla Guadalupe y las otras poblaciones de la península de Baja California oscilaron entre 0.69 y 1 y eran significativos (Tabla IV).

Tabla IV. Estimaciones de diferenciación genética entre las diez poblaciones de *Brahea* basados en los datos nucleares. Los valores de F_{st} y Φ_{st} se muestran por encima y por debajo de la diagonal, respectivamente.

Sierra (Población)	SJ	SSPM	CAT	SA	SLI	SSF	SSP	SM	SL	GI
SJ	-	0.78*	-0.09	0.41	0.29	0.61*	0.55*	0.66**	0.53**	0.97***
SSPM	0.78*	-	0.55	0.29	0.16	0.49*	0.17	0.49*	0.09	1**
CAT	-0.04	0.50	-	0.21	0.17	0.49*	0.38	0.55*	0.45*	0.95**
SA	0.27	0.50	-0.03	-	-0.21	0.26	-0.14	0.42*	0.16	0.94**
SLI	0.30	0.37	0.04	-0.21	-	0.21	-0.11	0.31*	0.09	0.86***
SSF	0.35*	0.40*	0.07	0.07	0.09	-	0.14	0.05	0.24*	0.89**
SSP	0.41*	0.33	0.09	-0.17	-0.13	-0.00	-	0.25	-0.04	0.93***
SM	0.52**	0.56*	0.30	0.30	0.28*	0.01	0.15	-	0.16	0.92***
SL	0.48**	0.06	0.24*	0.24*	0.20*	0.14	0.09	0.27*	-	0.88***
GI	0.90***	1***	0.81***	0.81***	0.71***	0.69***	0.77***	0.77***	0.71***	-

Nota: Valores P corregidos por FDR: * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001. La codificación corresponde a las sierras muestreadas (Fig.1 y Tabla I para más detalles).

También se detectó una diferenciación significativa entre las poblaciones meridionales (*SM*, *SPP*) y septentrionales (*SJ*, *SL* y *CAT*) (Tabla IV). Después de la partición de las muestras basándose en taxonomía actual, se obtuvieron los valores de F_{st} y Φ_{st} similares y significativos (Tabla V).

Tabla V. Estimaciones de la diferenciación genética entre las tres especies de *Brahea* (Minich *et al.*, 2011). Los valores de F_{st} y Φ_{st} se muestran por encima y por debajo de la diagonal, respectivamente.

Especies	<i>B. brandegeei</i>	<i>B. armata</i>	<i>B. edulis</i>
<i>B. brandegeei</i>	-	0.26***	0.81***
<i>B. armata</i>	0.13***	-	0.83***
<i>B. edulis</i>	0.55***	0.57**	-

Nota: Valores P corregidos por FDR: * P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001.

A continuación, se utilizó AMOVA para evaluar la partición de la variación de las secuencias entre regiones geográficas definidos *a priori* (Fig. 2). Todos los esquemas de división produjeron estimaciones significativas (Tablas VI y VII).

Tabla VI. Resultados de análisis de varianza molecular (AMOVA) para *Washingtonia spp.* basado en (a) cloroplasto y (b) datos nucleares. El conjunto de datos dividido en especies taxonómicamente designadas, tres regiones geográficas principales y ocho poblaciones.

		Partición	Origen of Variación	% de variación total	F	P
(a) Cloroplasto	Taxonomía actual		Entre especies	94.8	0.95	<0.001
			Entre sitios dentro de especies	2.3	0.44	<0.001
			Dentro de sitios	2.9	0.97	<0.001
	3 regiones		Entre regiones	94.8	0.95	<0.001
			Entre sitios dentro de regiones	-0.2	-0.04	0.68
			Dentro de sitios	5.4	0.95	<0.001
	8 sierras		Entre sierras	88.6	0.89	<0.001
			Dentro de sierras	11.4	-	-
		Partición	Origen of Variación	% de variación total	F	P
(b) Nuclear	Taxonomía actual		Entre especies	80.2	0.80	0.016
			Entre sitios dentro de especies	9.8	0.49	<0.001
			Dentro de sitios	9.9	0.9	<0.001
	3 regiones		Entre regiones	87.1	0.87	0.007
			Entre sitios dentro de regiones	-0.6	-0.05	0.98
			Dentro sitios	13.5	0.87	<0.001
	8 sierras		Entre sierras	70.6	0.71	<0.001
			Dentro de sierras	29.4	-	-

Sin embargo, en el caso de las palmas de *Washingtonia*, de las tres hipótesis probadas, el agrupamiento de las muestras en tres regiones geográficas correspondientes a: (i) *W. robusta* del continente, (ii) *W. robusta* de la península y (iii) *W. filifera* presentó el mayor componente de varianza (datos nucleares 87% y cloroplasto 94%) (Escenario 2 en la Fig. 2a). En el caso de las palmas de *Brahea*, la proporción de varianza atribuida a las diferencias entre las diez poblaciones fue mayor, alrededor del 66% (Escenario 3 en la Fig. 2b), seguida por especies

taxonómicamente designadas (62%) y *B. brandegeei* restringidas a la SLL (50%) (Tabla VII).

Tabla VII. Resultados de análisis de varianza molecular (AMOVA) para *Brahea* spp. basado en los datos nucleares. El conjunto de datos dividido en especies taxonómicamente designadas, *B. brandegeei* restringida a SLL y diez poblaciones.

	Partición	Origen of Variación	% de variación total	F	P
<i>Brahea</i>	Taxonomía actual	Entre especies	62.87	0.62	<0.001
		Entre sitios dentro de especies	9.02	0.24	0.001
		Dentro de sitios	28.12	0.72	<0.001
	<i>B. brandegeei</i> restringida a SLL	Entre especies	50.50	0.51	0.03
		Entre sitios dentro de especies	21.22	0.43	<0.001
		Dentro de sitios	28.27	0.72	<0.001
	10 sierras	Entre sierras	65.9	0.66	<0.001
		Dentro de sierras	34.1	–	–

Los resultados descritos fueron apoyados por análisis bayesiano realizado con el programa BAPS. Sin utilizar la información geográfica, el análisis de los datos del cloroplasto apoyó a la presencia de cuatro grupos genéticos (K = 4, Fig. 6a). Dos grupos se encontraron dentro de *Washingtonia*, que correspondieron a los taxonómicamente definidos *W. filifera* (SJ) y *W. robusta* (Todas las sierras excepto SJ). Otros dos grupos se encontraron dentro de *Brahea*, correspondientes a muestras de *B. brandegeei* de la población de SLL más la muestra única de *B. elegans* del continente y *B. edulis* más todas las muestras de *B. brandegeei* al norte de la región de Cabo, más todos los individuos de *B. armata*.

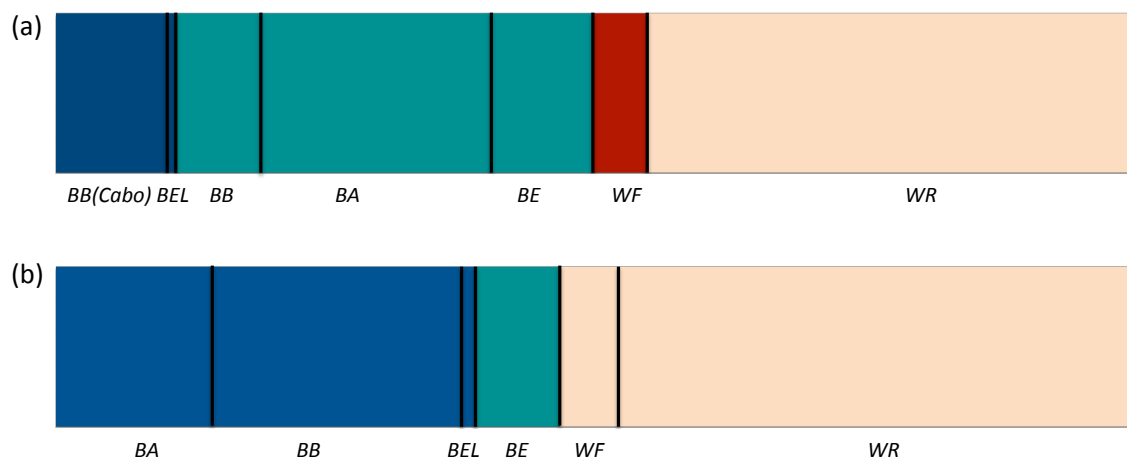


Figura 6. Agrupación Bayesiana de individuos de *Washingtonia* y *Brahea* según lo estimado con BAPS sin considerar la información geográfica. (a) cloroplasto y (b) datos nucleares. Las abreviaturas: BB (Cabo) - *B. brandegeei* de Sierra Laguna, BEL - *B. elegans*, BB - *B. brandegeei*, BA - *B. armata*, BE - *B. edulis*, WF - *W. filifera*, WR - *W. robusta*.

Basándose en los datos nucleares, sólo se identificaron presencia de tres grupos ($K = 3$, Fig. 6b). Específicamente, todas las muestras de *Washingtonia* se agruparon, al igual que todas las muestras de *Brahea*, con la excepción de *B. edulis* de la Isla Guadalupe, que formó un tercer grupo.

Finalmente, se utilizó información geográfica de todos los sitios de muestreo para llevar a cabo el análisis de agrupación espacial Bayesiana utilizando BAPS, por separado para *Washingtonia* y *Brahea* (Fig. 7). Para *Washingtonia*, los gráficos de Voronoi tanto de los datos del cloroplasto (Fig. 7a) como nucleares (Fig. 7c) revelaron presencia de dos grupos genéticos separados geográficamente y genéticamente, correspondientes a *W. filifera* en el norte (SJ) y *W. robusta* en el resto de la península y continente Mexicano. Basándose en los datos nucleares, se recuperó un grupo adicional correspondiente a muestras de las poblaciones de *Washingtonia* del continente Mexicano (Fig. 7c).

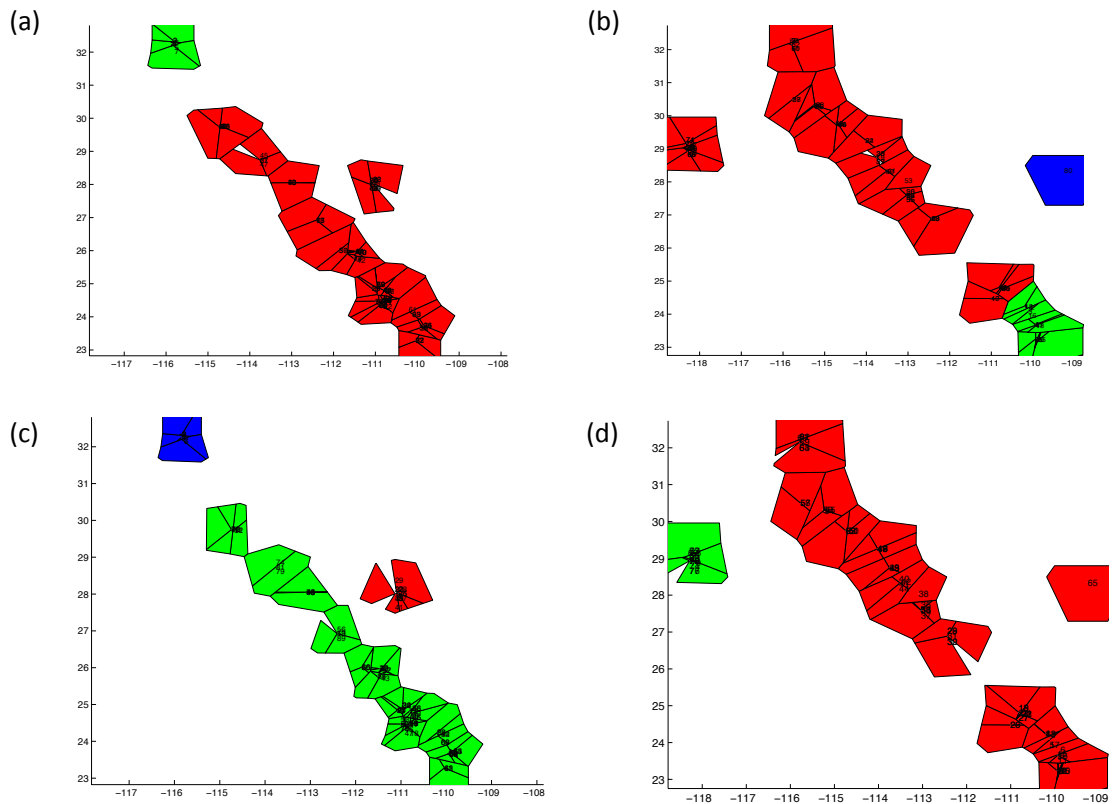


Figura 7. Análisis de agrupamiento espacial Bayesiano de las muestras de *Washingtonia* y *Brahea* utilizando teselación de Voronoi como se implementa en BAPS. Cada panel representa los géneros y marcadores correspondientes: (a) *Washingtonia* spp. datos de cloroplasto, (b) *Brahea* spp. datos de cloroplasto, (c) *Washingtonia* spp. datos nucleares, y (d) *Brahea* spp. datos nucleares. Los colores corresponden a los grupos recuperados con el análisis.

Para *Brahea*, los datos del cloroplasto revelaron la presencia de tres grupos (Fig. 7b) que reflejaron las distribuciones espaciales de haplotipos mostradas en la figura 4c. Por el contrario, los datos nucleares indicaron la presencia de sólo dos grupos genéticos (Fig. 7d), uno correspondiente a las poblaciones peninsulares y continentales combinadas, y el segundo a las poblaciones de Isla Guadalupe.

7.3 Relaciones taxonómicas dentro de *Washingtonia* y *Brahea* distribuidas en la península de Baja California e Isla Guadalupe y los límites geográficos de cada especie en la península, mediante marcadores SNPs

7.3.1 Aislamiento de SNPs y análisis de secuencias crudas

GBS generó un conjunto de 26,565 SNPs polimórficos para 190 individuos de palmas incluidas en la presente tesis. Después del filtrado, eliminación de InDels, retención de sólo SNPs bi-alélicos nucleares, división de los datos por géneros y la eliminación de los loci con más del 20% de datos faltantes, se generaron dos conjuntos de datos, que comprendieron 85 individuos de *Washingtonia* genotipificados en 3,163 SNPs polimórficos y 100 individuos de *Brahea* genotipificados en 7,844 SNPs polimórficos. Posteriormente se excluyó a cinco individuos adicionales que presentaron más de 30% datos faltantes (cuatro de *Washingtonia* y uno de *Brahea*).

7.3.2 Análisis filogenético

Para dilucidar las relaciones taxonómicas, primero se construyó un árbol filogenético a partir del conjunto completo de datos. Como se esperaba, los dos géneros se resolvieron claramente como grupos monofiléticos distintos (Fig. 8). Sin embargo, dentro de *Washingtonia*, *W. robusta* y *W. filifera* no eran monofiléticos. Así, las muestras de *W. filifera*, se presentaron como grupo hermano a las muestras de poblaciones de *W. robusta* del norte de la península. Este grupo fue genéticamente distinto de las poblaciones del sur de la peninsular y del grupo continental. De manera similar, dentro de de *Brahea*, se encontró apoyo para que *B. edulis* formara un grupo monofilético distinto, pero este no fue el caso de *B. brandegeei* y *B. armata*. Los cuatro clados principales, representados por *W. robusta* norte y *W. filifera*, *W. robusta* sur y continente, *B. brandegeei* y *B. armata* y *B. eduis* se resolvieron con un 100% de soporte bootstrap.

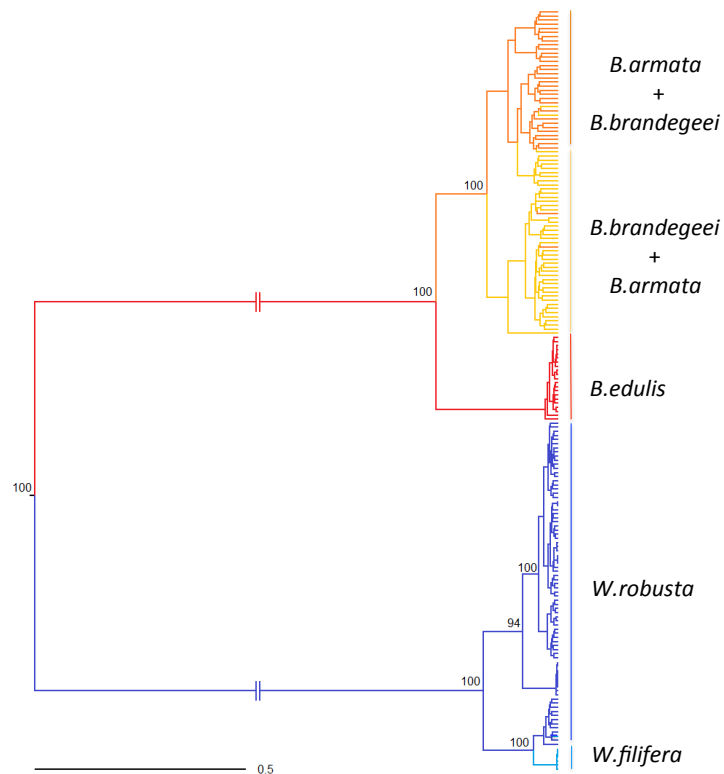


Figura 8. Árbol filogenético basado en la información de SNPs. Los colores representan especies de *Washingtonia* y *Brahea* como se describe en Minnich *et al.* (2011). Los números sobre las ramas corresponden al soporte bootstrap.

La reconstrucción filogenética Bayesiana basada en un subconjunto de individuos seleccionados al azar arrojó resultados muy similares (Fig. 9), lo que sugiere que el conjunto de SNPs aquí utilizado lleva una señal filogenética clara. Cuando ambos géneros se analizaron juntos, la divergencia entre especies dentro de cada género fue insignificante. Cuando cada género se analizó por separado, se encontró que *W. robusta* no formó un grupo monofilético claro, sino que se separó en dos clusters hermanos.

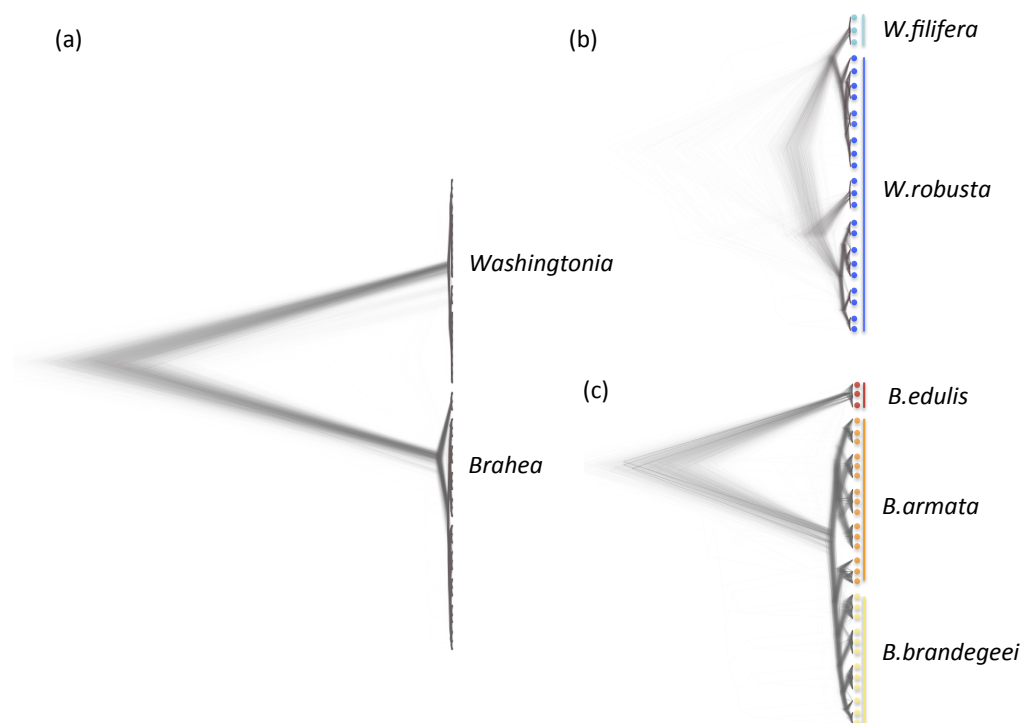


Figura 9. Reconstrucción filogenética Bayesiana basada en un subconjunto de individuos de *Washingtonia* y *Brahea* seleccionados al azar. Panel (a) las muestras de *Washingtonia* y *Brahea* en conjunto; panel (b) las muestras de *Washingtonia*; panel (c) las muestras de *Brahea*. Los colores representan especies de *Washingtonia* y *Brahea* como se describe en Minnich *et al.* (2011).

Uno representado por palmas del norte de la península (*SSP*, *SFSL*, *CAT*) con palmas de *W. filifera* (*SJ*), mientras que otro grupo incluyó palmas del sur de la península (*SG*, *SM*, *SLL*) y individuos del continente (*SON*). Para *Brahea*, similar al análisis previo, se encontró un claro apoyo para que *B. edulis* sea un grupo monofilético. Dentro de *B. armata* y *B. brandegeei* no se encontraron divergencias claras y las muestras se agruparon según la población de muestreo.

7.4 Estructura poblacional y conectividad genómica de las poblaciones de dos géneros de palmas: *Washingtonia* y *Brahea*, mediante los marcadores SNPs

7.4.1 Estructura de la población y pruebas de asignación

La mayoría de las comparaciones entre sierras (poblaciones) rindió valores de F_{st} altos y significativos (Tablas VIII y IX) indicando una estructura genética fuerte en ambos géneros. Para *Washingtonia*, las mayores diferencias genéticas se observaron entre las localidades peninsulares y continentales ($F_{st} = 0.45-0.74$, $p < 0.001$), así como entre la población más septentrional de SJ y otras sierras ($F_{st} = 0.39-0.74$, $p < 0.001$). Además, las sierras del norte (CAT, SFSL y SSP) y sur (SG, SM y SLL) de la península de Baja California se diferenciaron significativamente entre sí ($F_{st} = 0.22-0.47$, $p < 0.01$), mientras que no se encontró una estructura significativa dentro de cada una de estas regiones (Tabla VIII).

Tabla VIII. Estimaciones de diferenciación genética para *Washingtonia* entre sierras usando marcadores SNPs. El F_{st} y los valores de P asociados después de la corrección de FDR se muestran arriba y debajo de la diagonal, respectivamente (* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001).

Sierra	SM	SG	SJ	SSP	CAT	SLL	SFSL	SON
SM	-	***	***	***	***	*	***	***
SG	0.06	-	***	***	**	**	**	***
SJ	0.59	0.61	-	**	**	***	**	***
SSP	0.48	0.48	0.49	-	ns	***	ns	**
CAT	0.25	0.23	0.40	0.09	-	***	ns	***
SLL	0.02	0.03	0.59	0.46	0.22	-	***	***
SFSL	0.30	0.29	0.39	0.05	-0.01	0.28	-	***
SON	0.49	0.51	0.74	0.61	0.45	0.48	0.47	-

Por el contrario, aunque la mayor diferencia genética en *Brahea* fue observada entre las poblaciones de la Baja California y la Isla Guadalupe ($F_{st} = 0.46-0.52$, $p < 0.001$), todas las comparaciones de F_{st} entre sierras en la península fueron estadísticamente significativas (Tabla IX).

Tabla IX. Estimaciones de diferenciación genética para *Brahea* entre sierras usando marcadores SNPs. El *Fst* y los valores de P asociados después de la corrección de FDR se muestran arriba y debajo de la diagonal, respectivamente (* P <0.05; ** P <0.01; *** P <0.001).

Sierra	<i>GI</i>	<i>SSP</i>	<i>CAT</i>	<i>SM</i>	<i>SLL</i>	<i>SJ</i>	<i>SL</i>	<i>SSF</i>	<i>SA</i>	<i>SSPM</i>
<i>GI</i>	-	***	***	***	***	***	***	***	***	***
<i>SSP</i>	0.52	-	**	**	***	**	**	***	*	**
<i>CAT</i>	0.46	0.12	-	***	***	**	***	**	**	***
<i>SM</i>	0.50	0.09	0.12	-	***	**	***	***	**	***
<i>SLL</i>	0.49	0.11	0.15	0.07	-	***	***	***	***	***
<i>SJ</i>	0.51	0.23	0.14	0.21	0.25	-	**	***	**	**
<i>SL</i>	0.46	0.10	0.08	0.11	0.14	0.15	-	**	**	***
<i>SSF</i>	0.46	0.07	0.07	0.07	0.10	0.15	0.03	-	**	***
<i>SA</i>	0.48	0.14	0.06	0.14	0.17	0.14	0.06	0.07	-	**
<i>SSPM</i>	0.49	0.19	0.10	0.19	0.22	0.17	0.13	0.13	0.11	-

Para explorar más a fondo los patrones de estructura genética a nivel de las sierras, se intentó asignar individuos a sus correspondientes sierras de procedencia. Se analizaron siete sierras para cada género después de excluir aquellas que contenían menos de cinco individuos muestreados (Tabla X).

Tabla X. Resultados de las pruebas de asignación de individuos a las sierras de la procedencia implementadas en GENODIVE y STRUCTURE, para (a) *Washingtonia* y (b) *Brahea*.

(a) <i>Washingtonia</i>	Sierra	Número de muestras	GENODIVE, Paetkau <i>et al.</i> (1995)		STRUCTURE, Pritchard <i>et al.</i> (2000)	
			Correctamente asignado	% Correctamente asignado	Correctamente asignado	% Correctamente asignado
	<i>SLL</i>	15	10	66.7	0	0
	<i>SM</i>	25	22	88	23.2	92.8
	<i>SG</i>	14	11	78.6	0.8	5.7
	<i>SSP</i>	4	-	-	-	-
	<i>SFSL</i>	7	5	71.4	5	71.4
	<i>CAT</i>	5	0	0	0	0
	<i>SJ</i>	6	2	33.3	6	100
	<i>SON</i>	9	6	66.7	9	100
(b) <i>Brahea</i>	<i>SLL</i>	21	21	100	19.8	94.3
	<i>SM</i>	9	9	100	2	22.2
	<i>SSP</i>	4	-	-	-	-
	<i>SSF</i>	11	8	72.7	7.9	71.8
	<i>SL</i>	9	9	100	9	100
	<i>SA</i>	4	-	-	-	-
	<i>CAT</i>	8	6	75	6	75
	<i>SSPM</i>	8	8	100	7.4	92.5
	<i>SJ</i>	5	0	0	5	100
	<i>GI</i>	21	20	95.5	21	100

El éxito promedio de la asignación para los individuos de *Washingtonia* fue moderado, variando de 59.1% basado en GENODIVE a 53.1% basado en STRUCTURE (Tabla X). Por el contrario, los individuos de *Brahea* fueron asignados a sus sierras "casa" con tasas del éxito correspondientes del 85.9% y 85.7% con GENODIVE y STRUCTURE, respectivamente (Tabla X). Este hallazgo apoya la idea de que las palmeras de *Brahea* están comparativamente más estructuradas por sierras.

Para establecer los principales grupos genéticos en cada género, se utilizó la estimación de mezcla y el agrupamiento individual dentro de sNMF y BAPS, así como la inferencia filogenética en SPLITSTREE (ver Métodos para más detalles). Todos estos enfoques resolvieron agrupaciones claras y hubo un amplio acuerdo entre ellos sobre la fuerza y el patrón de la estructura poblacional de las palmas estudiadas (Figs. 10, 11, 12, 13). En el caso de *Washingtonia*, se recuperaron cuatro grupos genéticos claramente distintos, correspondientes a: (i) el continente mexicano (SON), (ii) el sur de la península de Baja California (SLL, SM y SG), (iii) el norte de la península de Baja California (SPP, SFSL y CAT) y (iv) *W. filifera* (SJ) (Figs. 10, 13a). A diferencia de BAPS y SPLITSTREE, el sNMF dividió las muestras del sur de la península en tres subgrupos, sin embargo no había un patrón geográfico claro detrás de esta partición (Fig. 10).

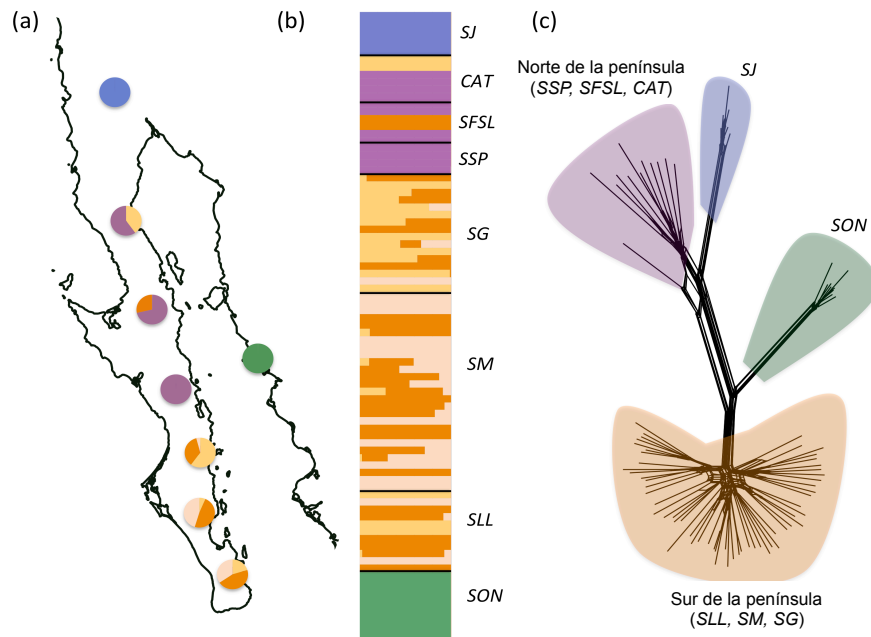


Figura 10. Estructura de la población de las palmas de *Washingtonia* estimado usando datos SNPs. Los paneles (a) y (b) muestran los resultados del análisis de agrupamiento Bayesiano en sNMF. Los gráficos de pastel indican la distribución geográfica de seis grupos genéticos inferidos (cada uno codificado por un color diferente) mientras que los coeficientes de pertenencia individuales se muestran en el gráfico de barras. El panel (c) muestra una red filogenética generada en SPLITSTREE.

Para *Brahea*, los tres enfoques revelaron evidencia de profunda divergencia entre las palmas de la península de Baja California y la Isla Guadalupe (Figs. 11, 12 y 13b).

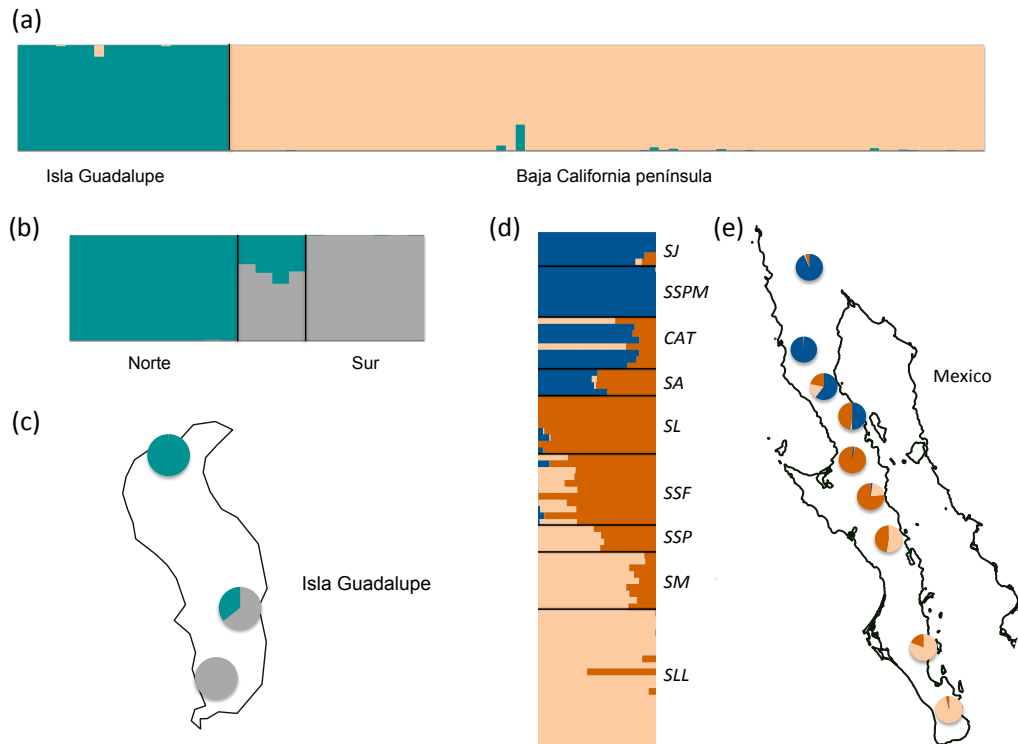


Figura 11. Estructura poblacional de *Brahea*. El panel (a) muestra las membresías del clúster del conjunto de datos completo, mientras que (b) muestra los resultados equivalentes restringidos solo a los individuos de la Isla Guadalupe. El panel (c) muestra la distribución geográfica de los grupos genéticos inferidos dentro de la Isla Guadalupe. Los paneles (d) y (e) muestran los resultados del análisis de agrupamiento Bayesianos dentro de sNMF. Los gráficos de pastel indican la distribución geográfica de tres grupos genéticos inferidos (cada uno codificado por un color diferente) mientras que los coeficientes de pertenencia individuales se muestran en el gráfico de barras.

Además, cuando esos grupos se analizaron por separado, las palmas de la Isla Guadalupe se dividieron en grupos de norte y sur (Fig. 11b,c). Dentro de la península de Baja California, hubo algunas diferencias en los resultados, dependiendo del enfoque analítico utilizado (Figs. 11, 13).

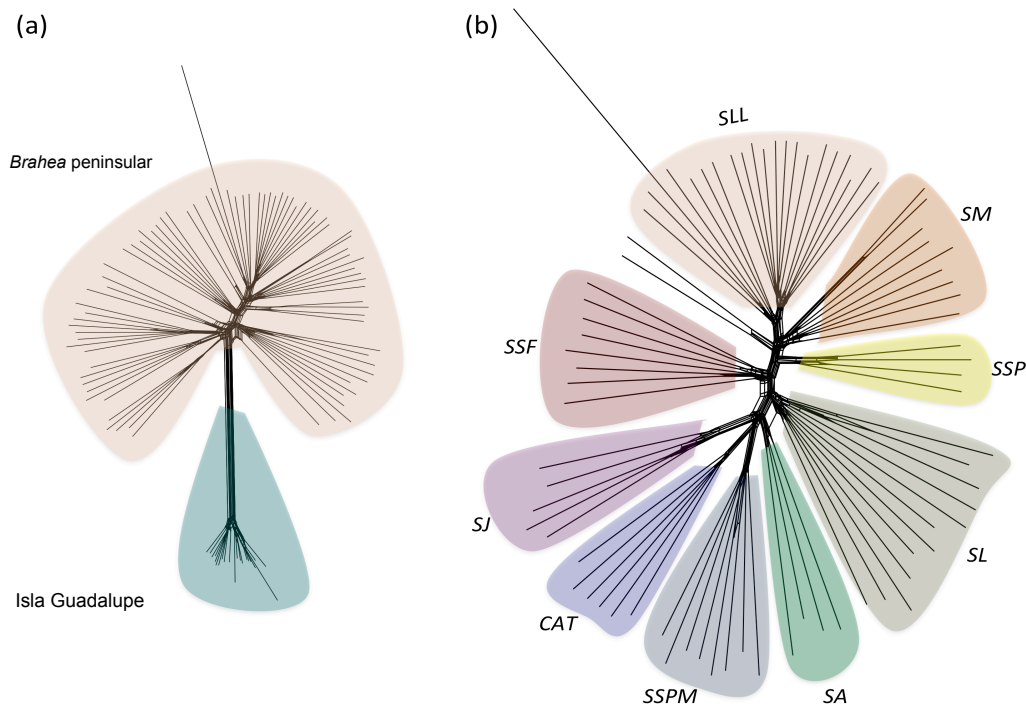


Figura 12. Redes filogenéticas que representan las relaciones entre individuos de *Brahea* de (a) la península de Baja California y la Isla Guadalupe; y (b) solo de la península de Baja California. En el segundo panel, los grupos coloreados y abreviaciones corresponden a las nueve sierras de las que se tomaron las muestras.

Específicamente, las corridas replicadas de sNMF indican consistentemente la presencia de tres grupos genéticos distintos (Fig. 11d,e): (i) sur de la península de Baja California (*SLL*, *SM* y *SSP*), (ii) la península central (*SSF*, *SL* y *SA*) y (iii) el norte de la península (*CAT*, *SSPM* y *SJ*). Sin embargo, el BAPS recuperó sólo dos grupos que corresponden a: (i) sur de península (*SLL* y *SM*) y (ii) norte (*SL*, *SA*, *CAT*, *SSPM* y *SJ*), mientras que las sierras del centro de la península (*SSP* y *SSF*) se resolvieron como híbridos o mezclas de los grupos genéticos meridionales y septentrionales (Fig. 13c). El análisis de SPLITSTREE fue más sensible a la estructuración filogenética de las palmas peninsulares y claramente dividió las

muestras en nueve grupos genéticos, cada uno correspondiendo perfectamente a una sierra diferente (Fig. 12).

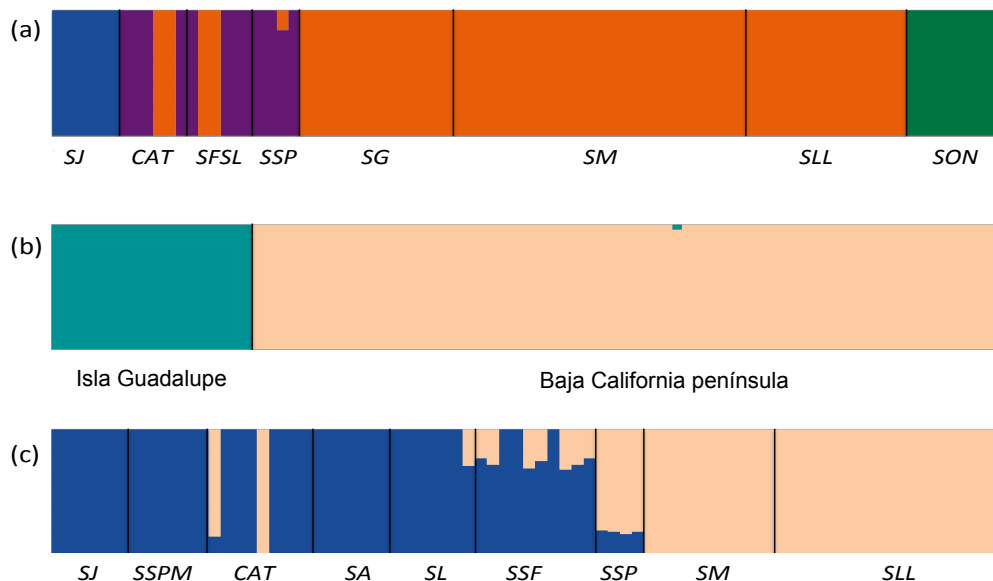


Figura 13. Resultados de los análisis Bayesianos de la estructura de la población estimados dentro de BAPS utilizando marcadores SNPs para (a) *Washingtonia*; (b) *Brahea*, y (c) el conjunto de datos de *Brahea* después de excluir la Isla Guadalupe. Las líneas negras separan diferentes sierras. Los colores de las graficas representan los grupos genéticos inferidos.

Curiosamente, los enfoques de agrupamiento también destacaron la presencia de palmas muestreadas en las sierras del norte que mostraban una clara ascendencia genética en las sierras del sur (Figs. 10, 11, 13). Específicamente, cuatro palmas de *Washingtonia* recolectadas en dos de las sierras del norte (CAT y SFSL) tenían genotipos indicativos de ascendencia de las sierras meridionales SLL, SM y SG. Mientras que para *Brahea*, dos individuos recolectados en CAT tenían ascendencia genética consistente con SM.

7.4.2 Divisiones de la población y modelos de migración

Para explorar el patrón de posibles migraciones más al fondo, se modeló la divergencia entre las población y se estimó la tasa de migración entre ellas utilizando TREEMIX (Fig. 14).

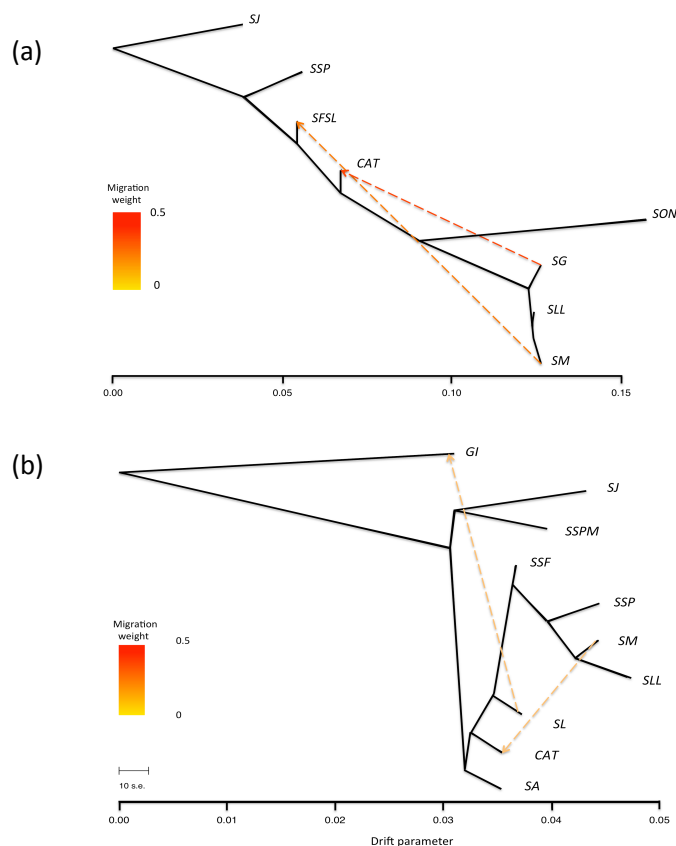


Figura 14. Árboles de máxima verosimilitud que muestran patrones de divergencia genética entre (a) palmas de *Washingtonia* agrupadas en ocho sierras y (b) palmas de *Brahea* agrupadas en nueve poblaciones con individuos de la Isla Guadalupe utilizados como grupo externo. Los eventos de migración inferidos están indicados por líneas discontinuas, con la dirección del flujo de genes indicada por flechas e intensidad de color que refleja la intensidad del flujo de genes.

El árbol resultante de máxima verosimilitud (ML) para *Washingtonia* fue concordante con la red filogenética y los resultados de los análisis de agrupación, mostrando una divergencia profunda entre las poblaciones peninsulares y continentales y la partición de estas últimas en el sur (*SLL*, *SM* y *SG*) y norte (*SPP*, *SFSL*, *CAT*) (Fig. 14a). Después de probar secuencialmente entre uno a

diez eventos discretos de migración, encontramos que el aumento en la probabilidad más allá de dos eventos de migración era cercana a cero (Fig. 15) y comparaciones escalonadas de los valores de probabilidad de log perdieron significancia entre dos y tres eventos (prueba $p > 0.05$).

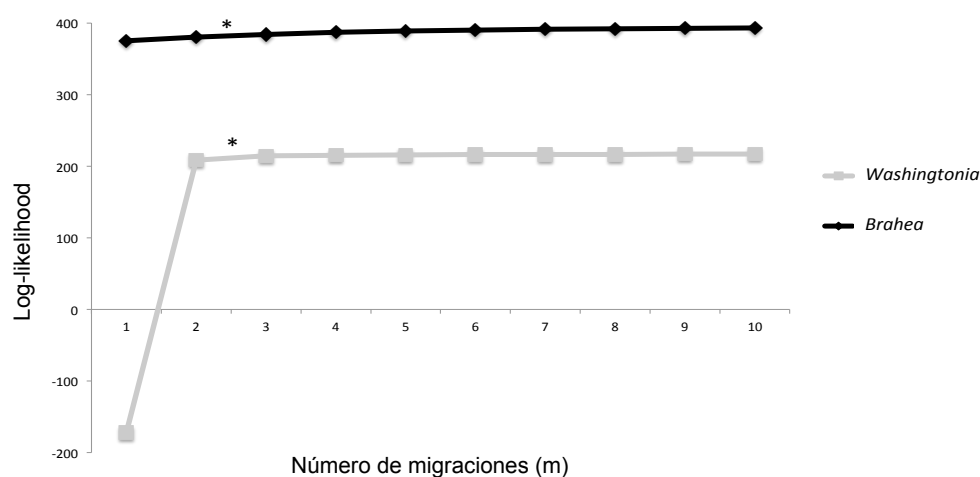


Figura 15. Aumento de la probabilidad logarítmica en función de número de eventos de migración entre uno y diez estimado en TREEMIX para *Washingtonia* en gris y para *Brahea* en negro. Los asteriscos indican el punto después del cual las comparaciones sucesivas de los valores de verosimilitud logarítmica se vuelven no significativos (pruebas de verosimilitud, $P > 0.05$).

Esto indica que el número más probable de eventos migratorios entre las sierras es dos. Explorando este escenario, encontramos evidencia de dos eventos de migración unidireccional de larga distancia que abarcan alrededor de 450 km, desde *SG* a *CAT* y desde *SM* a *SFSL* (Fig. 14a). Estos dos eventos de migración fueron apoyados por pruebas de tres poblaciones (Tabla XI). En el caso de las palmas de *Brahea*, el análisis de TREEMIX apoyó la partición de las muestras peninsulares en dos grupos principales (Fig. 14b), encontrándose una divergencia relativamente fuerte entre los grupos más septentrionales (*SJ* y *SSPM*) y el resto de la península (Fig. 14b). Estas últimas, a su vez, se dividieron en las sierras del norte (*SL*, *SA* y *CAT*) y en las sierras del sur y de la península central (*SLL*, *SM*, *SSP* y *SSF*).

Tabla XI. Resultados de las pruebas de mezcla de tres poblaciones para *Washingtonia*. Solo se muestran puntajes Z por debajo de -1.96, P <0.05.

Destino	Fuente1	Fuente2	f3	Error	Z score
CAT	SSP	SM	-2.49E-02	5.20E-04	-47.8793
CAT	SSP	SLL	-2.57E-02	3.90E-04	-65.8616
CAT	SSP	SON	-1.15E-02	9.96E-04	-11.5149
CAT	SSP	SG	-2.74E-02	3.54E-04	-77.4016
CAT	SJ	SM	-1.85E-02	2.02E-03	-9.18627
CAT	SJ	SLL	-1.89E-02	1.97E-03	-9.555
CAT	SJ	SON	-5.05E-03	3.07E-04	-16.4541
CAT	SJ	SG	-2.03E-02	1.00E-03	-20.2453
CAT	SM	SFSL	-5.99E-03	3.29E-04	-18.1984
CAT	SLL	SFSL	-6.98E-03	1.63E-04	-42.8771
CAT	SON	SFSL	-5.05E-03	7.52E-04	-6.7252
CAT	SG	SFSL	-8.01E-03	4.34E-04	-18.4609
SFSL	SJ	SM	-1.00E-02	2.54E-03	-3.95155
SFSL	SJ	SLL	-9.39E-03	2.72E-03	-3.45951
SFSL	SJ	SG	-9.85E-03	1.94E-03	-5.08269
SFSL	SSP	SG	-2.18E-02	1.64E-03	-13.3072
SFSL	SSP	SM	-2.13E-02	1.16E-03	-18.4095
SFSL	SSP	SLL	-2.11E-02	1.33E-03	-15.8511
SFSL	SSP	SON	-8.82E-03	1.13E-03	-7.80155
SFSL	SSP	CAT	-2.41E-03	9.46E-04	-2.55104
SLL	SM	SG	-4.97E-04	2.39E-04	-2.07409

Los eventos de migración inferidos para *Brahea* identificaron a *SL* como la población fuente más probable para poblaciones de la Isla Guadalupe (*GI*) y también apuntaron hacia posible migración de palmas de una sierra del sur (*SM*) a una sierra del norte (*CAT*) (Fig. 14b). Sin embargo, el patrón general de aumento de la probabilidad de log con el número de eventos de migración fue menos pronunciado que en *Washingtonia* (Fig. 15) y ninguno de estos eventos de migración fue apoyado por pruebas de tres poblaciones (puntuación Z <-1.96).

7.5 Efectos ecológicos sobre el aislamiento y la divergencia genómica de las poblaciones de *Washingtonia* y *Brahea* en la península de Baja California

7.5.1 Aislamiento por distancia y divergencia ecológica

Las pruebas de Mantel revelaron correlación positiva entre la distancia geográfica y genética tanto para *Washingtonia* como para *Brahea* (prueba de Mantel $r = 0.58$, $p < 0.0001$ y $r = 0.63$, $p < 0.0001$, respectivamente, Tabla XII).

Tabla XII. Los resultados de pruebas de mantel y mantel parcial que resumen las relaciones (r) y los valores de P entre la distancia genética, la distancia geográfica y las variables climáticas en *Washingtonia* y *Brahea*.

	<i>Washingtonia</i>		<i>Brahea</i>	
	Mantel	Mantel Parcial	Mantel	Mantel Parcial
Distancia geográfica	0.580***	NA	0.620***	NA
Aridez	-0.069	-0.200	0.068*	-0.230
Temperatura media del trimestre más frío	0.613***	0.249***	0.073**	-0.310
Precipitación media del trimestre más seco	0.184***	0.018	0.128***	0.11***

Además, las pruebas parciales de Mantel revelaron asociaciones significativas entre la distancia genética y algunas variables ambientales después de controlar por distancia geográfica. En concreto, la temperatura media del trimestre más frío se correlacionó significativamente con la distancia genética en *Washingtonia* (prueba parcial de Mantel, $r = 0.25$, $p < 0.0001$), mientras que la precipitación del trimestre más seco se correlacionó significativamente con la distancia genética en *Brahea* (prueba de Mantel parcial 0.11, $p < 0.001$).

7.5.2 Detección de *loci* atípicos asociados con las variables ambientales

Para detectar la base genómica detrás de estas asociaciones ambientales, se utilizaron tres métodos complementarios, que permitieron probar la evidencia de adaptación local en *Washingtonia* y *Brahea* en relación con la temperatura media del trimestre más frío y la precipitación del trimestre más seco, respectivamente. BAYESCENV no encontró ningún locus asociado con la temperatura en *Washingtonia* y un único SNP se asoció significativamente con la precipitación en *Brahea*, pero sólo al especificar nueve poblaciones. Por el contrario, el Modelo

Latente de Factor Mixto (LFMM) identificó 231 SNPs significativamente asociados con la temperatura en *Washingtonia* (con una tasa de corrección FDR de 5%) y entre 373 y 156 SNPs asociados con la precipitación en *Brahea* dependiendo de si dos o nueve poblaciones fueron especificados. SAMBADA fue más conservador, identificando 29 SNPs significativamente asociados con la temperatura en *Washingtonia* y sin SNPs asociados con la precipitación en *Brahea*. Finalmente, se utilizó SPLITSTREE para construir árboles filogenéticos por separado para SNPs identificados por uno o más de los enfoques anteriores (en lo sucesivo “*loci* atípicos”) y los SNP restantes (en lo sucesivo denominados “*loci* neutrales”) (Fig.16).

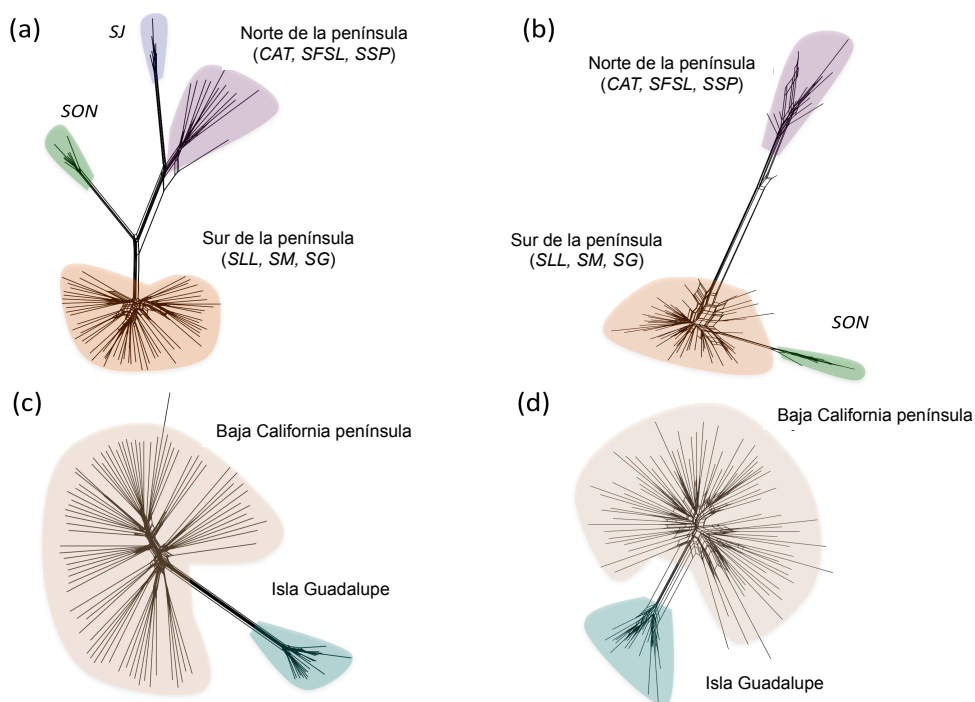


Figura 16. Redes filogenéticas construidas por separado para (a) *Washingtonia* usando *loci* neutrales; (b) *Washingtonia* usando *loci* atípicos (asociados significativamente con temperatura); (c) *Brahea* usando *loci* neutrales; y (d) *Brahea* usando *loci* atípicos (asociados significativamente con precipitación).

Se encontró un patrón sorprendente para *Washingtonia* en el que los loci neutrales resolvieron cuatro grupos correspondientes a: (i) sur de la península de Baja California, (ii) norte de la península de Baja California, (iii) SJ y (iv) SON (Fig. 16a), pero sólo dos grupos se resolvieron sobre la base de *loci* atípicos: (i) sur de la península combinado con SON y norte de la península de Baja California, combinado con SJ (Fig. 16b). Los árboles filogenéticos construidos a partir del mismo número de *loci* neutrales seleccionados al azar que los *loci* atípicos, también recuperaron cuatro poblaciones (Fig. 17), lo que sugiere que la topografía contrastante recuperada por los *loci* atípicos y neutrales no es el resultado de las diferencias en el poder de resolución.

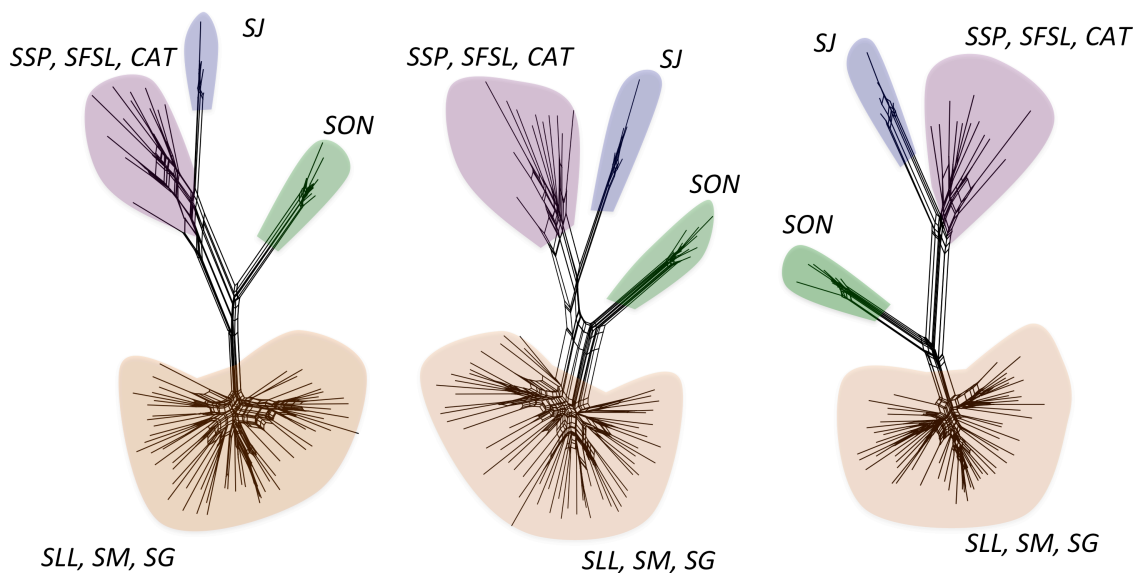


Figura 17. Árboles filogenéticos para *Washingtonia* basados en tres subconjuntos diferentes de 252 *loci* neutrales seleccionados aleatoriamente.

La principal diferencia entre los árboles filogenéticos resueltos por los *loci* atípicos y neutrales en *Brahea* fue que los primeros no podían resolver las sierras individuales de la península (Fig. 16d,c). Sin embargo, esto parece estar relacionado con la resolución genética ya que los árboles filogenéticos, basados en el mismo número de *loci* neutrales, seleccionados al azar que atípicos, también fallaron en resolver claramente las sierras (Fig. 18).

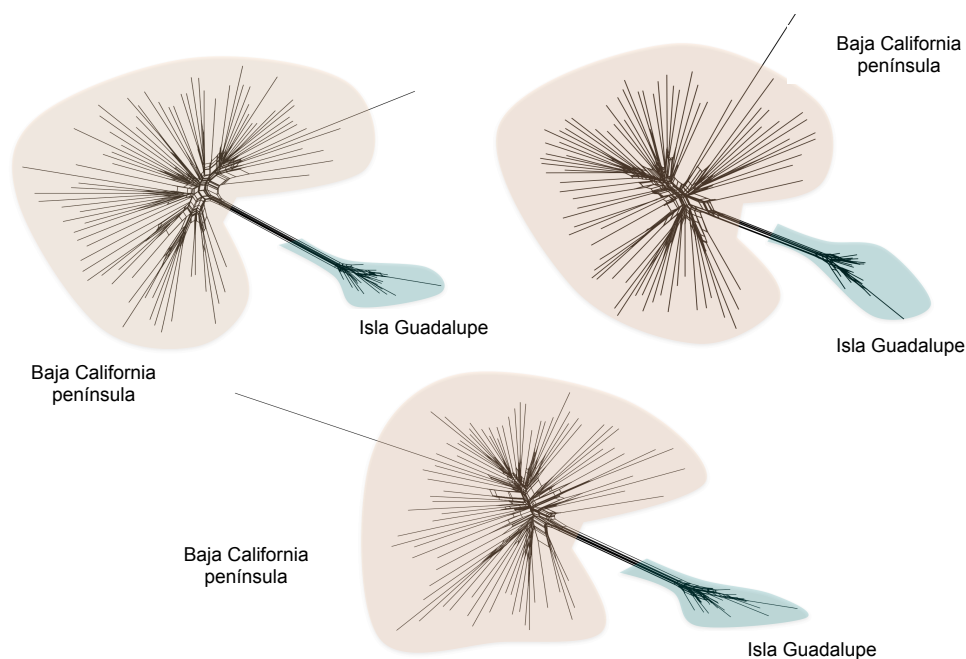


Figura 18. Árboles filogenéticos para *Brahea* basados en tres subconjuntos diferentes de 373 *loci* neutrales seleccionados al azar.

7.5.3 Modelado de nicho ecológico (ENM)

Los valores de AUC de los modelos de nicho ecológico de las distribuciones proyectadas contemporáneas, promediados para 30 repeticiones, fueron alrededor de 0.97 para ambas *Washingtonia* y *Brahea*, lo que indica un buen comportamiento predictivo del modelo. Para *Washingtonia*, las variables ambientales que más contribuyeron al modelo MAXENT de distribución proyectada fueron la precipitación del trimestre más seco, la temperatura media del trimestre más frío y la temperatura media del trimestre más húmedo en orden ascendente. En conjunto, estas variables aportaron más del 70% del poder explicativo del modelo, lo que indica que son muy buenos predictores de la distribución geográfica contemporánea de las palmas de *Washingtonia*. Para *Brahea*, la precipitación del trimestre más seco, la temperatura media del trimestre más cálido

y la temperatura media del trimestre más seco fueron los principales predictores de la distribución geográfica, que aportaron más del 67% del poder explicativo del modelo (Tabla XIII).

Tabla XIII. Las contribuciones relativas de diferentes variables ambientales a los modelos MAXENT de la distribución contemporánea de *Washingtonia* y *Brahea*.

Código	VARIABLES AMBIENTALES	<i>Washingtonia</i> , % contribución	<i>Brahea</i> , % contribución
Bio8	Temperatura media del trimestre más húmedo	16.2	3.9
Bio9	Temperatura media del trimestre más seco	3.2	11.1
Bio10	Temperatura media del trimestre más caliente	8.2	14.5
Bio11	Temperatura media del trimestre más frío	17.1	10.2
Bio16	Precipitación del trimestre más húmedo	14.3	9.2
Bio17	Precipitación del trimestre más seco	37.2	42.0
Bio19	Precipitación del trimestre más frío	3.9	9.2

En general, la distribución pronosticada para *Washingtonia* bajo las condiciones actuales (Fig. 19a) fue similar a la distribución real (Minnich *et al.*, 2011 y Fig. 1), con dos áreas principales de alta probabilidad de ocurrencia, una en el sur de Baja California (SM y SG) y el otro en el norte de Baja California (SJ) y en el sur de California.

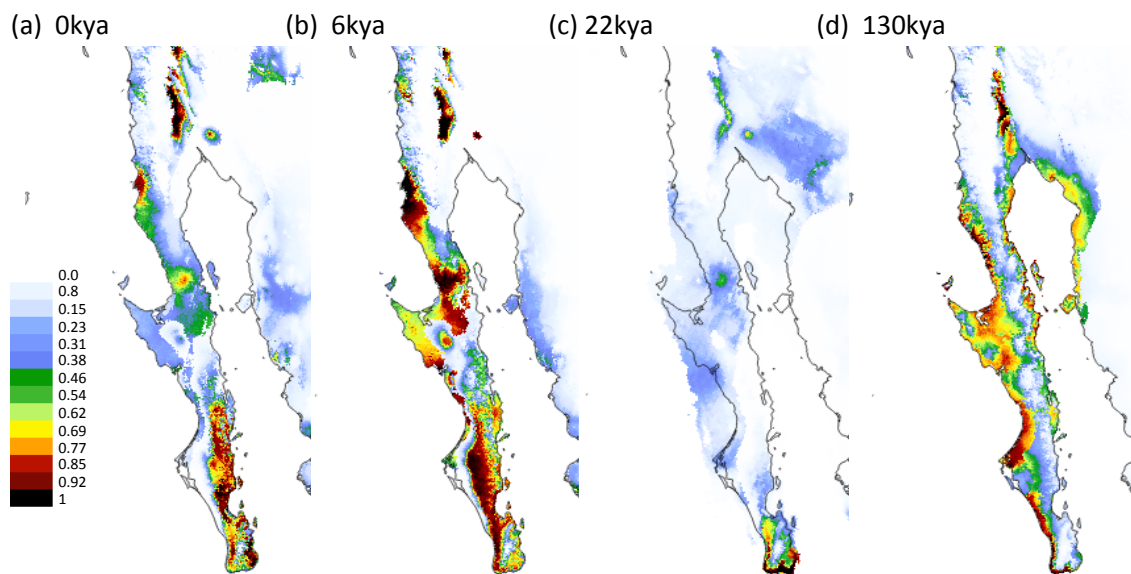


Figura 19. Probabilidad de ocurrencia de *Washingtonia* en Baja California: (a) en la actualidad; (b) durante el Holoceno medio; (c) durante el último máximo glacial; (d) durante el último interglacial. Ver el texto principal para más detalles.

Sin embargo, también hubo algunas áreas proyectadas por el modelo donde *Washingtonia* no se encuentra actualmente, como, por ejemplo, la costa del Pacífico alrededor del paralelo 30 norte. La distribución actual proyectada para las palmas de *Brahea* fue restringida en comparación con *Washingtonia*, siendo *SLL*, *SSF* y *SSPM* las principales áreas de alta probabilidad de ocurrencia (Fig. 20a).

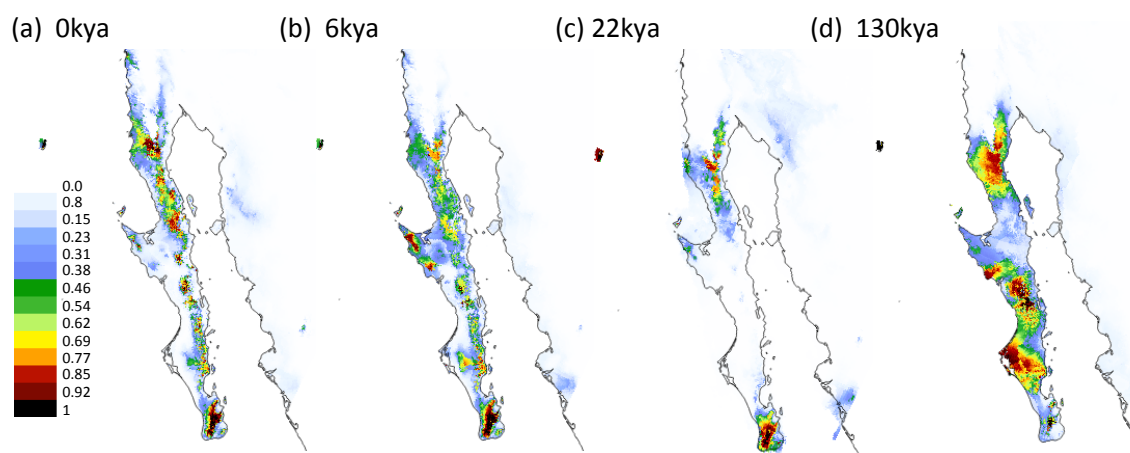


Figura 20. Probabilidad de ocurrencia de *Brahea* en Baja California: (a) en la actualidad; (b) durante el Holoceno medio; (c) durante el último máximo glacial; (d) durante el último interglacial. Ver el texto principal para más detalles.

Durante el Holoceno medio (hace aproximadamente 6 mil años) la distribución geográfica prevista de *Washingtonia* era más amplia que la distribución contemporánea, con hábitats favorables situados especialmente a lo largo de la costa del Pacífico de la península central y meridional (Fig. 19b). Por el contrario, la distribución prevista para *Brahea* durante el Holoceno medio fue similar a su distribución proyectada actual (Fig. 20b). Más atrás en el tiempo, durante el último máximo glacial (hace aproximadamente 22 mil años), ambas especies parecen haber sido restringidas al extremo más meridional de la península, sin embargo, al parecer *Brahea* también sobrevivió en una pequeña área de la península central (Figs. 19c y 20c). Según las estimaciones de MAXENT, durante la último interglacial (aproximadamente 120-130 mil años atrás), la distribución pronosticada para *Washingtonia* se desplazó principalmente a las áreas costeras de la península septentrional y sur (Fig. 19d). *Brahea* por otra parte parece haber

tenido condiciones favorables en gran parte de la península, que se extendía en SG, SSP y SSPM (Fig. 20d).

La superposición estimada de nicho para *Washingtonia* y *Brahea* fue considerable de 0.55 y 0.7 utilizando D de Schoener y I de Hellinger, respectivamente. Sin embargo, las pruebas de aleatorización de identidad de nicho indicaron que las palmas de *Washingtonia* y *Brahea* no son ecológicamente equivalentes (Fig. 21), independientemente de la medida de similitud utilizada (D de Schoener o I de Hellinger).

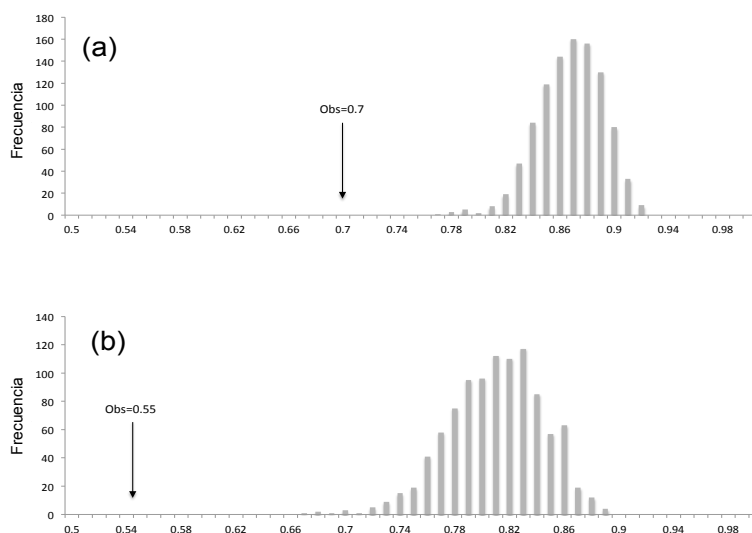


Figura 21. Diagrama de pruebas de identidad de nicho ecológico entre *Washingtonia* y *Brahea* cuantificado usando (a) la distancia Hellinger estandarizada, I y (b) Schoener's D. Las líneas verticales en cada gráfica representan los valores reales de superposición de nicho, mientras que los histogramas representan aquellos de 1,000 pseudoreplicados.

8. DISCUSIÓN.

Los estudios comparativos de relictos ecológicos nos pueden proveer una perspectiva nueva e importante sobre los procesos ecológicos y geológicos que afectan la estructura poblacional genética de estas especies y poblaciones. Lo cual permitiría mejorar nuestro conocimiento sobre la manera a través de la cual los organismos responden a los cambios ambientales. En la presente tesis se utilizó dos diferentes metodologías de genética molecular, incluyendo la secuenciación de Sanger y Genotipificación por Secuenciación, para explorar los patrones genómicos de la estructura poblacional de dos géneros simpátricos de palmas de Norte América, *Washingtonia* y *Brahea*. Adicionalmente, se utilizó modelaje de nicho ecológico para determinar con más precisión que variables ecológicas afectan y limitan la distribución de dichas especies de palmas desérticas. Los hallazgos principales del presente trabajo se discuten a continuación.

8.1 Delimitación de las especies.

Uno de los objetivos principales del presente trabajo fue establecer los límites de distribución para *Washingtonia* y *Brahea* en el área estudiada y confirmar la presencia de las especies descritas. Se obtuvo un acuerdo mixto entre filogenia basada en secuencias de cloroplasto, SNP y las relaciones taxonómicas actualmente reconocidas dentro de *Washingtonia* y *Brahea* (Felger y Joyal 1999; Henderson *et al.*, 1995; Minnich *et al.*, 2011).

En el caso de palmas de *Washingtonia* los resultados de análisis de secuencias estuvieron, en general, de acuerdo con los trabajos morfológicos publicados (Felger y Joyal, 1999; Minnich *et al.*, 2011). Así, no detectamos haplotipos compartidos entre las dos especies de *Washingtonia* y sus límites de distribución fueron claros y no se superpusieron. El límite más sureño para *W. filifera* fue Sierra

Juárez (SJ), mientras que limite más norteño de *W. robusta* fue Cataviña (CAT) (Fig. 4, 5). Basándose en los datos de SNP, las relaciones filogenéticas entre las dos especies de *Washingtonia* fueron menos claras. Se confirmó la presencia de dos líneas genéticas principales (Fig. 8, 9). Una de las cuales correspondió a *W. robusta* del norte de la península de Baja California (SSP, SFSL y CAT) y *W. filifera* mientras que la otra correspondió a *W. robusta* de la península del sur (SLL, SM y SG) y muestras continentales (SON). Estos hallazgos son inconsistentes con el estado taxonómico actual de *W. filifera* (Cornett, 2008; Minnich *et al.*, 2011) o análisis basado en datos de secuencias de cloroplasto. Sin embargo, estos resultados son consistentes con la aparente ausencia de aislamiento reproductivo entre *W. robusta* y *W. filifera* ya que la hibridación en cautiverio entre estas especies es común (Hodel, 2014).

En el caso de *Brahea* los resultados de secuencias de cloroplasto y nucleares fueron distintos a los límites de distribución entre *B. armata* y *B. brandegeei* descritos en literatura. Por ejemplo, Minnich *et al.* (2011) sugirieron que *B. brandegeei* se distribuye en la parte sur de la península desde sierra La Laguna hasta Sierra San Francisco. Sin embargo, esta distribución no fue soportada por nuestros resultados moleculares. Por ejemplo, los marcadores de cloroplasto indicaron que el único linaje genéticamente distinto corresponde a las poblaciones de *Brahea* en Región de Cabo (SLL). Pero los resultados del marcador nuclear estuvieron en desacuerdo e indicaron que no existe una separación clara entre ninguna de las sierras en la península y que palmas de SLL no son genéticamente diferentes de las poblaciones del resto de la península (Figs. 4 y 5). Los marcadores SNPs presentaron resultados similares a los encontrados con marcadores de secuencias nucleares. Así, no se detectó soporte para reconocer separación de *Brahea* en la península en dos especies (Figs. 8 y 9). Una explicación posible a este resultado es que la clasificación taxonómica original fue basada en las características morfológicas sutiles como diferencia en la coloración de hoja y arquitectura de inflorescencia (Felger y Joyal 1999; Henderson *et al.*,

1995). Estas características morfológicas pueden variar entre poblaciones debido a plasticidad fenotípica, como respuesta a diferencias en condiciones ambientales (Roncal *et al.*, 2012). Esta hipótesis podría ser probada al llevar a cabo trasplante recíproco de organismos o experimento en jardín común (common garden).

Adicionalmente, se incluyó en el análisis las muestras de *B. edulis* de la Isla Guadalupe, lo que permitió hacer comparaciones entre poblaciones peninsulares e insulares. Similar a los resultados para *Brahea* peninsular, se detectaron diferencias marcadas en resultados de análisis de datos de cloroplasto y nucleares. Así por ejemplo, basándose en resultados nucleares, *B. edulis* presentó diferencias pronunciadas de las poblaciones de la península, sin haplotipos compartidos. Sin embargo, al analizar los marcadores de cloroplasto, todas las muestras de *B. edulis* compartieron un único haplotipo con las muestras de la *Brahea* peninsular. Hay varias explicaciones a las diferencias observadas entre análisis de datos de cloroplasto y nucleares. En primer lugar, la introgresión del ADN de cloroplasto podría explicar el patrón observado, sin embargo, esta explicación se ve muy poco probable dado el origen volcánico de la Isla Guadalupe y su grado de aislamiento geográfico (Moran, 1996). Sorteado de linaje incompleto de polimorfismos compartidos podría ser importante en el caso observado, especialmente teniendo en cuenta la muy baja diversidad genética observada en secuencias de cloroplasto y baja tasa de mutaciones en Arecaceae en general (Wilson *et al.*, 1990). Adicionalmente, el genoma de cloroplasto refleja únicamente la dispersión mediada por semillas (Hamrick y Nason, 2000) sugiriendo que el patrón contrastante de diferenciación entre dos tipos de marcadores podría ser el resultado de historias evolutivas distintas que han tomado la dispersión de semillas y el polen (Hamilton y Miller, 2002; Petit *et al.*, 2005). Los señales filogenéticas incongruentes entre marcadores nucleares y de cloroplasto son muy comunes en estudios de plantas (Pillon *et al.*, 2013). Esto implica que con el propósito de evitar los sesgos de unos pocos marcadores es importante llevar a cabo el análisis utilizando mucho marcadores distribuidos en

todo el genoma (Narum *et al.*, 2013). Así mismo, los resultados del análisis de SNPs fueron más claros y parecidos a los encontrados con la secuencia nuclear. Se detectó una diferenciación genética pronunciada entre palmas insulares y peninsulares. Utilizando dos enfoques filogenéticos, las palmas de la Isla Guadalupe se resolvieron como un clado monofilético, indicando su historia evolutiva única y separada de las poblaciones de la península. Resultados similares de aislamiento genético de especies de plantas de Isla Guadalupe con respecto a sus conspecíficos de la península, han sido reportados previamente en otras especies de plantas como ciprés y pino (Aleixandre *et al.*, 2013; Karhu *et al.*, 2005).

8.2 Patrones de diversidad y estructura genética a nivel poblacional

Aunque esperábamos que las palmas de *Washingtonia* y *Brahea*, que se distribuyen simpátricamente, exhibirían patrones similares de estructuración de haplotipos a lo largo de la península, encontramos lo opuesto (Figs. 4 y 5). Por ejemplo, basándose en los resultados de AMOVA y BAPS, las palmas de *Washingtonia* en Baja California se agrupan en dos entidades genéticas que comprenden palmeras de SJ y el resto de la península. En contraste, el análisis AMOVA de las secuencias nucleares en *Brahea* favoreció un escenario en el que cada sierra era genéticamente distinta (Fig. 2b, Escenario 3). Estas diferencias probablemente se deben a los requisitos de hábitat ligeramente distintos y las diferencias en las tolerancias de sequía y frío de *Washingtonia* y *Brahea* (Cornett, 1987a,b; Franco-Vizcaino *et al.*, 2007). Fue posible detectar estas diferencias sutiles con un análisis de un modelo de nicho ecológico. Así, aunque el predictor ecológico más fuerte de la distribución contemporánea de las palmeras de *Washingtonia* y *Brahea* fue la precipitación del trimestre más seco, la segunda variable más importante que afectó a la distribución de *Washingtonia* fue la temperatura media del trimestre más frío, mientras que para *Brahea* fue la temperatura media del trimestre más cálido. De acuerdo con estas diferencias, la

superposición de nicho estimada para *Washingtonia* y *Brahea* fue entre 55% y 70%, y el análisis posterior indicó que las palmas de *Washingtonia* y *Brahea* no son ecológicamente equivalentes. Los cambios temporales pronosticados en la distribución de estos dos géneros en los últimos 130,000 años también indicaron que *Washingtonia* y *Brahea* respondieron de manera diferente a los cambios históricos en el clima (Figs. 19, 20). Por ejemplo, la comparación de la distribución contemporánea e histórica de *Washingtonia* sugiere que su rango pudo haberse contraído reciente, mientras que *Brahea* ha mantenido su distribución por lo menos durante últimos 6,000 años.

La dispersión, es otro elemento esencial que forma patrones de estructura genética en la Arecaceae (Eiserhardt *et al.*, 2011). Aunque muchos vertebrados como aves, murciélagos, coyotes y zorros han sido propuestos como posibles agentes de dispersión de semillas de *Washingtonia* y *Brahea*, el efecto de estos agentes sobre la diversidad genética y la estructura de las palmas no ha sido probado adecuadamente (Cornett, 2008; Wehncke *et al.*, 2010). En el caso de *Brahea*, es muy probable que los impulsos de agua son más significativos en términos de dispersión de semillas que los vertebrados (Wehncke *et al.*, 2009, 2010). Por lo tanto, un estudio comparativo que cuantifique las diferencias en la capacidad de dispersión entre *Washingtonia* y *Brahea* definitivamente ayudaría a ampliar nuestra comprensión de patrones de distribución observados hoy el día.

De acuerdo con lo esperado, los niveles de diversidad de haplotipos eran bajos en *Washingtonia* tanto para los datos de cloroplasto como para la secuencia nuclear, mientras que la diversidad nuclear en *Brahea* peninsular fue algo mayor. Los niveles de diversidad que se encontró fueron comparables con otras especies de plantas relictas de la región (por ejemplo, *Quercus brandegeei*, Cavender-Bares *et al.*, 2015; *Guaiacum unijugum*, McCauley *et al.*, 2010), así como a las poblaciones de *Washingtonia* en los EE.UU. (McClenaghan y Beauchamp, 1986).

Notoriamente, la diversidad de haplotipos de secuencia nuclear no estaba distribuida uniformemente a lo largo de la península (Fig. 5). En las palmas de *Washingtonia*, se encontró mayor diversidad en las sierras meridionales (SLL y SM), mientras que en las palmas de *Brahea*, las sierras de la mitad de la Península (SSF y SL) tuvieron la mayor diversidad. Los niveles más altos de diversidad en las poblaciones meridionales de *Washingtonia* se puede explicar por la expansión postglacial y la re-colonización de la península desde los refugios meridionales, como se ha encontrado en otras especies de plantas de Baja California (Clark-Tapia y Molina-Freaner, 2003; Gutiérrez-Flores *et al.*, 2016; Nason *et al.*, 2002). Este escenario también fue apoyado por el análisis ENM (Fig. 19), que sugirió que durante el LGM, el hábitat adecuado para *Washingtonia* se redujo a una franja costera estrecha en el extremo sur de la península de Baja California. Curiosamente, otro posible refugio en el que *Washingtonia* probablemente sobreviviera fue en el sur de California. Sin embargo, basándose en la distribución observada de haplotipos, las palmas de este refugio fueron capaces de re-colonizar sólo SJ y no se movieron más hacia el sur. Esto probablemente se debe a la observación de que la Sierra San Pedro Mártir ha actuado como una barrera de dispersión natural para *Washingtonia* (Minnich *et al.*, 2011). Aun cuando, *W. robusta* es naturalmente rara en el norte de la península, tiene requerimientos de agua más altos y parece ser menos tolerante a temperaturas bajas que *Brahea* (Minnich *et al.*, 2011). Por lo tanto, no podemos descartar la posibilidad de que estos patrones de distribución podrían ser afectados por la selección que favorece la retención de haplotipos específicos a través de desequilibrio de ligamiento a los loci funcionales. Una forma de probar esto sería la utilización de marcadores genéticos funcionales implicados en la adaptación (Luikart *et al.*, 2003). Esta hipótesis fue parcialmente conformada con el análisis de los atípicos (véase más adelante).

El patrón de distribución de la diversidad de secuencias encontrado en *Brahea* se puede explicar por la presencia de refugios glaciales, pero no en el sur, sino en la

parte central de la península (Garrick *et al.*, 2009). Sin embargo, el análisis ENM contradice esta explicación y sugiere que la distribución de *Brahea* durante el LGM se concentró en áreas relativamente grandes en *SL* y *SSPM* (Fig. 20) Otra posibilidad que puede explicar la alta diversidad genética en el centro de la península sería que esta región representa la zona de contacto de recolonización entre las palmas de los refugios del sur (*SLL*) y del norte (*SSPM*). Esta hipótesis también ayudaría a explicar por qué ha sido difícil establecer límites precisos de especies entre *B. brandegeei* y *B. armata* utilizando características morfológicas (Felger y Joyal, 1999; Minnich *et al.*, 2011).

Moviéndonos hacia las palmas de la Isla Guadalupe, se detectaron los niveles muy bajos de la variabilidad genética. Sólo un haplotipo de cloroplasto y un haplotipo nuclear se recuperó para 17 y 14 individuos de *B. edulis*. Este patrón contrasta con los resultados encontrados para otras especies arbóreas de la Isla (por ejemplo, *Pinus radiata* (Karhu *et al.*, 2005) y *Cupressus guadalupensis* (Rosas-Escobar *et al.*, 2011)). Aunque el efecto fundador es a menudo invocado para explicar los bajos niveles de variación genética de las especies de las islas, muchos otros factores pueden influir en la diversidad genética de las plantas endémicas de las islas, incluyendo extrínsecos como el tamaño de la isla, la distancia al continente y la cantidad de hábitat disponible. Otro grupo de factores comprende las propiedades intrínsecas tales como la tasa de mutación, la capacidad de dispersión, la diversidad de la población de procedencia y la capacidad de responder a la perturbación humana (Stuessy *et al.*, 2014). Cuando todos estos factores se tienen en cuenta, la baja diversidad genética detectada para *B. edulis* no es sorprendente. Por ejemplo, aunque la superficie total de la Isla Guadalupe es de unos 240 km², *B. edulis* ocupa sólo 0.8 km² en el extremo norte de la Isla (Garcillán *et al.*, 2012; Oberbauer, 2005). Este hábitat restringido reduce el establecimiento potencial de nuevas poblaciones y limita el tamaño efectivo de la población (Frankham, 1996). Otro factor importante que puede explicar la baja diversidad de *B. edulis* es muy baja diversidad genética de poblaciones de *Brahea*

de la península de Baja California. Por ejemplo, sólo se detectaron dos haplotipos de cloroplasto en más de 60 individuos. Además, el largo tiempo de generación de *Brahea* (Bullock y Heath, 2006) y las bajas tasas de mutación en Arecaceae (Wilson *et al.*, 1990) pueden haber limitar la velocidad a la que se adquiere nueva variación genética (Stuessy *et al.*, 2014).

8.3 Estructura genética de escala fina

La utilización de gran número de marcadores genómicos ha permitido una investigación mucho más detallada de los patrones de la estructura de las poblaciones de las palmas, así como permitió detectar los eventos de la migración entre las poblaciones. Centrándose primero en la estructura de la población, el GBS descubrió patrones contrastantes y hasta cierto punto inesperados de diferenciación genómica en *Washingtonia* y *Brahea* de la península de Baja California. Específicamente, *Washingtonia* mostró una clara división norte-sur, mientras que en *Brahea* todas las sierras podrían ser claramente resueltas y un fuerte patrón de aislamiento por distancia (Mantel $r = 0.62$, $P < 0.001$) fue detectado.

No está del todo claro por qué las palmas de *Washingtonia* se agrupan en dos poblaciones distintas. Muchas especies de plantas y animales en la península muestran una división norte-sur similar que se ha relacionado con la formación temporal de una vía marítima en la península central hace un millón de años (Riddle *et al.*, 2000). Sin embargo, la ubicación de esta vía marítima no es consistente con los resultados de agrupamiento para *Washingtonia*, ya que SSP aunque pertenece al grupo septentrional, se encuentra al sur de la vía marítima propuesta. Por lo tanto, una explicación alternativa puede ser la presencia de dos ecotipos de *Washingtonia* que están adaptados localmente a regímenes de temperatura marcadamente diferentes, una posibilidad que parece estar apoyada por el análisis de *loci* genómicos atípicos (véase más adelante).

En consonancia con la limitada capacidad de dispersión de *Brahea* (Wehncke *et al.*, 2009; Wehncke y López-Medellín, 2015), también se encontró evidencia de una estructura de población de escala fina dentro de la Isla Guadalupe. Esto fue inicialmente inesperado dada la escala geográfica pequeña y debido a que los marcadores de secuencias de cloroplasto y nucleares no presentaron diversidad alguna. Una explicación podría ser que la divergencia genética ha actuado como respuesta a las marcadas diferencias climáticas entre el extremo del norte de la isla y la parte sur mucho más seca (Garcillán *et al.*, 2012). Sin embargo, también parece probable que la presencia de cabras ferales en la isla durante más de un siglo puede haber contribuido a la estructuración poblacional de la escala fina porque se sabe que las cabras tienen un fuerte efecto negativo sobre el reclutamiento de *B. edulis* (Garcillán *et al.*, 2008). Gracias a la reciente eliminación de todas las cabras de la Isla Guadalupe (Luna-Mendoza, 2011), esta última hipótesis se puede comprobar al llevar a cabo un análisis de reclutamiento y dispersión de las semillas de *B. edulis*.

Un patrón adicional inesperado fue revelado por el análisis de agrupamiento de los datos del GBS. En general, la mayoría de las palmas individuales se agruparon con sus respectivos grupos geográficos y los niveles de mezcla entre las poblaciones identificadas fueron bajos. Sin embargo, varias palmas de las muestras provenientes de las poblaciones del norte tenían genotipos que eran más coherentes con los ancestros en las poblaciones del sur (Figs. 10 y 11), un patrón que es sugestivo de dispersión reciente a larga distancia. Para explorar esto más a fondo, se utilizó TREEMIX que permitió inferir el número más probable de los eventos de migración en ambos géneros de palma. Los resultados para *Washingtonia* fueron claros, con un soporte para dos eventos distintos de migración de sur a norte que abarcan alrededor de 450 km. Por el contrario, aunque dos eventos de migración para *Brahea* fueron propuestos, estos no fueron apoyados por pruebas de tres poblaciones y por lo tanto deben tratarse como poco

probables en el mejor de los casos. Sin embargo, uno de estos eventos de migración desde Sierra Libertad (SL) hacia la Isla Guadalupe, hallazgo que si se confirma ayudaría a resolver la pregunta del origen de las palmas de *Brahea* en esta isla volcánica aislada (Moran, 1951, 1956; Watson, 1876). Es interesante especular sobre por qué la evidencia clara de la dispersión a larga distancia sólo se encontró en *Washingtonia*. Las diferencias en las capacidades de dispersión natural de los dos géneros son poco probables de desempeñar un papel importante, porque, aunque *Brahea* al parecer presenta la dispersión más limitada, *Washingtonia* no puede ser dispersada naturalmente sobre escalas tan grandes como casi 500 kilómetros. Una hipótesis tentativa, es una larga historia de relación entre palmas de *Washingtonia* y los seres humanos. Las palmas en general han sido ampliamente utilizados como fuente de alimento, materiales de construcción y, más recientemente, como ornamentos en ciudades y jardines. Las introducciones recientes y las translocaciones de palmeras de importancia agrícola también han sido bien documentadas (Rivera *et al.*, 2013), por lo que existe un claro precedente de la dispersión mediada por humanos en las palmas (Aschmann, 1957; Kondo *et al.*, 2012). La noción de que los humanos podrían haber estado involucrados en la dispersión de las palmas en la península de Baja California no es completamente nueva (Felger y Joyal, 1999; Minnich *et al.*, 2011). Los frutos de *Washingtonia* aparentemente fueron utilizados como fuente de alimento por los nativos de la península de Baja California y de México continental (Felger y Joyal, 1999; Felger y Moser, 1985). Por otra parte, los frutos de *Brahea* fueron menos apreciados y han sido referidos como "inútiles" (Minnich *et al.*, 2011). Estas observaciones llevaron a la sugerencia de que los pueblos indígenas de la península de Baja California pudieron haber dispersado a *Washingtonia* antes del contacto europeo. Es importante mencionar que los dos oasis del norte que contienen las palmas *Washingtonia* de ascendencia sur son también los sitios de las misiones coloniales españolas, donde la agricultura y el comercio habrían sido especialmente bien desarrollados (Minnich *et al.*, 2011). Así, aunque la presente tesis proporciona apoyo empírico a la hipótesis de que las palmas de

Washingtonia en la península de Baja California posiblemente fueron dispersadas por los humanos, no es posible decir si los indígenas o los colonos europeos fueron responsables.

8.4 Divergencia ecológica

Existe un creciente interés y apoyo empírico de la idea de que la selección divergente mediada por el medio ambiente (temperatura, precipitación, aridez) puede conducir a la divergencia genética, lo que va a contribuir al aislamiento reproductivo y especiación (Beheregaray *et al.*, 2015). Las palmas de Baja California son interesantes en este respecto porque residen en los límites septentrionales de distribución de la *Arecaceae* y por lo tanto se esperaría que *Washingtonia* y *Brahea* han sobrevivido en extremos climáticos que pudieran haber sometido a estas poblaciones a presiones de selección inusualmente fuertes (Woolbright *et al.*, 2014). Los resultados obtenidos en la presente tesis son consistentes con esta hipótesis debido a que *Washingtonia* y *Brahea* muestran asociaciones significativas entre la distancia genética y las variables climáticas, incluso después de controlar por distancia geográfica. Debido a que *Washingtonia* y *Brahea* están afiliadas a climas más cálidos y húmedos y son sensibles a las heladas, para el análisis de la divergencia ecológica, se seleccionaron tres variables climáticas candidatas: la temperatura media del trimestre más frío, la precipitación del trimestre más seco y el índice de aridez. Fue sorprendente no detectar ninguna asociación entre la distancia genética y el índice de aridez. Sin embargo, esta última se expresa como una función generalizada de precipitación, temperatura y evapotranspiración potencial, por lo que puede fallar en capturar aspectos específicos del medio ambiente como la disponibilidad de agua subterránea o la cantidad de lluvia en épocas específicas del año (Franco-Vizcaino *et al.*, 2007). Por el contrario, se encontró que la temperatura media del trimestre más frío era predictiva de la diferenciación genética en *Washingtonia*, de la misma manera que esta variable ambiental fue una de las tres más importantes en

predecir la distribución de *Washingtonia* según modelo de nicho ecológico. En *Brahea* la distancia genética se asoció únicamente con la precipitación del trimestre más seco. Esto sugiere que, aunque muchas de estas palmas fueron muestreadas de los mismos oasis, los dos géneros pueden ser sometidos a presiones de selección contrastantes que implican la exposición a bajas temperaturas en *Washingtonia* y la disponibilidad estacional de agua en *Brahea*.

Aunque el conocimiento limitado de la respuesta fisiológica de *Brahea* a sequía impide una discusión más detallada de la asociación encontrada con la lluvia, la observación que la divergencia genética es mediada por la temperatura en *Washingtonia* tiene sentido. *W. robusta* es menos resistente a las heladas que *Brahea* y por lo general crece por debajo de los 1,000 m en la península de Baja California, donde las temperaturas ambiente rara vez caen por debajo de -5°C (Minnich *et al.*, 2011). Por lo tanto, *W. robusta* es naturalmente rara en la mitad norte de la península, donde las temperaturas invernales pueden caer tan bajo como -10°C (Minnich *et al.*, 2011). Por lo tanto, la selección fuerte con respecto a la temperatura ambiente puede haber impulsado la evolución de dos ecotipos distintos, correspondientes a las poblaciones norte y sur de *W. robusta* detectadas por nuestros análisis filogenéticos y de agrupamiento individual.

Para explorar aún más la hipótesis anterior, se utilizaron tres enfoques diferentes para la prueba de *loci* atípicos (relacionado con variables ecológicas). Los diferentes enfoques identificaron subconjuntos de *loci* de diferentes tamaños y en gran parte no superpuestos, lo cual es consistente con estudios previos y refleja diferencias en las metodologías y supuestos subyacentes (Benestan *et al.*, 2016). Para capturar tantos atípicos como sea posible agrupamos todos los *loci* marcados por, al menos, un enfoque y los clasificamos como atípicos, mientras que los *loci* restantes como neutrales. Al reconstruir los árboles filogenéticos para estas dos clases de *loci* encontramos un claro patrón de diferenciación en *Washingtonia*, con los *loci* neutrales resolviendo cuatro grupos, mientras que los *loci* atípicos

detectaron solo dos grupos genéticamente distintos. Este hallazgo fue similar a estudios que de la misma manera resolvieron diferentes árboles basados en *loci* neutrales y atípicos (Funk *et al.*, 2016; Keller *et al.*, 2013; Matala *et al.*, 2014). El patrón de divergencia encontrado podría considerarse una huella de selección donde palmas de *SJ* y las sierras del norte se han divergido en las secciones de genoma neutral, mientras que la selección estabilizadora parece haber mantenido los genotipos muy similares en los *loci* funcionales.

Los resultados equivalentes para *Brahea* fueron menos claros. Dentro de la península de Baja California, los *loci* atípicos fallaron en resolver las sierras individuales o presentar algún patrón de divergencia notorio. Sin embargo, los árboles filogenéticos basados en el mismo número de *loci* neutrales seleccionados al azar tampoco pudieron agrupar las muestras con su sierra respectiva, lo que sugiere que las diferencias genéticas entre las sierras pueden ser demasiado débiles para ser resueltas por unos pocos cientos de SNPs. O bien esto podría reflejar la presión selectiva más débiles en las palmas *Brahea* o, alternativamente, la asociación entre la distancia genética y la precipitación del cuarto más seco en *Brahea* podría ser un error de tipo I. Este último se apoya en la observación de que dos de los tres enfoques analíticos no detectaron *loci* funcionales en *Brahea*, mientras que hubo al menos una cierta superposición entre los enfoques metodológicos en el caso de *Washingtonia*.

8.5 Congruencia con los escenarios históricos

Durante los últimos seis millones de años, la península de Baja California ha sufrido muchos cambios geológicos que han afectado profundamente la distribución y la estructura genética de las especies de plantas y animales (Dolby *et al.*, 2015; Riddle *et al.*, 2000). En particular, la formación del Golfo de California y la separación de la península de la parte continental de México, que comenzó hace aproximadamente 6 millones de años, resultó en el aislamiento completo o

parcial de muchas poblaciones de plantas y animales a ambos lados de la ruptura (Dolby *et al.*, 2015; Garrick *et al.*, 2009; Gutiérrez-Flores *et al.*, 2016; Riddle *et al.*, 2000). En la actualidad, el Golfo de California representa una importante barrera para el flujo de genes, incluso para ciertos organismos con moderada capacidad de dispersión (Grismer, 2000; Riddle *et al.*, 2000), por lo que en algunos aspectos no sorprende que el Golfo parece impedir el flujo de genes en organismos sésiles como son las plantas (Cavender-Bares *et al.*, 2015). En consonancia con esto, se encontró un patrón de diferenciación genética profundo entre *W. robusta* continental y peninsular utilizando ambos tipos de marcadores. Los resultados de los datos de cloroplastos para *Brahea* fueron similares, pero debido a que sólo se analizó un individuo de la parte continental de México, no fue posible sacar conclusiones significativas.

Sin embargo, a pesar de que no se contó con las muestras de la parte continental de México para *Brahea*, pudimos incluir una especie endémica de la Isla Guadalupe. Esta isla volcánica nunca ha estado en contacto con la península de Baja California y, en consecuencia, casi el 16% de sus especies de plantas nativas son endémicas (Batiza, 1977; León De La Luz *et al.*, 2003). Los resultados genéticos de secuencias nucleares y de marcadores SNPs indicaron que *Brahea* de la Isla Guadalupe está genéticamente aislada de su especie hermana peninsular, sin flujo genético, lo cual es consistente con un efecto fuerte de las barreras de dispersión como son los canales marinos (Karhu *et al.*, 2005).

Históricamente, la península de Baja California ha sufrido una serie de sumersiones y elevaciones (Lindell *et al.*, 2006, Riddle *et al.*, 2000). Durante estos sumersiones parciales, la península se fragmentó en una o más islas y el Océano Pacífico se conectó con el Golfo de California. Más específicamente, la inundación del istmo de La Paz aisló la Región de Cabo (SLL) del resto de la península, mientras que una vía marítima peninsular media aisló temporalmente las partes meridional y septentrional de Baja California (Lindell *et al.*, 2006; Riddle *et al.*,

2000). No obstante, todavía se discuten las ubicaciones exactas de las vías marítimas propuestas, así como el momento de su formación (Dolby *et al.*, 2015). Independientemente de las estimaciones precisas de tiempo y localización, se cree que estas interrupciones son responsables de los patrones observados de estructuración genética en una variedad de taxones (Garrick *et al.*, 2009; Lindell *et al.*, 2005; Lira-Noriega *et al.*, 2015, Riddle *et al.*, 2000; Upton y Murphy, 1997), aunque también se han propuesto explicaciones alternativas (Gutiérrez-Flores *et al.*, 2016). Los datos de secuencias nucleares y de cloroplasto utilizados en el presente trabajo de *Washingtonia* no proporcionaron soporte para ninguna de estas vías marítimas, y resultados de agrupamiento indicaron la presencia de una sola población genéticamente homogénea a lo largo de la península, con excepción de palmas de *W. filifera* en SJ. Aunque no se realizó un test específico para probar existencia de estas dos vías marítimas, la estructura poblacional determinada utilizando marcadores SNPs fue más consistente con la presencia de dos ecotipos adaptados a temperaturas diferentes, que con eventos históricos vicariantes.

Por el contrario, para *Brahea*, los datos de los cloroplastos respaldaron la presencia de dos clados genéticamente diferenciados a lo largo de la península, dando apoyo a la intrusión marina histórica en las tierras bajas del Istmo de La Paz. Sin embargo, los datos genómicos, así como secuencias nucleares no presentaron soporte a la presencia de ninguna de las vías marítimas propuestas.

9. CONCLUSIONES

Los estudios comparativos pueden arrojar luz sobre las propiedades específicas de las especies que pueden influir en la dispersión y la divergencia ecológica, mientras que marcadores moleculares y en particular SNPs ofrecen una perspectiva sin precedentes sobre los patrones de diferenciación de todo el genoma. Al combinar estos enfoques en palmas icónicas de América del Norte, fue posible descubrir patrones de estructura poblacional marcadamente diferentes en *Washingtonia* y *Brahea*, revelar asociaciones entre distancia genética y variables climáticas, identificar subconjuntos de *loci* que parecen estar bajo una selección divergente mediada ecológicamente, e identificar eventos de migración a larga distancia consistentes con la dispersión mediada por humanos. Ninguno de estos patrones podría detectarse utilizando datos morfológicos o marcadores moleculares clásicos, lo que indica la promesa de enfoques como el GBS para diseccionar las contribuciones de diferentes procesos hacia patrones de divergencia genómicos.

10. LITERATURA CITADA

- Aleixandre, P., J. Hernandez-Montoya, B. Mila. 2013. Speciation on oceanic islands: Rapid adaptive divergence vs. cryptic speciation in a Guadalupe Island songbird (Aves: Junco). PLoS One.8(5):e63242.
- Allendorf, F.W., P.A. Hohenlohe, G. Luikart. 2010. Genomics and the future of conservation genetics. Nat. Rev. Genet.11:697–709.
- Álvarez, I., J.F. Wendel. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. Mol Phylogenet. Evol. 29:417–434.
- Andrews, K.R., J.M. Good, M.R. Miller, G. Luikart, P.A. Hohenlohe. 2016. Harnessing the power of RADseq for ecological and evolutionary genomics. Nat. Review. Genet. 17:81–92.
- Aschmann, H. 1957. The introduction of the date palm to Baja California. Econ. Bot. 11:174-177.
- Axelrod, D.I. 1979. Age and origin of Sonoran desert vegetation. Occas. Pap. Calif. Acad. Sci. 132:74-79.
- Bacon, C.D., F.A. Feltus, A.H. Paterson, C.D. Bailey. 2008. Novel nuclear intron-spanning primers for Arecaceae evolutionary biology. Mol. Ecol. Resour. 8:211–214.
- Bacon, C.D., W.J. Baker, M.P. Simmons.2011. Miocene dispersal drives island radiations in the palm tribe Trachycarpeae (Arecaceae). Syst. Biol. 61:426–442.
- Bailey, L.H. 1936. *Washingtonia*. Gentes Herb. 4: 51-82.
- Bailey, L.H. 1937. *Erythea* — the hesper *palms*. Gentes Herbar. 4:85-118.
- Baker, W.J., T.L.P. Couvreur. 2013. Global biogeography and diversification of palms sheds light on the evolution of tropical lineages. Historical biogeography. J. Biogeogr. 40:274–285.
- Batiza, R. 1977. Petrology and chemistry of Guadalupe Island: An alkali seamount on a fossil ridge crest. Geology. 5:760–764.
- Beheregaray, L.B., G. Cooke, N.L. Chao, E.L. Landguth. 2015. Ecological speciation in the tropics: insights from comparative genetic studies in Amazonia. Front. Genet. 5:1-19.

- Benestan, L., B.K. Quinn, H. Maaroufi. 2016. Seascape genomics provides evidence for thermal adaptation and current-mediated population structure in American lobster (*Homarus americanus*). *Mol. Ecol.* 25:5073-5092.
- Benjamini, Y., Y. Hochberg. 1995. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Series B.* 57:289–300.
- Bernardi, G., G. Ruiz-Campos, F. Camarena-Rosales. 2007. Genetic isolation and evolutionary history of oases populations of the Baja California killifish, *Fundulus lima*. *Conserv. Genet.* 8:547-554.
- Botsford, L.W., J.W. White, M.A. Coffroth. 2009. Connectivity and resilience of coral reef metapopulations in marine protected areas: matching empirical efforts to predictive needs. *Coral Reefs.* 28:327–337.
- Bouckaert, R. 2010. DensiTree: making sense of sets of phylogenetic trees. *Bioinformatics.* 26:1372-1373.
- Bouckaert, R., J. Heled, D. Kuhnert, T.G. Vaughan, C.H. Wu, D. Xie. 2014. BEAST2: A software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS Comp Biol.* 10: e1003537.
- Bradbury, P.J., Z. Zhang, D.E. Kroon, T.M. Casstevens, Y. Ramdoss, E.S. Buckler. 2007. TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics.* 23:2633–2635.
- Bryant, D., V. Moulton. 2004. Neighbor-Net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Mol. Biol. Evol.* 21:255–265.
- Bryant, D., R. Bouckaert, J. Felsenstein, N.A. Rosenberg, A. RoyChoudhury. 2012. Inferring species trees directly from biallelic genetic markers: bypassing gene trees in a full coalescent analysis. *Mol. Biol. Evol.* 29:1917–1932.
- Bullock, S.H., D. Heath. 2006. Growth rates and age of native palms in the Baja California desert. *J. Arid Environ.* 67:391–402.
- Cavender-Bares, J., A. Gonzalez-Rodriguez, D.A. Eaton, A.A.L. Hipp, A. Beulke, P.S. Manos. 2015. Phylogeny and biogeography of the American live oaks (*Quercus subsection Virentes*): A genomic and population genetics approach. *Mol. Ecol.* 24:3668–3687.
- CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:12794–12797.

- Chen, S., H. Yao, J. Han, C. Liu, J. Song. 2010. Validation of the ITS2 Region as a Novel DNA Barcode for Identifying Medicinal Plant Species. *PLoS ONE* 5: e8613.
- China Plant BOL Group. 2011. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 108:19641–19646.
- Clark-Tapia, R., F. Molina-Freaner. 2003. The genetic structure of a columnar cactus with a disjunct distribution: *Stenocereus gummosus* in the Sonoran desert. *Heredity*. 90:443–450.
- Corander, J., P. Marttinen, J. Siren, J. Tang. 2008. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinformatics*. 9:539.
- Corander, J., J. Siren, E. Arjas. 2008. Bayesian spatial modelling of genetic population structure. *Comput. Stat.* 23:111–129.
- Corander, J., P. Waldmann, M.J Sillanpaa. 2003. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics*. 163:367–374.
- Cornett, J.W. 1985. Reading the fan palms. *J. Nat. Hist.* 94:64–73.
- Cornett, J.W. 1987a. Three palm species at Cataviña. *Principes*. 31:12–13.
- Cornett, J.W. 1987b. Status of desert fan palm populations in the Sonoran and Mojave deserts. En: *Symposium on the scientific value of the desert*, Educational Bulletin. Spring Valley, Desert Protective Council 10. pp. 87-90.
- Cornett, J.W. 2008. The desert fan palm oasis. En: Stevens, L., V.J. Meretsky (eds.). *Aridland springs in North America: Ecology and conservation*. Tucson: The University of Arizona Press and the Arizona Sonora Desert Museum. pp 158–184.
- Cornett, J.W., T. Glen, J.M. Stewart. 1986. The largest desert fan palm oases. *Principes*. 30: 82–84.
- Couvreur, T.L.P., F. Forest, W.J. Baker. 2011. Origin and global diversification patterns of tropical rain forests: Inferences from a complete genus-level phylogeny of palms. *BMC Biology*. 9:44.
- Crisp, M., Y. Isagi, Y. Kato. 2010. *Livistona* palms in Australia: Ancient relics or opportunistic immigrants? *Mol. Phylogenet. Evol.* 54:512-523.

- Danecek, P., A. Auton, G. Abecasis. 2011. The Variant Call Format and VCFtools. *Bioinformatics*. 27:2156–2158.
- Davey, J.W., P.A. Hohenlohe, P.D. Etter, J.Q. Boone, J.M. Catchen, M.L. Blaxter M.L. 2011a. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nat. Rev. Genet.* 12: 499-510.
- Davey, J.W., M.L Blaxter 2011b. RADSeq: next-generation population genetics. *Brief. Funct. Genomic.* 10:108-108.
- Dolby, G.A., S.E. Bennett, A. Lira-Noriega, B.T. Wilder, A. Munguia-Vega. 2015. Assessing the geological and climatic forcing of biodiversity and evolution surrounding the Gulf of California. *J. Southwest.* 57:391–455.
- Dransfield, J., N.W. Uhl, C.B. Asmussen, W.J. Baker, M. Harley, C. Lewis. 2008. *Genera palmarum: The evolution and classification of palms.* Royal Botanic Gardens, Kew, UK. 744 pp.
- Eiserhardt, W.L., J.C. Svenning, W.D. Kissling, H. Balslev. 2011. Geographical ecology of the palms (Arecaceae): Determinants of diversity and distributions across spatial scales. *Ann. Bot.* 108:1391–1416.
- Elith, J., S.J. Phillips, T. Hastie, M. Dudík, Y.E. Chee, C.J. Yates. 2011. A statistical explanation of maxent for ecologists. *Divers. Distributions.* 17:43–57.
- Ersts, P.J. 2016. Geographic Distance Matrix Generator. American Museum of Natural History. Center for Biodiversity and Conservation. Available at: http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg (Acceso Julio 2016).
- Excoffier, L., H.E.L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.* 10:564–567.
- Excoffier, L., P.E. Smouse, J.M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among mtDNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics.* 131: 479–491.
- Fadini, R.F., M. Fleury, C.I. Donatti, M. Galetti. 2009. Effects of frugivore impoverishment and seed predators on the recruitment of a keystone palm. *Acta Oecol.* 35:188–196.
- Fazekas, A.J., M. Kuzmina, S.G. Newmaster, P.M. Hollingsworth. 2012. DNA barcoding methods for land plants. *Methods Mol. Biol.* 858: 223-252.
- Fehlberg, S.D., T.A. Ranker. 2009. Evolutionary history and phylogeography of *Encelia farinosa* (Asteraceae) from the Sonoran, Mojave, and Peninsular

- Deserts. *Mol. Phylogenet. Evol.* 50:326-35.
- Felger, R.S., M.B. Moser. 1985. *People of the desert and sea: Ethnobotany of the Seri Indians*. 2-nd printing edition. Tucson, University of Arizona. 454p.
- Felger, R.S., E. Joyal. 1999. The palms (Arecaceae) of Sonora, Mexico. *Aliso*. 18:1–18.
- Felger, R.S., M.B. Johnson, Y.M.F. Wilson. 2001. *The trees of Sonora, Mexico*. New York: Oxford University Press. 400p.
- Feliner, G. 2011. Southern European glacial refugia: a tale of tales. *Taxon*. 60: 365–372.
- Franco-Vizcaino, E., A.C. Lopez-Beltran, M. Salazar-Cesena. 2007. Water relations and community composition in three blue fan palm oases across the Californian-Sonoran biome transition. *Southwest. Nat.* 52:191–200.
- Frankham, R. 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conserv. Biol.* 10:1500–1508.
- Frankham, R., J.D. Ballou, D.A. Briscoe. 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press. 644p.
- Frichot, E., S.D. Schoville, G. Bouchard, O. François. 2013. Testing for associations between *loci* and environmental gradients using latent factor mixed models. *Mol. Biol. Evol.* 30:1687–1699.
- Frichot, E., F. Mathieu, T. Trouillon, G. Bouchard, O. François. 2014. Fast and efficient estimation of individual ancestry coefficients. *Genetics*. 196:973–983.
- Frichot, E., O. François. 2015. LEA: An R package for landscape and ecological association studies. *Methods Ecol. Evol.* 6:925–929.
- Funk, W.C., R.E. Lovich, P.A. Hohenlohe. 2016. Adaptive divergence despite strong genetic drift: Genomic analysis of the evolutionary mechanisms causing genetic differentiation in the island fox (*Urocyon littoralis*). *Mol. Ecol.* 25:2176–2194
- Garcillán, P.P., E. Vega, C. Martorell. 2012. The *Brahea edulis* palm forest in Guadalupe Island: A North American fog oasis? *Rev. Chil. Hist. Nat.* 85:137–145.
- Garrick, R.C., J.D. Nason, C.A Meadows, R.J. Dyer. 2009. Not just vicariance: Phylogeography of a Sonoran Desert euphorb indicates a major role of range

- expansion along the Baja Peninsula. *Mol. Ecol.* 18:1916–1931.
- Glaubitz, J.C., T.M. Casstevens, F. Lu. 2014. TASSEL-GBS: A high capacity genotyping by sequencing analysis pipeline. *PLoS ONE*. 9:e90346.
- González-Rubio, C., F.J. García-De León, R. Rodríguez-Estrella. 2016. Phylogeography of endemic Xantus' hummingbird (*Hylocharis xantusii*) shows a different history of vicariance in the Baja California Peninsula. *Mol. Phylogenet. Evol.* 102:265-277.
- Govaerts, R., J. Dransfield. 2005. World checklist of palms. Royal Botanic Gardens, Kew, Richmond, UK. 235p.
- Grismer, L.L., J.A. McGuire. 1993. The oases of Central Baja California, Mexico. Part I. A preliminary account of the relict mesophytic herpetofauna and the status of the oases. *Bull. South. Calif. Acad. Sci.* 92:2–24.
- Grismer, L.L. 1994. The origin and evolution of the peninsular herpetofauna of Baja California, México. *Herpetol. Nat. Hist.* 2:51–106.
- Grismer, L.L. 2000. Evolutionary biogeography on Mexico's Baja California peninsula: A synthesis of molecules and historical geology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97: 14017–14018.
- Grismer, L.L. 2002. A re-evaluation of the evidence for a Mid-Pleistocene seaway in Baja California: A reply to Riddle et al. *Herpetological Review.* 33:15-16.
- Gutiérrez-Flores, C., F.J. García-De León, J.L. León de la Luz, J.H. Cota-Sánchez. 2016. Microsatellite genetic diversity and mating systems in the columnar cactus *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *Perspect. Plant. Ecol.* 22:1–10.
- Hafner, D.J., B.R. Riddle. 1997. Biogeography of Baja California peninsular desert mammals. En: Yates T.L., W.L. Gannon D.E. Wilson (eds.). *Life among the muses: Papers in honor of James S. Findley*. Albuquerque: The Museum of Southwestern Biology, University of New Mexico. pp 39–68.
- Hafner, D.J., B.R. Riddle. 2011. Boundaries and barriers of North American warm deserts: an evolutionary perspective. En: *Paleogeography and paleobiogeography: biodiversity in space and time* (eds.). Upchurch, P., A. McGowan, C. Slater). Systematics Association Special Volume Series. CRC Press Boca Raton, Florida. pp. 75–113.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic. Acids. Symp. Ser.* 41:95–98.

- Hamilton, M. B., J.R. Miller. 2002. Relative rates of pollen and seed gene flow in the island model using nuclear and organelle measures. *Genetics*.162:1897–1909.
- Hampe, A., A.S. Jump. 2011. Climate relicts: past, present, future. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 42:313–333.
- Hamrick, J.L., J.D. Nason. 2000. Gene flow in forest trees. En: Boyle T.J., A. Young, D. Boshier (eds.). *Forest conservation genetics: Principles and practice*. Collingwood, VIC, Australia: CIFOR and CSIRO. pp 81–90.
- Harley, M.M. 2006. A summary of fossil records for *Arecaceae*. *Bot. J. Linn. Soc.* 151:39–67.
- Henderson, A., G. Galeano, R. Bernal. 1995. *Field guide to the palms of the Americas*. Princeton, NJ: Princeton University Press. 498p.
- Hewitt, G.M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol. J. Linn. Soc.* 58: 247–276.
- Hewitt, G.M. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*. 405:907–913.
- Hewitt, G.M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 359:183–195.
- Hijmans, R.J., S.E. Cameron, J.L. Parra, P.G. Jones, A. Jarvis. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int. J. Climatol.* 25:1965–1978.
- Hodel, D.R. 2014. *Washingtonia filibusta* (*Arecaceae*: *Coryphoideae*), a new hybrid from cultivation. *Phytoneuron*.68:1–7.
- Hollingsworth, P.M., S.W. Graham, D.P. Little. 2011. Choosing and using a plant DNA barcode. *PLoS ONE*. 6:e19254.
- Hubisz, M.J., D. Falush, M. Stephens, J.K. Pritchard. 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Mol Ecol Resour.* 9:1322–1332.
- Huson, D.H., D. Bryant. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* 23:254–267.
- Jeanson, M.L., J.N. Labat, D.P. Little. 2011. DNA barcoding: A new tool for palm taxonomists? *Ann. Bot.* 108:1445–1451.

- Jensen, J.L., A.J. Bohona, S.T. Kelley. 2005. Isolation by distance, web service. *BMC Genetics*, 6:13.
- Joost, S., A. Bonin, M.W. Bruford. 2007. A spatial analysis method (SAM) to detect candidate *loci* for selection: towards a landscape genomics approach to adaptation. *Mol. Ecol.* 16:3955–3969.
- Karhu, A., C. Vogl, G.F. Moran, J.C. Bell, O. Savolainen. 2005. Analysis of microsatellite variation in *Pinus radiata* reveals effects of genetic drift but no recent bottlenecks. *J. Evol. Biol.* 19:167–175.
- Keller, I., C.E. Wagner, L. Greuter. 2013. Population genomic signatures of divergent adaptation, gene flow and hybrid speciation in the rapid radiation of Lake Victoria cichlid fishes. *Mol. Ecol.* 22:2848–2863.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:111–120.
- Kissling, W.D., W.J. Baker, H. Balslev, A.S. Barfod, F. Borchsenius, J. Dransfield, J.C. Svenning. 2012a. Quaternary and pre-Quaternary historical legacies in the global distribution of a major tropical plant lineage. *Global. Ecol. Biogeogr.* 21:909–921.
- Kissling, W.D., W.L. Eiserhardt, W.J. Baker, F. Borchsenius, T.L.P. Couvreur, H. Balslev, J.C. Svenning. 2012b. Cenozoic imprints on the phylogenetic structure of palm species assemblages worldwide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 109: 7379–7384.
- Kondo, T., M.D. Crisp, C. Linde, D.M.J. Bowman, K. Kawamura, S. Kaneko, Y. Isagi. 2012. Not an ancient relic: The endemic *Livistona* palms of arid central Australia could have been introduced by humans. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 279:2652–2661.
- Kress, W.J., K.J. Wurdack, E.A. Zimmer, L.A. Weigt, D.H. Janzen. 2005. Use of DNA barcodes to identify flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102:8369–8374.
- Leache, A.D., S.C. Crews, M.J. Hickerson. 2007. Two waves of diversification in mammals and reptiles of Baja California revealed by hierarchical Bayesian analysis. *Biol. Lett.* 3:646–650.
- León De La Luz, J.L., J.P. Rebman, T. Oberbauer. 2003. On the urgency of conservation on Guadalupe Island, Mexico: Is it a lost paradise? *Biodivers.*

- Conserv. 12:1073–1082.
- Li, H., R. Durbin. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 25:1754–1760.
- Li, J., L. Haipeng, M. Jakobsson, P. Sjodin, M. Lascoux. 2102. Joint analysis of demography and selection in population genetics: where do we stand and where could we go? *Mol. Ecol.* 21:28–44.
- Librado, P., J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25:1451–1452.
- Lindell, J.F., R. Méndez de la Cruz, R.W. Murphy. 2005. Deep genealogical history without population differentiation: Discordance between mtDNA and allozyme divergence in the zebra-tailed lizard (*Callisaurus draconoides*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 36:682–694.
- Lindell, J., A. Ngo, R.W. Murphy. 2006. Deep genealogies and the mid peninsular seaway of Baja California. *J. Biogeogr.* 33:1327–1331.
- Lira-Noriega, A., O. Toro-Núñez, J.R. Oaks, M.E. Mort. 2015. The roles of history and ecology in chloroplast phylogeographic patterns of the bird-dispersed plant parasite *Phoradendron californicum* (Viscaceae) in the Sonoran Desert. *Am. J. Bot.* 102:149–164.
- Loveless, M.D., J.L. Hamrick. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 15:65–95.
- Luikart, G., P.R. England, D. Tallmon, S. Jordan, P. Taberlet. 2003. The power and promise of population genomics: From genotyping to genome typing. *Nat. Rev. Genet.* 4:981–994.
- Luna, L. 2011. Eradication of feral goats on Guadalupe Island: absence confirmation. *New. Zeal. J. Ecol.* 35: 192-192.
- Matala, A.P., M.W. Ackerman, M.R. Campbell, S.R. Narum. 2014. Relative contributions of neutral and non-neutral genetic differentiation to inform conservation of steelhead trout across highly variable landscapes. *Evol. Appl.* 7:682–701.
- McCauley, R.A., A.C. Cortés-Palomec, K. Oyama. 2010. Distribution, genetic structure, and conservation status of the rare microendemic species, *Guaiaicum unijugum* (Zygophyllaceae) in the Cape Region of Baja California, Mexico. *Rev. Mex. Biodivers.* 81:745–758.

- McClenaghan, L., A. Beauchamp. 1986. Low genic differentiation among isolated populations of the California fan palm (*Washingtonia filifera*). *Evolution*. 40:315–322.
- Meirmans, P.G., P.H. Van Tienderen. 2004. GENOTYPE and GENODIVE two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. *Mol. Ecol. Resour* 4: 792–794.
- Milano, I., M. Babbucci, A. Cariani, M. Atanassova, D. Bekkevold, G.R. Carvalho, L. Bargelloni. 2014. Outlier SNP markers reveal fine-scale genetic structuring across European hake populations (*Merluccius merluccius*). *Mol. Ecol.* 23:118–35.
- Minnich, R.A., E. Franco-Vizcaino, J.M. Salazar-Ceseña. 2011. Distribution and regional ecology of Californian palm oases interpreted from Google earth images. *Aliso*. 29:1–12.
- Moran, R. 1951. Notes On The Flora Of Guadalupe Island, Mexico. *Madroño*. 11:153-160.
- Moran, R. 1956. Discussion of the flora of Guadalupe Island. Available at: <http://repository.library.csuci.edu/bitstream/handle/10139/886/Moran1965Discussion~.pdf?sequence=1> (Acceso Julio 2016).
- Moran, R. 1996. The flora of Guadalupe Island, Mexico. *Mem. Calif. Acad. Sci.*19:1–190.
- Munguia-Vega, A. 2011. Habitat fragmentation in small vertebrates from the Sonoran Desert in Baja California. Tesis de doctorado. University of Arizona, Tucson. 331 p.
- Nadeau, N.J., C.D. Jiggins. 2010. A golden age for evolutionary genetics? Genomics studies of adaptation in natural populations. *Trends Genet.* 26:484–492.
- Naeem, A.A., H.M.N. Khan, I.A. Cheema, A. Buerkert. 2014. DNA barcoding for species identification in the Palmae family. *Genet. Mol. Res.* 13: 10341-10348.
- Narum, S.R., C.A. Buerkle, J.W. Davey, M.R. Miller, P. Hohenlohe. 2013. Genotyping-by-sequencing in ecological and conservation genomics. *Mol. Ecol.* 22:2841–2847.
- Nason, J.D., J.L. Hamrick, T.T. Fleming. 2002. Historical vicariance and postglacial

colonization effects on the evolution of genetic structure in *Lophocereus*, a Sonoran Desert columnar cactus. *Evolution*. 56:2214–2226.

Oberbauer, T. 2005. A comparison of estimated historic and current vegetation community structure on Guadalupe Island, Mexico. En. Garcelon D.K., C. A. Schwemm (eds.). *Proceedings of the sixth California Islands Symposium*. Arcata, CA: National Park Service Technical Publication CHIS-05-01, Institute for Wildlife Studies. pp. 143–153.

Oksanen, J., F.G. Blanchet, R. Kindt. 2016. *vegan: community ecology package*. <http://CRAN.R-project.org/package=vegan> (Acceso Mayo 2016).

Otto-Bliesner, B.L., S.J. Marshall, J.T. Overpeck, G.H. Miller, A. Hu, CAPE Last Interglacial Project members. 2006. Simulating Arctic climate warmth and ice field retreat in the last inter-glaciation. *Science*. 311:1751–1753.

Paetkau, D., W. Calvert, I. Stirling, C. Strobeck. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Mol. Ecol.* 4:47–354.

Paetkau, D., R. Slade, M. Burden, A. Estoup. 2004. Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Mol. Ecol.* 13:55–65.

Palumbi, S.R. 2003. Population genetics, demographic connectivity, and the design of marine reserves. *Ecol. Appl.* 13:146–158.

Palumbi, S.R. 2004. Marine reserves and ocean neighborhoods: the spatial scale of marine populations and their management. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 29:31–68.

Paradis, E., J. Claude, K. Strimmer. 2004. APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*. 20:289–290.

Parks, D.H., M. Porter, S. Churcher, S. Wang, C. Blouin, J. Whalley, R. Beiko. 2009. Gengis: Ageospatial information system for genomic data. *Genome Res.* 19:1896–1904.

Patterson, N., P. Moorjani, Y. Luo. 2012. Ancient admixture in human history. *Genetics*. 192:1065–1093.

Pembleton, L.W., N.O.I. Cogan, J.W. Forster. 2013. StAMPP: an R package for calculation of genetic differentiation and structure of mixed-ploidy level populations. *Mol. Ecol. Resour.* 13:946–952.

Pepper, M., S.Y.W. Ho, M.K. Fujita, J.S. Keogh. 2011. The genetic legacy of

- aridification: climate cycling fostered lizard diversification in Australian montane refugia and left low-lying deserts genetically depauperate. *Mol Phylogenet Evol.* 61: 750–759.
- Peters, H.A., A. Pauw, M.R. Silman, J.W. Terborgh. 2004. Falling palm fronds structure Amazonian rainforest sapling communities. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 271:367–369.
- Peterson, A.T., Y. Nakazawa. 2008. Environmental data sets matter in ecological niche modelling: An example with *Solenopsis invicta* and *Solenopsis richteri*. *Global. Ecol. Biogeogr.* 17:135–144.
- Petit, R.J., J. Duminil, S. Fineschi, A Hampe, D. Salvini, G.G. Vendramin. 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Mol. Ecol.* 14:689–701.
- Phillips, S.J. 2017. A brief tutorial on Maxent. Retrieved from http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/maxent/ (Fecha de acceso 25 Marzo 2017)
- Phillips, S.J., R.P. Anderson, R.E. Schapire. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Eco. Mod.* 190:231–259.
- Pickrell, J.K., J.K. Pritchard. 2012. Inference of population splits and mixtures from genome-wide allele frequency data. *PLoS Genetics.* 8: e1002967.
- Pillon, Y., J.B. Johansen, T. Sakishima, E.H. Roalso, D.K. Price, E.A. Stacy. 2013. Gene discordance in phylogenomics or recent plant radiations, an example from Hawaiian *Cyrtandra* (Gesneriaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 69:293–298.
- Popescu, A.A., A.L. Harper, M. Trick, I. Bancroft, K.T. Huber. 2014. A novel and fast approach for population structure inference using kernel-PCA and optimization (PSIKO) *Genetics.* 114:171314.
- R Development Core Team. 2008. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>.
- Rambaut, A., M.A. Suchard, D. Xie, A.J. Drummond. 2014. Tracer 1.6, Available from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/> (Acceso Julio 2017).
- Pritchard, J.K., M. Stephens, P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 155: 945–959.
- Reitzel, A.M., S. Herrera, M.J. Layden, M.Q. Martindale, T.M. Shank. 2013. Going

- where traditional markers have not gone before: utility of and promise for RAD sequencing in marine invertebrate phylogeography and population genomics. *Mol. Ecol.* 22:2953–2970.
- Riddle, B.R., D.J. Hafner, L.F. Alexander, J.R. Jaeger. 2000. Cryptic vicariance in the historical assembly of a Baja California peninsular desert biota. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 97:14438–14443.
- Rivera, D., D. Johnson, J. Delgadillo. 2013. Historical evidence of the Spanish introduction of date palm (*Phoenix dactylifera* L., Arecaceae) into the Americas. *Genet. Resour. Crop Evol.* 60:1433–1452.
- Roncal, J., A. Henderson, F. Borchsenius, S.R.S. Cardoso, H. Balslev. 2012. Can phylogenetic signal, character displacement, or random phenotypic drift explain the morphological variation in the genus *Geonoma* (Arecaceae)? *Biol. J. Linn. Soc.* 106:528–539.
- Rosas-Escobar, P., D.S. Gernandt, S. Pinero, P.P. Garcillan. 2011. Plastid DNA diversity is higher in the island endemic Guadalupe Cypress than in the continental Tecate Cypress. *PLoS One.* 6(1):e16133.
- Schoener, T.W. 1968. Anolis lizards of Bimini: Resource partitioning in a complex fauna. *Ecology.* 49:704–726.
- Shaw, J., E.B. Lickey, J.T. Beck, S.B. Farmer, W. Liu, J. Miller, R.L. Small. 2005. The tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *Am. J. Bot.* 92:142–166.
- Stapley, J., J. Reger, P.G.D. Feulner. 2010. Adaptation genomics: the next generation. *Trend. Ecol. Evol.* 25:705–712.
- Stewart, J. R., A.M. Lister, I. Barnes, L. Dalen. 2010. Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time. *Proc Biol Sci.* 277: 661–671.
- Stucki, S., P. Orozco-terWengel, B.R. Forester. 2016. High performance computation of landscape genomic models including local indices of spatial association. *Mol. Ecol. Resour.* 17: 1072–1089.
- Stuessy, T.F., K. Takayama, P. Lopez-Sepulveda, D.J. Crawford. 2014. Interpretations of patterns of genetic variation within endemic plant species of oceanic islands. *Bot. J. Linn. Soc.* 174:276–288.
- Swets, J.A. 1988. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science.* 240:1285–1293.

- Taberlet, P., L. Gielly, G. Pautou, J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*. 17:1105–1109.
- Tomlinson, P.B. 2006. The uniqueness of palms. *Bot. J. Linn. Soc.* 151:5–14.
- Upton, D.E., R.W. Murphy. 1997. Phylogeny of the side-blotched Lizards (Phrynosomatidae: Uta) based on mtDNA sequences: Support for midpeninsular seaway in Baja California. *Mol. Phylogenet. Evol.* 8:104–113.
- Valentini, A., F. Pompanon, P. Taberlet. 2009. DNA barcoding for ecologists. *Trends Ecol Evol.* 24:110-117.
- Villemereuil, P., O.E. Gaggiotti. 2015. A new FST-based method to uncover local adaptation using environmental variables. *Methods Ecol. Evol.* 6:1248–1258.
- Warren, D.L., R.E. Glor, M. Turelli. 2008. Environmental niche equivalency versus conservatism: Quantitative approaches to niche evolution. *Evolution*. 62:2868–2883.
- Warren, D.L., R.E. Glor, M. Turelli. 2010. ENMTools: A toolbox for comparative studies of environmental niche models. *Ecography*, 33:607–611.
- Watanabe, S., T. Hajima, K. Sudo, T. Nagashima, T. Takemura, H. Okajima, M. Kawamiya. 2011. MIROC-ESM: Model description and basic results of CMIP5-20c3m experiments. *Geosci. Model Dev.* 4:1063–1128.
- Watson, S. 1876. The Flora of Guadalupe Island, Lower California. *Amer. Naturalist*. 10: 221-228
- Wehncke, E.V., X. López-Medellín. 2015. Living at the edge: Blue fan palm desert oases of northern Baja California. En Ezcurra, E., R. Lara, S. Álvarez-Borrego, E.V. Wehncke (eds.). *Conservation science of Mexico's Northwest*. México, D.F.: UCMexus, SEMARNAT y INECC-Semarnat. pp 311–330.
- Wehncke, E.V., X. López-Medellín, E. Ezcurra. 2009. Patterns of Frugivory, Seed Dispersal and Predation of Blue Fan Palms (*Brahea armata*) in Oases of Northern Baja California. *J. Arid Environ.* 73:773–783.
- Wehncke, E.V., X. López-Medellín, E. Ezcurra. 2010. Blue fan palm distribution and seed removal patterns in three desert oases of northern Baja California, Mexico. *Plant Ecol.*, 208:1–20.
- Weir, B.S., C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of

population structure. *Evolution*.38:1358–1370.

Wiggins, I.L. 1980. *Flora of Baja California*. Stanford, CA:Stanford University Press. 1025p.

Wilson, M.A., B. Gaut, M.T. Clegg. 1990. Chloroplast DNA evolves slowly in the palm family (Arecaceae). *Mol. Biol. Evol.*7:303–314.

Woolbright, S.A., T.G. Whitham, C.A. Gehring, G.J. Allan, J.K. Beiley. 2014. Climate relicts and their associated communities as natural ecology and evolution laboratories. *Trends Ecol. Evol.*29:406–416.

Yang, H.Q., Y.R. Dong, Z.J. Gu, N. Liang, J.B. Yang. 2012. A Preliminary Assessment of *matK*, *rbcL* and *trnH/psbA* as DNA Barcodes for *Calamus* (Arecaceae) Species in China with a Note on ITS. *Ann. Bot. Fennici*. 49:319-330.

Zomer, R.J., A. Trabucco, D.A. Bossio, L.V. Verchot. 2008. Climate Change Mitigation: A Spatial Analysis of Global Land Suitability for Clean Development Mechanism Afforestation and Reforestation. *Agric. Ecosyst. Environ.* 126:67-80.