



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Ecología

Hibridación natural entre *Brahea dulcis*
y *B. nitida* (Arecaceae) en México

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. J. Rolando Ramírez Rodríguez

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS

Dr. Efraín Tovar Sánchez

Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación-UAEM

COMITÉ TUTOR

Dra. Ana Elena Mendoza Ochoa: Instituto de Ecología-UNAM.

Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa: Centro de Investigación en
Ecosistemas-Campus Morelia-UNAM

MÉXICO, D.F.

Octubre de 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Ecología

Hibridación natural entre *Brahea dulcis*
y *B. nitida* (Arecaceae) en México

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. J. Rolando Ramírez Rodríguez

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS

Dr. Efraín Tovar Sánchez

Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación-UAEM

COMITÉ TUTOR

Dra. Ana Elena Mendoza Ochoa: Instituto de Ecología-UNAM.

Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa: Centro de Investigación en
Ecosistemas-Campus Morelia-UNAM

MÉXICO, D.F.

Octubre de 2012

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de junio de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de DOCTOR EN CIENCIAS del alumno RAMÍREZ RODRÍGUEZ J. ROLANDO con número de cuenta 94801015 con la tesis titulada: "Hibridación natural entre *Brehea dulcis* y *B nitida* (Arecaceae) en Mexico", realizada bajo la dirección del DR. EFRAÍN TOVAR SANCHEZ:

Presidente:	DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU
Vocal:	DR. ALFONSO OCTAVIO DELGADO SALINAS
Secretario:	DRA. ANA ELENA MENDOZA OCHOA
Suplente:	DRA. SUSANA VALENCIA ÁVALOS
Suplente	DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 09 de agosto de 2012.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c.c.p. Expediente del interesado.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme permitido ser parte de la máxima casa de estudios de la Nación.

Al Posgrado en Ciencias Biológicas por todo el apoyo que como alumno de doctorado me otorgó durante mi tiempo como estudiante del mismo.

Al Instituto Ecología por el ambiente académico que siempre fue motivacional y por el apoyo otorgado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) la beca otorgada (215976/207096) y por el apoyo (61725) a E.T.S. para la investigación.

Al Programa de Mejoramiento del Profesorado de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (PROMEP-UAEM) por la beca otorgada (103.5/07/1844) y por el apoyo PROMEP/103.5/07/2674. a E.T.S para la investigación.

A los Doctores Efraín Tovar Sánchez, Ana Elena Mendoza Ochoa, Alberto Ken Oyama Nakagawa, por todo su conocimiento compartido, sus comentarios y sugerencias, y por haberme hecho sentir acompañado durante todo este proceso.

Agradecimientos a título personal

Al Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau, Dr. Alfonso Octavio Delgado Salinas, Dra. Ana Elena Mendoza Ochoa, Dra. Susana Valencia Ávalos y Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa, miembros del jurado por todas sus observaciones y comentarios a la presente tesis.

Al Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CIByC-UAEM) por la convicción mostrada de que el crecimiento académico de todo su personal debe ser una meta; gracias compañeros y amigos.

Al Dr. Hermilo Quero por compartir conmigo todo su conocimiento del género *Brahea*

A Mauricio Mora, Alfredo López, Maribel Paniagua, Paulette Arellano, Omar Rolando Ramírez, Leonardo Beltrán, Omar Maya, Noelia Vázquez, Guadalupe Rangel, Gabriel Flores, Verónica Rodríguez, Judith Reyes, Armando Zepeda por todo su apoyo en las colectas de campo y el trabajo de laboratorio.

A Patricia Martínez por todo el gran apoyo administrativo que tuve desde mi solicitud para ingresar al posgrado hasta la obtención del grado.

Dedicatoria

A mi padres Guillermo Ramírez y Ma. de la Paz Rodríguez , por haberme enseñado que el tesón y el sentido común acompañados del respeto, son la mejor llave para alcanzar metas en la vida.

A mis hermanos Guillermo, Cristóbal, Aurora, Heliodoro y Gemma, por que aun cuando son seres humanos exitosos, siguen teniendo la humildad que nos inculcaron nuestros padres.

A mi sobrinos Ana Laura, Christopher, Juan Pablo, Alejandro (Ahijado), Diana (Ahijada), Armando, Lorena, Karina, Brenda, Dante, Carolina, Yoyito y Gemmita.

A mis cuñadas Margarita, Lorena y Kenya con mucho cariño.

A Belinda Maldonado, José Alfredo Rodríguez, Larisa Campos, Amanda Ortiz, Sergio Pérez, Karla Prada, Prisciliano Pérez, y Jaime Mora, quienes me han demostrado durante décadas el sentido y valor de la amistad.

A Efraín porque además de su amistad siempre ha sido un impulsor en mi mejora académica y un responsable directo del alcance de esta meta.

A Paty Mussali por el todo apoyo que me ha brindado durante mi proceso de formación doctoral.

A mis compañeros del CIByC, los 20 y + por evidenciar que el trabajo en equipo puede redituar fruto académicos importante; a Jenny, Nacho, Pepe, Ana Velia y Claudia, mi reconocimiento y agradecimiento.

Muy especialmente a mis hijos Omar Rolando y Sebastian, quienes han sido un motivo fundamental en el constante interés por superarme.

A Pao, mi querida esposa quien a hecho tuyas las metas que me he trazado y cuyo apoyo incondicional ha sido fundamental en el alcance de las mismas, con todo mi amor.

ÍNDICE

Página

Resumen.....	i
Abstract.....	iv
CAPÍTULO I.....	1
Introducción.....	2
Justificación.....	12
Objetivo General.....	12
Objetivos específicos.....	12
CAPÍTULO II.....	14
Hibridación introgresiva entre <i>Brahea dulcis</i> y <i>Brahea nitida</i> (Arecaceae) en México: evidencias morfológicas y moleculares.....	15
CAPÍTULO III.....	41
El manejo de la palma Mexicana <i>Brahea dulcis</i> y su relación con la hibridación su estructura genética y clonal.....	42
CAPÍTULO IV.....	69
Discusión General.....	70
Conclusiones Generales.....	73
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
ANEXOS.....	91

Ramírez-Rodríguez, J.R. 2012. Hibridación natural entre *Brahea dulcis* y *B. nitida* (Arecaceae) en México. Tesis de Doctorado, Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Resumen

Brahea es un género de palmas de México. *B. dulcis* (Kunth) Mart. y *B. nitida* André son dos especies que pueden delimitarse fácilmente cuando se encuentran en alopatria, sin embargo cuando se distribuyen en simpatria se han detectado individuos con morfología atípica, sugiriendo que el fenómeno de hibridación podría explicar la variación observada. Además, poblaciones de *B. dulcis* han sido sometidas a un constante manejo por grupos indígenas mexicanos, lo que ha promovido cambios en su fisonomía (poblaciones con crecimiento amacollado), densidad y tipo de reproducción (sexual vs. asexual). Parte del manejo de *B. dulcis* consiste en realizar incendios controlados que permitan el establecimiento de nuevos individuos. En general, ha sido bien documentado que el fuego favorece un crecimiento clonal y promueve la formación y establecimiento de individuos híbridos, promoviendo cambios en la estructura genética de las poblaciones. Por lo que en este estudio, se determinó si los individuos con morfología atípica entre *B. dulcis* y *B. nitida* son el resultado del flujo genético entre estas especies, utilizando marcadores moleculares y rasgos macro y micro-morfológicos. Además, se evaluó el efecto que tiene el manejo de las poblaciones de *B. dulcis* sobre la estructura clonal, genética e hibridación.

Para cumplir nuestros objetivos se analizaron cuatro zonas mixtas con presencia de ambas especies (30 árboles en cada zona), así como dos sitios alopátridos para cada especie parental (20 árboles por sitio). Los resultados sugieren que las plantas híbridas más cercanas a un sitio alopátrido de una especie parental putativa (*B. nitida*, hábitat mésico, y *B. dulcis*, hábitat principalmente xérico) están directamente relacionadas usando rasgos morfológicos y genéticos: *B. dulcis* difiere significativamente de *B. nitida*

en todos los caracteres evaluados. Los resultados morfológicos y genéticos son congruentes y sugieren que los individuos con morfología atípica son híbridos producidos por el flujo genético entre *B. dulcis* y *B. nitida*. Además, los híbridos son un mosaico tanto de caracteres parentales (46.4%), intermedios (33.2%) y transgresivos (10.0%). Asimismo, en la zona híbrida con mayor grado de disturbio (Xochipala) se evidenció que *B. nitida* ha sido asimilada genéticamente por *B. dulcis*.

Por otro lado, se evaluaron seis sitios con diferente tipo de manejo (dos para cada tratamiento: alta intensidad de corte, baja intensidad de corte, y sin manejo). En general, los valores de diversidad genética, diversidad clonal, hibridación y de densidad mostraron el siguiente patrón: alta intensidad de corte >, baja intensidad de corte >, sin manejo. En contraste, la altura de las plantas mostró un patrón inverso: alta intensidad de corte <, baja intensidad de corte <, sin manejo. Un análisis de autocorrelación a nivel de ramets mostró un patrón de agregación a distancias cortas y una distribución al azar a mayores distancias. Sin embargo a nivel de genet, estos análisis mostraron una distribución aleatoria.

Por todo lo anterior, la hibridación puede modificar el estatus de conservación de algunas especies que pueden ser asimiladas genéticamente. Además, el manejo tradicional es un promotor de altos niveles de diversidad genética, y clonal, así como del establecimiento y desarrollo de organismos híbridos. Esta condición podría tener implicaciones en la dinámica de las poblaciones de *B. dulcis* y *B. nitida*, lo que podría tener repercusiones a nivel de la comunidad si se considera que para el establecimiento de las poblaciones manejadas en ocasiones se recurre a la tala y quema, lo que significa la eliminación de la cubierta vegetal original, promoviendo con ello la erosión del suelo y la modificación de los parámetros edáficos. Estas condiciones conllevan pérdida de la riqueza de especies originales, lo que impacta en la modificación de la composición y

dominancia de especies y consecuentemente se presentan cambios en los procesos ecosistémicos.

Ramírez-Rodríguez, J.R. 2012. Natural hybridization between *Brahea dulcis* and *B. nitida* (Arecaceae) in Mexico. Ph.D. Thesis, Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Abstract

Brahea is a palm genus from Mexico. *B. dulcis* (Kunth) Mart. and *B. nitida* André are two species that can be easily delimited when they occur in allopatry. However, when they occur in sympatry hybrid individuals with atypical morphology have been registered, suggesting that the hybridization phenomenon may be responsible for the observed variation. Also, *B. dulcis* populations have been managed by different Mexican ethnic groups, which has promoted changes in their phenology (populations with tillering growth), density and type of reproduction (sexual vs. asexual). Slash and burn is a common practice for the establishment of new individuals of *B. dulcis*. As a consequence, fire may favor clonal growth and the formation and establishment of hybrid individuals. In this study, we determined using molecular markers as well as micro and macro-morphological characters if individuals with atypical morphology between *B. dulcis* and *B. nitida* are the result of gene flow between these two species. Also, we evaluated the effect of different management regimes of *B. dulcis* on clonal and genetic structure and on hybridization. We analyzed four mixed stands where both species occur (30 trees/zone) and two allopatric stands for each parental species (20 trees/zone). Our results suggest that hybrid individuals that are closer to an allopatric site of a putative parental species (*B. nitida*, mesic habitat, and *B. dulcis*, mostly xeric habitat) are genetically and morphologically more similar to it. *B. dulcis* differed significantly for all the analyzed characters. The results of the morphological and genetic analyses are congruent and suggest that individuals with atypical morphology may be the result of gene flow between *B. dulcis* and *B. nitida*. Also, hybrid individuals are a mosaic of parent-like (46.4%), intermediate (33.2%) and transgressive (10.0%)

characters. Moreover, in the most disturbed zone (Xochipala) we evidenced that *B. nitida* is being genetically assimilated by *B. dulcis*.

In addition, six sites were evaluated with different type of management (two sites per regime: high and low intensity cutting, and unmanaged palms). In general, the values of genetic diversity, clonal diversity, hybridization and density showed the following pattern: high intensity cutting > low intensity cutting > unmanaged palms. In contrast, plant height showed an inverse pattern: high intensity cutting < low intensity cutting < unmanaged Palms. Autocorrelation analyses at the ramet level showed an aggregated distribution at shorter distances and a random spatial distribution at larger distances. Also, at the genet level the autocorrelation analyses showed a random distribution.

Hybridization processes may modify the conservation status of the species that are being genetically assimilated. Also, traditional management of *B. dulcis* promotes high levels of clonal and genetic diversity along with the establishment and growth of new hybrid individuals. This circumstance may have implications on the population dynamics of *B. dulcis* and *B. nitida*, which could impact the community level if one considers that the establishment of managed populations may utilize to the slash and burn, which means the removal of the original vegetation cover, thereby promoting erosion changing soil and soil parameters. These conditions involving loss of original species richness, which impacts the change in composition and species dominance and consequently there are changes in ecosystem processes.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN

Hibridación natural

El fenómeno de hibridación se define como la descendencia producto del entrecruzamiento de individuos de poblaciones diferentes, las cuales pueden distinguirse con base en al menos en un carácter heredable (Harrison 1993). En términos genéticos la hibridación implica la combinación de pozas genéticas previamente asiladas, lo que resulta de manera general, en la conformación de nuevos genotipos y cambios en las frecuencias alélicas. Evolutivamente implica el incremento de la diversidad genética intraespecífica (Anderson 1949); el origen y transferencia de adaptaciones genéticas (Anderson 1949; Stebbins 1950; Arnold 2006; Fritz et al. 2006); el origen de nuevos ecotipos y/o especies (Grant 1981; Fritz et al. 2006) y el reforzamiento o ruptura de barreras reproductivas (Ellstrand y Ellam 1993; Rieseberg y Gerber 1995; Levin et al. 1996).

En los animales, la hibridación natural ha sido considerada como un evento de poca importancia evolutiva, que lleva a una disminución en los niveles de adecuación de las especies parentales (Schilthuizen 2002); sin embargo, en plantas la hibridación natural es considerada como un fenómeno frecuente. Por ejemplo, se ha sugerido que cerca de 70% de todas las especies de plantas con flores pudieron haber tenido un origen vía hibridación (Whitham et al. 1991; Masterson 1994; Arnold 1997).

La hibridación tiene una distribución heterogénea entre las familias y géneros de plantas. Recientemente, Whitney et al. (2010) estudiaron ocho floras regionales, incluyendo ~37,000 especies pertenecientes a 3,212 géneros contenidos en 282 familias de plantas vasculares. Los autores encontraron que 40.4% de las familias y 16.2% de los géneros forman híbridos. Asimismo, sugieren que la capacidad de formar híbridos depende en mayor medida de las características intrínsecas de la familia, que a diferencias en las condiciones ambientales. Los autores concluyen que la hibridación en plantas es un

fenómeno común, sin embargo, la mayoría de los híbridos se encuentran aglutinados en un reducido grupo de géneros (Ellstrand et al. 1996; Whitney et al. 2010).

En general, los estudios de hibridación se han centrado en tres enfoques: *i*) en un contexto de análisis sistemático, donde los datos obtenidos sobre la ocurrencia y extensión de la hibridación natural entre los taxa de interés, han sido utilizados para inferir relaciones evolutivas, *ii*) en estudios que han usado este fenómeno para descifrar los mecanismos que limitan el flujo génico, infiriendo que el desarrollo de barreras para el flujo génico es equivalente al proceso de especiación, y *iii*) en estudios en los que se supone que la hibridación natural tiene el potencial de ser en sí misma, evolutivamente importante (Arnold 1997)

Hibridación Introgresiva

La hibridación introgresiva (HI) puede definirse como la incorporación permanente de genes de una especie a otra, debido a retrocruzas repetidas de los híbridos con las especies parentales (Harrison 1993). La HI se considera unidireccional (asimétrica) cuando las retrocruzas ocurren únicamente con individuos de una de las especies parentales o bien, bidireccional (simétrica) cuando las retrocruzas ocurren con individuos de ambas especies parentales (Arnold 1997).

Desde la publicación del libro “Introgressive Hybridization” (Anderson 1949), el papel de la HI en la evolución de las plantas ha sido tema de debate. El autor establece que la transferencia interespecífica de genes vía introgresión es una poderosa fuerza evolutiva que promueve variantes genéticas que sobrepasan a las producidas por mutación.

La HI al ser un mecanismo que promueve el incremento de diversidad genética, puede resultar en la transferencia de características entre las especies y ser la fuente de nuevas adaptaciones, lo que puede originar nuevas razas o especies o por el contrario

reduce el aislamiento por las barreras reproductivas (Rieseberg y Wendel 1993). La HI promueve la creación de morfotipos capaces de acceder a nuevos ambientes y extender su amplitud de distribución geográfica (Thompson y Lumaret 1992). Esta condición le permite al híbrido tener una mayor capacidad competitiva en relación con sus especies parentales putativas.

Los efectos de la HI dependen en gran medida de la intensidad y la dirección con que se presente, pudiendo tener las siguientes consecuencias: *i*) el aumento de la diversidad genética (Caraway et al. 2001), *ii*) la extinción de alguna de las especies (Rhymer y Simberloff 1996), *iii*) un proceso de especiación (Schwarzbach et al. 2001) y *iv*) fusión de especies (Judd et al. 2002). Por ejemplo, si la HI es asimétrica y el número de retrocruzas es poco frecuente, entonces se espera un incremento de diversidad genética en la especie sobre la cual ocurren las retrocruzas (Anderson 1949; Caraway et al. 2001). Por el contrario, si la HI es asimétrica pero el número de retrocruzas es muy alto, la especie puede verse en peligro de extinción por asimilación genética (Levin et al. 1996). Por último, si la HI es simétrica entonces se puede promover una fusión de las poblaciones, en el caso de que exista un rompimiento total de las barreras reproductivas (Judd et al. 2002).

En general, se ha establecido que el flujo génico interespecífico puede conferir a las poblaciones una mayor variación que facilite la colonización de nuevos hábitats (Caraway et al. 2001). Asimismo, la HI puede promover la extinción de especies con distribución geográfica restringida por asimilación genética. En particular, dichas poblaciones pueden verse afectadas si las barreras reproductivas (BR) se rompen debido a disturbios que generan perturbaciones en el hábitat (Arnold 1997). Las características que hacen que especies con distribución restringida (e.g., especies endémicas, especies raras) estén más expuestas a la extinción vía HI, son: *i*) el solapamiento espacial con especies cercanamente relacionadas, *ii*) el grado de compatibilidad que permita fertilización entre

las dos especies, y *iii*) que la especie no endémica presente al menos el doble de tamaño de población que la especie endémica o que sea más efectiva reproductivamente (e.g., producir una mayor cantidad de polen) (Ellstrand 1992), *iv*) bajas tasas de autopolinización, y *v*) que no presente crecimiento vegetativo.

Barreras reproductivas (BR)

Las BR imposibilitan el flujo génico entre especies cercanas filogenéticamente. El establecimiento de BR es un proceso progresivo que se debe a la acumulación de cambios genéticos (Szymura y Barton 1986), y se clasifican en precigóticas y postcigóticas (Futuyma 1998).

Las BR precigóticas impiden la fusión de gametos (formación de cigotos híbridos), y dentro de éstas se encuentra el aislamiento de hábitat, temporal, etológico, mecánico e incompatibilidad gamética. En el caso de que algunos de los mecanismos antes mencionados no sea efectivo, y se llegue a formar un embrión híbrido, las BR postcigóticas pueden llegar a disminuir la tasa de sobrevivencia del cigoto híbrido así como su capacidad reproductiva. Esto ocurre principalmente mediante la inviabilidad del híbrido (Judd et al. 2002). Sin embargo, si el híbrido logra desarrollarse hasta la edad adulta, su adecuación puede verse afectada por esterilidad. En este caso, los gametos que produzca el híbrido no serán funcionales debido a diferencias estructurales entre los cromosomas que evitan una correcta segregación durante la meiosis (Mooring 2001).

Las BR antes mencionadas describen un escenario bajo el cual la formación de híbridos en la naturaleza sería rara o nula. A pesar de lo anterior, el fenómeno de hibridación natural se ha documentado en ambientes que facilitan el establecimiento de individuos híbridos, los cuales pueden ser áreas de simpatria de especies cercanas filogenéticamente. Lo anterior refleja que las BR, por fuertes que parezcan, pueden ser

superadas. Los eventos raros de hibridación pueden ser relevantes evolutivamente, ya que un individuo híbrido (fértil o parcialmente fértil) puede ser suficiente para actuar como progenitor de una nueva línea evolutiva (Fontdevila y Moya 2003).

Los disturbios son eventos que promueven la formación y establecimiento de individuos híbridos (Baker 1986; Urbanska 1987; Tovar-Sánchez y Oyama 2004; Ramírez-Rodríguez et al. 2011). Asimismo, se ha documentado que las BR se pueden llegar a superar en especies de plantas que presentan las siguientes características de historia de vida: *i*) son polinizadas por animales y por el viento, *ii*) son perennes, *iii*) presentan reproducción clonal, *iv*) están en simpatria con especies emparentadas, y *v*) presentan una amplia distribución geográfica (Ellstrand et al. 1996; Whitney et al. 2010).

Especies invasoras e hibridación

Una especie invasora se define como aquella que adquiere una ventaja competitiva seguida de la desaparición de obstáculos naturales para su proliferación, lo que permite su rápida propagación colonizando nuevas áreas y convirtiéndose en una población dominante (Valery et al. 2008; Davis 2010). Con esta definición las especies exóticas y las especies nativas tendrían el potencial de convertirse en especies invasoras.

En general, las especies invasoras pueden alterar la distribución y abundancia de las poblaciones, la estructura de las comunidades y la dinámica de los ecosistemas. Asimismo, se ha documentado que las especies invasoras son la segunda causa de pérdida de biodiversidad a nivel mundial (Vitousek et al. 1997).

Es importante resaltar, que del total de especies que han sido introducidas a diferentes regiones, sólo pocas especies han registrado un estatus de especie invasora (Williamson y Fitter 1996).

Recientemente, se ha sugerido que el fenómeno de hibridación inter-específico puede promover que las especies se vuelvan invasoras. De acuerdo con Schierenbeck y Ellstrand (2009), los procesos por los cuales la hibridación natural puede facilitar la invasión es la creación de una novedad evolutiva. A pesar de que la hibridación origina una gran cantidad de genotipos con una baja adecuación, una pequeña fracción de éstos puede mostrar mayor adecuación que ambas especies parentales, facilitando la invasión por parte de los híbridos. Una forma en la que se puede dar esta novedad evolutiva es mediante: *i*) la aparición de caracteres transgresivos; *ii*) el incrementando la variación genética. El aumento de la diversidad genética vía HI puede dotar a las poblaciones de nuevas características que faciliten la expansión de su área de distribución geográfica y participar así en la invasión; *iii*) la reducción de la carga genética. Las especies con un bajo tamaño poblacional pueden acumular mutaciones deletéreas que disminuyen la adecuación promedio de la población. Si dos poblaciones de una especie con estas características forman híbridos, la recombinación genética puede reducir la carga genética, *iv*) la generación de mecanismos genéticos/reproductivos que estabilizan a los híbridos. El desarrollo de algunos mecanismos como el crecimiento clonal puede favorecer el establecimiento y proliferación de individuos híbridos. De esta manera, se crearían genotipos con mayor adecuación y por lo tanto podrían participar en la invasión biológica.

La familia Arecaceae

Las palmas (Arecaceae) son monocotiledóneas leñosas representadas por aproximadamente 2,779 especies, contenidas 211 géneros (Moore y Uhl 1982). Su distribución geográfica está restringida a las regiones tropicales y subtropicales (Uhl y Dransfield 1987).

En general, el fenómeno de hibridación se ha documentado de manera frecuente en especies cultivadas de la familia Arecaceae, tal como se ha observado en especies pertenecientes a los géneros *Attalea*, *Bactris*, *Chamedorea*, *Copernicia*, *Desmoncus*, *Latania*, *Orbignya*, *Phoenix* y *Ptychosperma* (Balik et al. 1987; Henderson et al. 1995; Jones 1995). Asimismo, la hibridación a nivel intergenérico se ha registrado entre los género *Sygarus* × *Butia* (Wilcox 1998) y entre los géneros *Attalea* × *Orbignya* (Jones 1995).

En México están presentes 100 especies de palmas contenidas en 20 géneros (Quero y Yáñez 2000). Algunos géneros como *Sabal*, *Washingtonia* y *Brahea* son considerados mexicanos (Zona 1990; Quero 1994; Quero y Yáñez 2000). Dentro de este último género se han observado problemas taxonómicos en la delimitación de especies, tal situación se presentó en el complejo *Brahea* – *Erythea*, que hasta antes del trabajo de Quero y Yáñez (2000), eran considerados como géneros diferentes. Estos autores sugieren que el género *Brahea* puede ser dividido en dos subgéneros: *Brahea* y *Erythea*. El subgénero *Brahea* está conformado por las especies *B. berlandieri* Bartlett, *B. decumbens*, Rzed. *B. dulcis* (Kunth) C. Martius, *B. morei* L.H. Bailey ex H.E. Moore y *B. nitida* André. Por su parte, el subgénero *Erythea* está conformado por las especies *B. aculeta* (Brandege) H.E. Moore, *B. armata* S. Watson, *B. brandegeei* (Purpus) H.E. Moore, *B. edulis* H. Wendl. ex S. Watson, *B. elegans* (Franceschi ex Becc.) H.E. Moore, *B. pimo* Becc., *B. salvadorensis* H. Wendl. ex Becc., *Brahea sarukhanii* H.J. Quero R.

El género *Brahea* presenta una amplia distribución geográfica en México, se encuentra desde el nivel del mar hasta aproximadamente 2000 m; latitudinalmente se le encuentra hasta los 32° por el pacífico a los 28° por la vertiente del Golfo de México (Quero y Yáñez 2000).

En México, *Brahea dulcis* (Kunth) C. Martius y *B. nitida* André son dos especies de palmas arbóreas bien estudiadas desde el punto de vista taxonómico. Cuando estas especies se encuentran en condiciones alopátricas presentan caracteres morfológicos que las pueden delimitar fácilmente (Quero 1994; Quero y Yáñez 2000). Sin embargo, cuando se encuentran en simpatria se han detectado individuos con morfología atípica entre las especies de *Brahea dulcis* y *B. nitida*, sugiriendo que el fenómeno de hibridación podría explicar la variación observada (com. pers. Jaime Jiménez, Herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM y Efraín Tovar, Sistemática y Evolución, CIByC, UAEM).

Brahea dulcis puede diferenciarse fácilmente gracias a las hojas generalmente filíferas con lámina casi orbicular, verde glauca, pecíolos hasta de 90 cm de largo, margen con espinas e inflorescencia de 1-3 m de largo. Esta especie, es muy abundante y puede presentarse como dominante en ambientes alterados (Quero y Yáñez 2000). En contraste, *B. nitida* presenta hojas flabelado-orbicular; haz verde brillante y envés glauco, pecíolo hasta 1.5 m de largo, con márgenes lisos e inflorescencia de 2.5-3 m de largo (Quero y Yáñez 2000). Esta especie está enlistada tanto en la NOM-059 (SEMARNAT-2010), como por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN).

Especies manejadas: clonación e hibridación

Se ha registrado el uso de las palmas por más de 3000 años (Rzedowski 1983; Ugent 2000; Caballero et al. 2001; Martínez et al. 2002). Es una de las familias de plantas más comúnmente cosechadas, con mayor uso y comercialización en el mundo (Balick 1986).

Particularmente, en México el uso de las palmas tiene una gran importancia económica y cultural, principalmente en grupos indígenas (e.g., Tarahumaras, Mixtecos, Nahuas, Zapotecos), quienes son los principales usuarios y habitantes de las áreas con mayor diversidad biológica en el mundo (Casas y Parra 2007). Dentro de los usos de esta

familia destacan el alimenticio, el ornamental, el religioso, el medicinal y el comercial (Casas y Parra 2007).

Brahea dulcis presenta una gran diversidad de usos en México, resaltando su valor artesanal, religioso y económico. Las hojas son ampliamente utilizadas como materia prima en la elaboración de artesanías, ofrendas religiosas y principalmente para el techado de viviendas (Pavón et al. 2006).

Particularmente en el estado de Guerrero las hojas de *B. dulcis*, están sometidas a diferente tipo de manejo tradicional por la comunidad indígena de la localidad de Huitziltepec en el municipio de Eduardo Neri (Illsley et al. 2001), pudiéndose diferenciar básicamente dos tipos de palmares: a) *Palmar Tipo Arbóreo o "Soyátl"*, en este palmar sólo se cortan las hojas maduras. Este tipo de manejo permite la producción de flores y frutos favoreciendo así la recombinación genética entre las poblaciones (Blancas 2001), b) *Palmar decumbente o "amacollado"*, este tipo está destinado para la constante extracción de las hojas jóvenes y de las vainas foliares evitando así el desarrollo de su tallo y manteniendo a los individuos bajos en altura. Los individuos no producen inflorescencia y es estimulado un crecimiento clonal (Illsley et al. 2001; Blancas 2001; Pavón et al. 2006).

La clonalidad es considerada un atributo común en angiospermas, ya que se estima que está presente en aproximadamente un 70% de las especies, siendo más frecuente entre las monocotiledóneas (Tiffney y Niklas 1985; Wilson et al. 2005; Mandujano-Sánchez 2007).

El crecimiento clonal confiere una serie de ventajas ecológicas a las poblaciones, dentro de las cuales se presenta: a) mantenimiento de genotipos exitosos, b) bajo costo en los ramets nuevos para adquirir recursos y contribuir con ellos para todo el genet, c) persistencia en hábitats desfavorables para la reproducción sexual, d) habilidad de obtener recursos en ambientes heterogéneos, e) no requieren la participación de polinizadores y f)

aumento en la tasa de supervivencia del genet mediante el reparto de riesgo de muerte entre los ramets (Silander 1985; Caraco y Kelly 1991; Kanno y Seiwa 2004; Mandujano-Sánchez 2007)).

Considerando los porcentajes estimados de clonalidad entre las plantas, así como los de hibridación, se puede suponer que ciertos híbridos han recurrido a la clonación para su establecimiento y eventual especiación, ya que los mecanismos de reproducción asexual, permiten la estabilización de los genotipos altamente heterocigos de los híbridos (Grant 1981).

Por lo anterior, se puede entender que mediante clonación, los híbridos podrían desarrollar linajes con reproducción sexual fértil ya que aun cuando la hibridación sea rara y los niveles de fertilidad sean bajos, la reproducción clonal puede incrementar el número de ramets florales generando con ello la oportunidad de acoplamientos exitosos entre híbridos (Westhoff 1998; Burke et al. 2000).

Los disturbios son eventos que promueven el crecimiento clonal (Pavón et al. 2006; Schierenbeck y Ellstrand 2009) y estimulan la formación y establecimiento de individuos híbridos (Baker 1986; Urbanska 1987, Tovar-Sánchez y Oyama 2004; Ramírez-Rodríguez et al. 2011). En general, los disturbios, la hibridación y la reproducción clonal, han promovido que varias especies no nativas o exóticas se vuelvan invasoras (Stebbins 1985; Ellstrand y Schierenbeck 2000; Schierenbeck y Ellstrand 2009).

JUSTIFICACIÓN

A pesar de que la familia *Arecaceae* contiene una alta riqueza de especies; que México es considerado el centro de diversificación del género *Brahea*; de su endemismo; del frecuente uso que hacen los grupos indígenas de las palmas, así como la controversia que han generado los individuos con caracteres morfológicos atípicos registrados en el área de solapamiento entre *Brahea dulcis* y *B. nitida*, no se han realizado estudios que aborden si las plantas con morfología atípica de poblaciones naturales simpátricas/mixtas de estas especies son el resultado del fenómeno de hibridación. Asimismo, no se ha evaluado las consecuencias del manejo de la palma *B. dulcis* sobre su estructura genética, clonal e hibridación.

Para ello en la presente investigación se han planteado los siguientes objetivos

OBJETIVO GENERAL

Determinar mediante marcadores genéticos (RAPDs) y morfológicos foliares si los organismos atípicos en las zona de solapamiento entre *Brahea dulcis* y *B. nitida* son el resultado del fenómeno de hibridación, y si el manejo que realizan las comunidades rurales sobre *B. dulcis* influye sobre su fisonomía y características genéticas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Determinar mediante marcadores morfológicos foliares y moleculares (RAPDs) si los individuos con morfología atípica entre *Brahea dulcis* y *B. nitida* son el resultado del flujo génico entre estas dos especies.
- 2.- Determinar mediante marcadores morfológico foliares y moleculares, los niveles y patrones de hibridación existentes entre *B. dulcis* y *B. nitida* a lo largo de su distribución geográfica en México.

- 3.- Evaluar la existencia y dirección de introgresión en el complejo *B. dulcis* × *B. nitida*.
- 4.- Evaluar la correlación entre caracteres morfológicos y moleculares en el complejo *B. dulcis* × *B. nitida*.
5. Analizar la estructura genética y diversidad clonal en poblaciones manejadas (corte de hojas) de *B. dulcis*.
6. Determinar si el manejo de *B. dulcis* promueve la formación de individuos híbridos con *B. nitida*.
7. Evaluar la importancia relativa de la reproducción sexual, el crecimiento clonal, e hibridación en la dinámica poblacional de *B. dulcis*.

En los dos siguientes capítulos se presentan las evidencias de que se está presentando hibridación introgresiva entre estas dos especies y de cómo el manejo ha influido en la hibridación, como en la estructura genética y clonal de *B. dulcis*.

CAPÍTULO II

Hibridación intorgresiva entre *Brahea dulcis* y *Brahea nitida* (Arecaceae) en México: evidencias morfológicas y moleculares

Nota: Ver anexo de la tesis donde se muestra este capítulo como artículo ya publicado

Introducción

A pesar de que el fenómeno de hibridación natural se ha registrado en muchos taxones, es particularmente recurrente entre especies de angiospermas (Anderson 1949; Stebbins 1959, Arnold 1992; Rieseberg y Wendel 1993; Ellstrand et al. 1996). Recientemente se ha documentado que al menos el 25% de las especies de plantas están relacionadas con eventos de hibridación o hibridación introgresiva (Mallet 2005) y que la frecuencia de este fenómeno varía considerablemente entre las familias botánicas (Ellstrand et al. 1996).

Las zonas híbridas son regiones geográficas en las que las poblaciones de dos o más taxones estrechamente relacionados, entran en contacto y establecen procesos de intercambio genético entre ellos (Arnold 1997). Estos escenarios se mantienen como resultado de un equilibrio entre los procesos de selección (Barton y Hewitt 1985). Sin embargo, la hibridación también puede promover la extinción de especies raras, ya sea directamente a través de la asimilación genética, o indirectamente mediante la introducción de impurezas genéticas y reduciendo de este modo su valor en un contexto de conservación (Rieseberg 1991; Soltis y Gitzendanner 1999; Levin 2000; Perry et al. 2002).

Los híbridos de origen reciente, pueden presentar un menor valor de conservación que los híbridos más antiguos, considerando que la hibridación actual puede ser producto de influencias antropogénicas.

Las afectaciones ecosistémicas relacionadas con las actividades humanas, como la deforestación (Tovar-Sánchez y Oyama 2004), la introducción de especies exóticas (Abbott et al. 2003) y cruza de cultivares con parientes silvestres (Ellstrand et al. 1999), pueden favorecer el rompimiento de barreras ecológicas que significan los ecosistemas conservados (Allendorf et al. 2001). Esto puede incrementar la probabilidad de hibridación. Bajo este contexto las zonas híbridas se presentan como laboratorios naturales que en las últimas décadas ha ocupado el interés de los ecólogos y taxónomos.

Las herramientas moleculares son auxiliares importantes en la definición del origen híbrido de los taxones. Es común en algunos casos que los caracteres morfológicos por sí solos, no pueden corroborar de manera precisa la existencia de hibridación (Tovar-Sánchez y Oyama 2004; Lau et al. 2005). Por lo general, la primera generación de híbridos o los híbridos estériles suelen ser distinguibles por la presencia de caracteres morfológicos intermedios (Fernández-Manjarrés et al. 2006). Sin embargo, con el tiempo los híbridos fértiles y sus generaciones subsecuentes pueden presentar una gran variedad de arreglos de caracteres, producto de segregación al azar y del deterioro gradual del desequilibrio de ligamiento (Rieseberg y Ellstrand 1993; Carney et al. 2000).

La variación morfológica no sólo puede confundir la identidad taxonómica de las especies, sino que además, requiere de un análisis del nivel de riesgo que los híbridos pueden representar para los programas de conservación de algunas especies (Oliva-Tejera et al. 2006). El uso de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) ha sido una herramienta adecuada en la detección de la hibridación introgresiva interespecífica en plantas (Tovar-Sánchez y Oyama 2004).

La familia Arecaceae está representada por 2,779 especies incluidas en 211 géneros (Moore y Uhl 1982). Las Palmas representan un componente importante de los bosques tropicales, al ser organismos conspicuos y abundantes, así como elementos importantes en la estructura de la comunidad de este tipo de ecosistemas. Además, aproximadamente el 10% de las palmas Neotropicales han sido descritas como complejos de especies. Estos complejos incluyen grupos de organismos que presentan formas diversas, cuyas delimitaciones a nivel específico a menudo no son del todo claras, debido a la ausencia de caracteres fijos que permitan hacer una diferenciación morfológica precisa. Además, la presencia de potenciales eventos de hibridación incrementa la complejidad de estos sistemas (Henderson et al. 1995; Borchsenius 1999).

En la familia Arecaceae se ha documentado un número importante de especies, donde la hibridación podría tener un papel relevante en los procesos evolutivos y de especiación. La presencia de híbridos hortícolas (más de 33; Jones 1995) son evidencia de la debilidad de las barreras reproductivas entre especies de esta familia. Esta condición ha sido corroborada con algunos estudios de hibridación natural en Arecaceae. En general, el fenómeno de hibridación ha sido registrado en el 5.2% de los géneros y el 1% de las especies (Balick 1987; Wilcox et al. 1990; Jones 1995; Pintaud 2008).

En México, la familia Arecaceae está conformada por 100 especies agrupadas en 200 géneros (Quero y Yáñez 2000). Particularmente, el género *Brahea* está representado por 13 especies y es considerado un género Mexicano (Quero y Yáñez 2000). Sin embargo, cabe resaltar que no se ha reportado hibridación en palmas Mexicanas. Los estudios de las relaciones taxonómicas y evolutivas de las palmas Mexicanas se han analizado recientemente y han puesto de manifiesto complejos de especies parentales e híbridos putativos.

En este estudio se han seleccionado dos especies de palmas, *B. dulcis* (Kunth) C. Martius y *B. nitida* André. Se ha documentado que *B. dulcis* es una especie propia de ambientes xéricos además de ser favorecida por disturbios de origen antropogénico (e.g., deforestación y fuego), que promueven su establecimiento e incrementan su amplitud de distribución geográfica. Estas características le confieren un estatus de especie invasora, por lo que consecuentemente no se encuentra bajo ningún estatus de conservación. En contraste, *B. nitida* está asociada a ambientes másicos y se ha observado que es menos frecuente en bosques templados alterados, además de ser una especie que se encuentra bajo protección según la NOM-059-SEMARNAT-2010.

La floración en *B. dulcis* y *B. nitida* se presenta a lo largo de todo el año (Quero y Yáñez 2000). De manera general las palmas son polinizadas por animales como

escarabajos, abejas, moscas, hormigas y murciélagos (Uhl y Dransfield 1987; Dehgan 1998). Observaciones de campo hechas en este estudio registraron la presencia de algunos insectos de los órdenes Coleóptera e Himenóptera sobre flores de *B. dulcis* y *B. nitida*. Estas observaciones coinciden con las reportadas para otras especies de palmas relacionadas como lo son *Cryosophila albida* (Henderson 1984) y *Sabal palmetto* (Brown 1976). La dispersión de las semillas en *B. dulcis* se realiza por coyotes, zorras, aves y humanos (Aguilar 1996; Romero-Morales 2004), sin embargo, se desconocen los mecanismos de dispersión de semillas en *B. nitida*.

Brahea dulcis y *B. nitida* presentan caracteres morfológicos que las diferencian de manera clara cuando se encuentra en poblaciones alopátridas puras (Quero y Yáñez 2000). Sin embargo, cuando están en simpatria se observan árboles con caracteres morfológicos atípicos. Esta condición sugiere que la hibridación pudiera explicar estas variaciones observadas.

En esta parte de la investigación se describen y comparan los patrones de variación morfológica y genética del complejo *B. dulcis* × *B. nitida*, documentando el flujo y dirección de la hibridación introgresiva en las zonas de solapamientos en México. Además se analizan las diferencias taxonómicas de *B. dulcis*, *B. nitida* e híbridos putativos; y se describe si el grado de mezcla genética puede ser predicho con base a los caracteres morfológicos.

Métodos y Materiales

Sitios de estudio

Se seleccionaron cuatro zonas simpátridas en donde *B. dulcis* y *B. nitida* se solapan. Estas localidades presentaban el mayor número de individuos con caracteres morfológicos atípicos de este complejo. Adicionalmente, se seleccionó para cada una de las especies

parentales putiativas dos localidades alopátridas. En cada zona alopátrida la especie de *Brahea* era dominante del dosel y no había evidencias de aparentes híbridos (Tabla 1, Fig. 1). En general, en las zonas simpátridas los híbridos se encuentran en una baja frecuencia, en espacios cercanos a los padres y/o intercalados con ellos. Además, se pudo apreciar que los árboles con morfología atípica sólo se encuentran en ambientes perturbados, sin embargo, no se evaluó la preferencia de estas taxa a algún tipo de suelo, o claros en la vegetación. Es raro encontrar organismos atípicos fuera de las zonas de contacto. Es importante resaltar que salvo las especies estudiadas en esta investigación no hay evidencia de eventos de hibridación en Palmas mexicanas.

Entre las poblaciones simpátridas estudiadas, Xocomanatlan es el área mejor conservada casi sin perturbación local en el interior del bosque. En esta zona el disturbio sólo está dado por la presencia de un camino local de terracería. El tipo de vegetación de esta área es un bosque de *Quercus-Pinus* que muestra evidencias de regeneración natural. No se registró el uso o manejo de palmas en esta localidad. San Martín Atexcal y Santiago Nopala presentan lo que se clasificó como un estado intermedio de la conservación. Se detectó la presencia de individuos de *Quercus*, pero no se apreció una regeneración natural de estos encinos. Es un área de suelos calcáreos no aptos para la agricultura y la palma *Brahea* es utilizada para la elaboración de artesanías. Xochipala por su parte, es una localidad con alto nivel de perturbación en donde es evidente una importante reducción del bosque de encino, producto de la presión de asentamientos humanos. En esta localidad se pudieron apreciar sólo algunos individuos de *Quercus*. Sin embargo en la actualidad el uso de árboles pequeños y ramas para leña sigue siendo una práctica recurrente. Esta localidad se caracteriza por un desarrollo urbano con vías de comunicación pavimentadas, presencia de ganado y cultivos tradicionales.

Datos morfológicos

Para la obtención de datos morfológicos se hicieron transectos de 1,500 m en los sitios simpátridos y de 1,000 m en los sitios alopátridos. De manera sistemática cada 50 m se muestreó el individuo más cercano. Los individuos arbóreos muestreados se seleccionaron considerando las siguientes características: a) altura de más de 3m, b) con más de cinco hojas maduras y sin daño aparente en las hojas, y c) la presencia de hojas jóvenes para la extracción de ADN. Se midieron 19 caracteres macro-morfológicos foliares en 200 árboles. (Tabla 2). Se muestrearon un total de 120 árboles en las cuatro poblaciones simpátridas/mixtas y 20 árboles de cada sitio alopátrido (dos sitios para cada especie parental). De cada árbol se muestrearon aleatoriamente cinco hojas maduras sin daño aparente, midiéndose un total de 1000 hojas.

Se evaluaron siete caracteres micro-morfológicos foliares (Tabla 2). En total, se tomaron muestras de 48 árboles, 12 individuos de los sitios alopátridos y 36 individuos en sitios simpátridos. Se seleccionaron tres hojas al azar por cada individuo y se fijaron en FAA (formaldehído-ácido acético-agua-alcohol). En el laboratorio, las hojas se deshidrataron con alcohol a diferentes concentraciones, a continuación se pusieron en xileno y se incluyeron en parafina. De cada hoja se obtuvieron cuatro secciones de tejido de 5µm; después se pusieron a 60 °C durante 30 min y posteriormente se incubaron en xileno durante 20 min. Las secciones de tejido se rehidrataron disminuyendo las concentraciones de alcohol durante 15 min y se tiñeron con safranina. Se rehidrataron nuevamente y se contrastaron con verde rápido durante 2 min. Por último, las secciones se deshidrataron, se montaron con resina sintética y se secaron a 60 °C durante 15 días. Se obtuvo un total de 576 secciones de tejido.

Con el propósito de conocer la densidad estomática, se seleccionaron al azar tres hojas de cada individuo. Mediante la técnica de réplica con pegamento de cianoacrilato, de

manera sistemática se analizó la parte media del segmento central de cada hoja. Se obtuvieron un total de 96 secciones de tejido. Todas las secciones de tejidos se observaron con un microscopio Nikon Eclipse 80i a 10 X. Cada una de las muestras se analizó utilizando el analizador de imágenes NIS-Elements.

Datos moleculares

Para la obtención de los datos moleculares se colectaron hojas jóvenes sin daño aparente de 200 árboles. 30 individuos de cada una de las cuatro zonas mixtas ($n = 120$) y 20 árboles en cada una de las cuatro zonas puras, dos de cada especie parental ($n=80$). Se extrajo el ADN total utilizando el DNAeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, California, EE.UU.). Se realizó el análisis genético utilizando RAPDs (Welsh y McClelland, 1990; Williams et al. 1990) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Con la finalidad de encontrar marcadores específicos o diagnósticos para cada especie parental se probaron 48 cebadores de 10-pares de bases (pb) y de secuencia aleatoria (Kits A, B, C; Operon Technologies, Alameda, California, EE.UU.). Se entiende como marcadores de diagnóstico a los marcadores que están presentes en todos los individuos de una especie y ausente en una segunda especie, mientras que los marcadores especie-específicos son aquellos que se encuentran únicamente en una especie pero no necesariamente están presentes en todos los individuos de una segunda especie (Howard et al. 1997). Finalmente los 200 individuos fueron probados con los cuatro cebadores (seis marcadores diagnóstico [*B. dulcis* OPA-1, OPA-2, OPA-4, OPB-4 y *B. nitida* OPB-4]) y dos de marcadores especie-específicos [*B. nitida*, OPA-1, OPB-4]). Los fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, se tiñeron con bromuro de etidio, y se revelaron sobre una cámara UV. El tamaño de los fragmentos de ADN se estimaron con ADN kb ladder de 1-kilo bases de ADN (kb).

Análisis estadístico

Se llevaron a cabo Análisis de Varianza Anidados (ANOVA) para determinar el efecto de la especie de palma y la localidad sobre la variabilidad morfológica de la hoja de cada uno de los 26 caracteres estudiados (Tabla 2). En este análisis no se incluyeron híbridos putativos. Los árboles fueron considerados como un factor aleatorio anidado dentro de las especies, debido a que eran representativos de cada población. Los datos porcentuales se corrigieron como $X = \arcseno (\%)^{1/2}$, y los datos discontinuos fueron transformados como $X = (x)^{1/2} + 0.5$ (Zar 1999).

El análisis molecular permitió determinar la identidad genética de cada individuo (*B. dulcis*, *B. nitida* o híbridos putativos) dentro de las zonas de simpatria. Con esta información se procedió a realizar un análisis de conteo de caracteres (Wilson 1992), y la caracterización fenotípica (Schwarzbach et al. 2001) de los individuos localizados en cada una de las cuatro zonas simpátridas/mixtas del complejo *B. dulcis* × *B. nitida*.

Para determinar si en el complejo *B. dulcis* × *B. nitida* los híbridos presentaban morfología foliar intermedia, se procedió al análisis de conteo de caracteres (Wilson 1992). Este método se basa en la selección de individuos que muestran diferencias significativas entre los grupos de padres putativos, seguido de una prueba de signos binomial (Zar 2010) de caracteres intermedios vs. no intermedios. Brevemente se puede mencionar que con este método se forman grupos para cada taxón (*B. dulcis*, *B. nitida* y los híbridos putativos). A continuación se realiza una prueba de ANOVA para determinar el efecto de los taxones en cada carácter morfológico. Posteriormente, se utiliza una prueba de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$) para determinar si los híbridos putativos presentan caracteres intermedios con respecto a sus especies parentales putativas. Los signos positivo (+) indica un carácter intermedio, mientras signo negativo (-) representa un carácter no intermedio.

Con el fin de determinar en cada zona simpátrida, el número de caracteres intermedios, transgresivos y parecidos a los parentales, se utilizó el método de caracterización fenotípica (Schwarzbach et al. 2001). Se analizaron los 26 caracteres morfológicos mediante ANOVA de una vía considerando los taxa (*B. dulcis*, *B. nitida*, los híbridos putativos) como la variable independiente. Mediante un análisis de comparación múltiple (Tukey) se determinaron diferencias significativas entre las medias de los taxones. Cuando un carácter de los híbridos presentó diferencias significativas, con valores mayores o menores con respecto a los presentados por los parentales putativos, fue considerado como transgresivo (negativo o positivo). De no ser así, el carácter de los híbridos se consideró como intermedio; como semejante a *B. dulcis*, o como semejante a *B. nitida*.

Se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA) para evaluar el carácter más útiles para la ordenación entre *B. dulcis* y *B. nitida*. Por otra parte, para conocer el grado de importancia de cada carácter morfológico en el modelo de ordenación, se realizó una correlación (r) de Pearson entre cada variable (caracteres morfológicos) y cada componente principal ($\alpha < 0.05$).

Por último, el análisis de correlación se utilizó para evaluar la relación entre los marcadores morfológicos y moleculares en complejo *B. dulcis* \times *B. nitida*. Para todos los análisis estadísticos se utilizó Statistica 6.0 para Windows (Statsoft 1998).

Mediante el Software Hardig-Hybrid (Hardig et al. 2000) se calculó el índice de hibridación con los datos moleculares (RAPDs). Este índice permite identificar tanto individuos intermedios, como retrocruzas, así como las estructuras de los grupos híbridos. Los resultados se representan en un histograma de frecuencias para cada población mixta así como para los sitios puros. Una prueba Mantel (Z) y un análisis de genética de poblaciones (TFPGA, ver. 1.3) fueron utilizados para probar aislamiento por distancia, así

como para crear un diagrama de agrupamiento de las poblaciones simpátridas/mixtas y de las cuatro zonas puras (Miller 1997).

Resultados

Análisis morfológico de los individuos parentales e híbridos

Se encontró que todos los caracteres examinados en *B. dulcis* difieren significativamente de los de *B. nitida*. Además se comprobó un efecto significativo de la localidad sobre cada uno de los caracteres morfológico foliares (Tabla 3). Los caracteres de las espinas (ancho, largo y el número de espinas) se separaron claramente sin sobrelaparse entre las dos especies de *Brahea*, tanto en poblaciones puras como en las zonas simpátridas/mixtas. Por lo anterior, estos caracteres pueden ser considerados como un carácter especie-específico.

En general, los híbridos presentan características morfológicas foliares intermedias entre *B. dulcis* y *B. nitida*. El análisis binomial de signos del conteo de caracteres, mostró que la desviación fue altamente significativa ($P < 0.001$), por lo que, se aceptó la hipótesis de hibridación en tres zonas simpátridas (Xocomanatlan, Xochipala y Nopala Santiago). Las proporciones de caracteres intermedios por población fue la siguiente: Xocomanatlan, 22 de 26 caracteres; Santiago Nopala 20 de 26; Xochipala, 18 de 26. Sin embargo, para el caso San Martín Atexcal sólo 11 de 26 de los caracteres examinados fueron intermedios, por lo que bajo esta metodología no se aceptó la hipótesis de hibridación (Tabla 4).

En general, el fenotipo híbrido fue morfológicamente similar a *B. nitida* en 38.9% de los caracteres; un 33.2% intermedios; un 10.0% transgresivos; un 7.5% similares a *B. dulcis*. El 10.4% restante de los caracteres no difirió entre los taxones.

El análisis realizado mediante la caracterización del fenotipo, mostró los siguientes patrones en cada zona simpátrida: En San Martín Atexcal un 50.0% de los caracteres fue morfológicamente semejante a *B. nitida*; un 26.9% de los caracteres no presentó diferencias

entre los tres taxones; un 11.5% de los caracteres fueron intermedios; un 7.7% de los caracteres fueron similares a *B. dulcis*, y un 3.8% de los caracteres fueron transgresivos positivos. En Xocomanatlan el 46.1% de los caracteres fueron similar morfológicamente a *B. nitida*; un 34.6% de los caracteres fueron intermedios; el 11.6% de los caracteres fueron similares a *B. dulcis*, y un 7.7% no presentaron diferencias entre los tres taxones. En Xochipala un 43.3% de los caracteres fueron morfológicamente intermedios; un 30.8% de los caracteres fueron similar a *B. nitida*; un 19.3% de los caracteres no presentaron diferencias entre los taxones, y un 7.7% fueron caracteres transgresivos positivos. En Santiago Nopala el 46.1% de los caracteres fueron morfológicamente intermedios; el 34.6%, presentaron caracteres similares a *B. nitida*; un 11.6% de los caracteres fueron similares a *B. dulcis*, y un 7.7% de los caracteres fueron trasgresivos positivos.

En la comparación de la variación de *B. dulcis* × *B. nitida* un alto nivel de significancia ($P < 0.001$) se registró en los ejes de los componentes principales, registrando de 88.61% (Xocomanatlan) a 98.40% (Santiago Nopala) entre taxa. Para las cuatro zonas simpátridas, el Análisis de Componentes Principales (ACP) mostró una separación entre taxa. El ACP para la variación micro y macro-morfología foliar mostró de manera general, que los caracteres que presentan una mejor correlación con CP1 son los caracteres de talla: MWL, LCSB, LP, y LWB para Santiago Nopala y Xochipala, mientras que para Xocomanatlan y San Martín Atexcal fueron MWL, LL, y LWA. Por otro lado, los caracteres mejor correlacionados con el CP2 fueron los caracteres de las espinas: S1P, LS4P y S4P en San Martín Atexcal y Xocomatlan, mientras que en Xochipala y Santiago Nopala los caracteres micromorfológicos MA y META mostraron la mejor correlación con este componente (Fig. 2).

Análisis genético (RAPD) del complejo *B. dulcis* × *B. nitida*

Para estimar el estado genético de los árboles de *B. dulcis* y *B. nitida* definidos morfológicamente como “puros” o “híbridos”, se utilizaron seis marcadores diagnósticos y dos marcadores especie-específicos. De los cebadores utilizados se obtuvo un total de 31 marcadores distintos (bandas). El uso y análisis de RAPD's ha demostrado ser una herramienta poderosa para la caracterización de los individuos híbridos entre *B. dulcis* y *B. nitida*.

Algunos árboles de las zonas simpátridas/mixtas presentaron una aditividad de perfecta, como se esperaría en los F1 (3.4%). Sin embargo, 23.7% los individuos fueron interpretados como F1, 11.9% se desviaron sólo por un carácter (0.437-0.562), y 8.5% se desviaron sólo por dos caracteres (0.375-0.625). Además, 9.3% fueron interpretados como retrocruzas hacia *B. nitida* (0.250-0.312) y 5.9% como retrocruzas hacia *B. dulcis* (0.687 - 0.750) (Fig. 3).

La media del índice de hibridación ML para individuos de *B. nitida* fue de 0.92 (SD 0.06), para *B. dulcis* fue 0.09 (SD 0.07), y para los híbridos de 0.58 (SD 0.14).

El análisis mediante el índice de hibridación de Hardig (ML), utilizando seis marcadores RAPD apoyó la identificación en campo de 200 árboles (Fig. 3). En la población de San Martín Atexcal, cuatro individuos de la población que fueron clasificaron en el campo como *B. dulcis*, el índice mostró que eran híbridos. Once individuos de la población de Xochipala y uno de San Martín Atexcal fueron clasificados como *B. nitida* en el campo, pero el índice mostró que nueve eran híbridos F1 y tres eran retrocruzas hacia *B. nitida*. Cuatro individuos en Santiago Nopala y tres en Xocomanatlan, así como cuatro en San Martín Atexcal, se habían considerado como híbridos, pero el índice mostró que eran individuos de *B. nitida* y de *B. dulcis* respectivamente.

Los análisis de regresión mostraron una relación positiva y significativa entre los rasgos morfológicos y marcadores moleculares para Xochipala ($r = 0.33$, $P < 0.05$),

Santiago Nopala ($r = 0.48$, $P < 0.05$), Xocomanatlan ($r = 0.55$, $P < 0.05$), y San Martín Atexcal ($r = 0.57$, $P < 0.05$).

El análisis de agrupamiento para los datos morfológicos y genéticos (RAPD) muestra que éstos son muy similares. Las zonas alopátridas (dos zonas para *B. dulcis* y dos para *B. nitida*) se encuentra en los bordes, mientras que las cuatro zonas híbridas se encuentran agrupadas entre ellas (Fig. 4). En particular, Santiago Nopala, San Martín Atexcal y Xocomanatlan presentaron una mayor similitud a *B. nitida*, mientras Xochipala se presentaron más similares a *B. dulcis*.

La prueba de Mantel (Z) mostró que no existe correlación entre las distancias geográficas y las distancias genéticas para ninguna de las especies (*B. dulcis*, $r = 0.36$, $P > 0.05$, y *B. nitida*, $r = 0.32$, $P > 0.05$). Las distancias genéticas entre las poblaciones variaron de 0.024 a 0.16.

Discusión

Es común que especies de palmas presenten patrones complejos de variación, que lleguen a generar problemas en la diferenciación taxonómica de las especies (Uhl y Dransfield 1987; Quero 1989). La hibridación interespecífica y los polimorfismos ancestrales compartidos, son las dos explicaciones más comunes para el patrón de variación observada (Jensen et al. 1993; Kleinschmit et al. 1995; Bruschi et al. 2000; Tovar-Sánchez y Oyama 2004). *B. dulcis* y *B. nitida* forman híbridos, pero morfológicamente siguen siendo distintos en su distribución alopátrida y simpátrida, excepto en una (Xochipala) de las cuatro zonas simpátridas en donde no fue posible identificar individuos genéticamente puros de *B. nitida*. Todos los caracteres micro y macro-morfológicos foliares examinados en estas especies difieren significativamente por localidad y por especies. Son relativamente pocos los marcadores molecular diagnóstico y especie-específicos que diferenciaron entre *B.*

dulcis y *B. nitida*. Sin embargo, estos marcadores mostraron consistencia geográfica apoyando las evidencias morfológicas, lo que indica que cada especie es distinta y que cada una tiene un cierto grado de cohesión genética.

Además, el procedimiento de conteo de caracteres, ha permitido confirmar estadísticamente que los individuos con morfología foliar atípica son el resultado de la hibridación entre *B. dulcis* y *B. nitida* en las cuatro zonas híbridas. Por lo tanto, la caracterización fenotípica mostró que los árboles híbridos del complejo *B. dulcis* × *B. nitida* son un mosaico de fenotipos intermedios, transgresivos, o parecidos al de los padres. La proporción de caracteres transgresivos reportados en este estudio (10.0%), así como la proporción de caracteres híbridos parecidos a los padres (46.4%) y la proporción de caracteres intermedios (33.2%), se ajustan a los valores reportados por Rieseberg y Ellstrand (1993), que documentaron valores de 16.0%, 48.7% y 35.3% respectivamente.

Estos patrones fenotípicos pueden sugerir que el taxa híbrido tiene la capacidad de colonizar un hábitat diferente al de las especies parentales putativas. En otras palabras, la nueva combinación de caracteres parentales puede facilitar a los híbridos la colonización de ambientes intermedios, nuevos o extremos, o que la divergencia hábitat ha evolucionado gradualmente a través de la fijación de mutaciones favorables. Por lo tanto, la nueva condición fenotípica de los híbridos putativos entre *B. dulcis* × *B. nitida* puede proporcionar la materia prima para la adaptación a un nuevo hábitat y para una posible divergencia nicho (Strauss 1994; Fritz et al. 1999; Rieseberg et al. 1999; Orians 2000; Rieseberg y Willis 2007).

La variación de las características fenotípicas de los individuos de las zonas simpátridas, podría ser visto como un proceso dinámico del flujo diferencial de genes entre individuos del complejo *B. dulcis* × *B. nitida* y las condiciones ambientales particulares de cada localidad. Esta última afirmación se apoya en el análisis de componentes principales,

que mostraron que entre las zonas simpátridas existe un complejo conjunto de individuos intermedios y transgresivos.

Los resultados genéticos indican que el proceso de introgresión está presente en ambas especies, pero la dirección de la introgresión depende de las características del hábitat (mésico o xérico) de las zonas híbridas. Las zonas híbridas más cercanas al hábitat mésico (Santiago Nopala, San Martín Atexcal y Xocomanatlan) registró introgresión unidireccional hacia *B. nitida*, mientras que los híbridos establecidos en hábitat más xérico (Xochipala) registró introgresión unidireccional hacia *B. dulcis*. Estos hallazgos sugieren que la proximidad de los híbridos a un sitio alopátrido de cualquiera de las especies parentales (*B. nitida*, hábitat mésico; *B. dulcis*, hábitat xérico) está directamente relacionado con su similaridad y viceversa. Este último escenario es apoyado por el estudio de Tovar-Sánchez y Oyama (2004) en el complejo *Quercus crassipes* × *Q. crassifolia* en México.

Los niveles de conservación de las zonas simpátridas mostraron el siguiente patrón: Xocomantlan > San Martín Atexcal = Santiago Nopala > Xochipala. Un patrón similar se registró con la abundancia de los árboles híbridos e introgresos, que muestra una relación entre el grado de perturbación y la abundancia de los individuos híbridos y las retrocruzas (Arnold et al. 1990; Klier et al. 1991). La zona de hibridación con el más alto nivel de perturbación (Xochipala) fue la que presentó el mayor número de híbridos e individuos introgresos, además de que no se identificaron individuos genéticamente puros de *B. nitida*. Los disturbios producidos por las actividades humanas como la tala, la deforestación, los incendios y la agricultura, pueden incrementar el desarrollo y establecimiento de individuos híbridos, al modificar las condiciones ecológicas originales que a su vez funcionan como barreras reproductivas (Arnold et al. 1990; Klier et al. 1991). En este sentido, el cambio de uso de suelo, pueden promover la interacción de poblaciones de especies antes aisladas

(Tovar-Sánchez y Oyama 2004). Las áreas alteradas que presenten condiciones intermedias, nuevas o extremas a las de las especies parentales, pueden ser escenarios adecuados para ser colonizados por los linajes de origen híbrido, debido a que éstos presentan el mosaico de caracteres fenotípicos (caracteres similar al de los parentales, intermedios o transgresivos).

Este estudio sugiere la necesidad de replantear las estrategias de conservación para *B. nitida* (especies sujeta a protección NOM-059-SEMARNAT-2010), ya que en la población simpátrida de Xochipala no fue posible identificar individuos genéticamente puros de *B. nitida*. En esta población se documentó un continuo genético entre *B. dulcis* e individuos de origen híbrido. Consideramos que es importante desarrollar estrategias apropiadas de conservación en las otras tres zonas simpátridas (Xocomanatlan, Nopala Santiago y San Martín Atexcal), debido a que especies parentales putativas (especies nativas en México) presentan algún grado de cohesión genética. Además, la hibridación unidireccional hacia una especie parental (*B. nitida*) produce un continuo de genotipos híbridos con una especie parental, por lo tanto, es probable que la existencia de estos híbridos sea una amenaza para las poblaciones restantes con individuos genéticamente puros de *B. nitida*.

La variación morfológica que se presenta en los individuos de las poblaciones simpátridas, suele generar confusión en cuanto a la identidad taxonómica. En particular, en este estudio la identidad genética de los individuos híbridos de la población de Xochipala basada sólo en morfología foliar no fue la adecuada. Debido a que hay más formas introgresas que individuos morfológicamente puros de *B. nitida*. En este sentido y debido a que en Xochipala existen más individuos introgresos que morfologías puras de *B. nitida*, no será posible eliminar híbridos y las retrocruzas hacia *B. dulcis* con el fin de preservar individuos morfológicamente puros de esta especie. Por lo tanto, puede ser preferible

ajustar nuestro enfoque de conservación en esta zona simpátrida y considerar el valor de esta población en cuanto a la oportunidad que se presenta para la conservación de la diversidad genética de una especie nativa. También, es importante considerar que las zonas híbridas son centros de especiación de plantas y de biodiversidad de diferentes niveles tróficos (Whitham et al. 1999; Bangert et al. 2005; Tovar-Sánchez y Oyama 2006a, 2006b). Por lo que, son espacios particularmente importantes para la conservación de nuestro patrimonio biótico.

Este estudio sugiere que las zonas simpátridas de *B. dulcis* y *B. nitida* muestran una disminución en la población de *B. nitida*, causada por disturbios y la introgresión unidireccional hacia *B. nitida*, favoreciendo la introducción de genes de *B. dulcis*; posiblemente como consecuencia de la pérdida de diversidad genética y la pérdida de poblaciones adaptadas localmente (Rieseberg 1991; Ellstrand y Ellam 1993). La presencia de un mayor número de híbridos fértiles en relación al número de individuos de *B. nitida* son la clave para la asimilación genética de las especies raras (Levin et al. 1996). En este sentido se ha asumido que la adecuación del híbrido y la probabilidad de retrocruzamiento se asocian con abundancia híbrido.

Además, las predicciones indican que el cambio climático global en las próximas décadas promoverá cambios de las regiones méxicas en México, convirtiéndose más xéricas (Villers-Ruiz y Trejo-Vázquez 2000), lo que promoverá la eventual invasión de individuos de *B. dulcis* a estos nuevos hábitats, esto facilitará la ruptura de las barreras reproductivas y se incrementará la probabilidad de más fenómenos de hibridación.

Tablas y Figuras del capítulo

Tabla 1. Nombre de la localidad, Estado, coordenadas geográficas, altitud y tamaño de muestra, de los sitios colectado de *Brahea dulcis* y *B. nitida* en México.

Localidad	Estado	Latitud (N), Longitud (W)	Altitud (m)	Tamaño de muestra
<i>B. dulcis</i>				
Jiutepec	Morelos	18°43' 0'', 99°08'15''	1457	20
San Juan Teocalcingo	Guerrero	18°21'54'', 99°38'45''	1005	20
Zonas mixtas				
Xochipala	Guerrero	17°48' 44'', 99°38'36''	1640	20
San Martín Atexcal	Guerrero	17°33'15'', 99°37'07''	1890	20
<i>B. nitida</i>				
Omiltemi	Guerrero	17°33'10'', 99°39'47''	2150	20
Santa Ana	Puebla	18°35'46'', 99°22'42''	2270	20

Fig. 1. Mapa de ubicación de las poblaciones muestras del complejo *Brahea dulcis* × *Brahea nitida*. Las poblaciones mezcladas (círculos bicolores) representan a: 1, Xochipala; 2, Xocomanatlan; 3, San Martín Atexcal; 4, Santiago Nopala. La 1 y la 2 en el estado de Guerrero, la 3 y 4 al estado de Puebla. Los círculos blancos representan las poblaciones puras de *Brahea dulcis* (en los estado de Morelos y Guerrero). Los círculos negros representan las poblaciones puras de *Brahea nitida* (en los estados de Puebla y Guerrero).

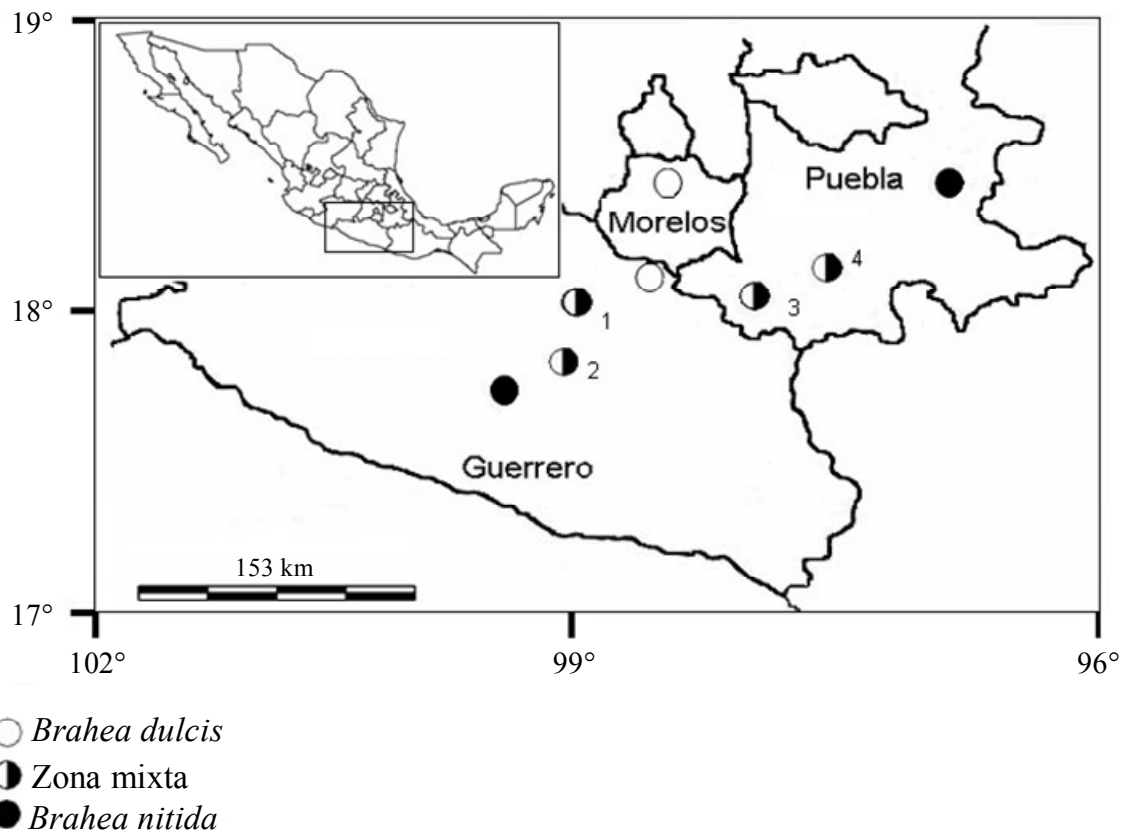


Tabla 2. Lista de los caracteres foliares morfológicos examinados para el complejo *Brahea dulcis* × *Brahea nitida* en México.

Abreviación	Descripción
Caracteres macromorfológicos	
LP	Largo del peciolo
LL	Largo de la lámina
MWL	Longitud máxima de la lámina
LWB	Ancho de la lámina al primer tercio basal
LWA	Ancho de la lámina al primer tercio apical
LCSB	Longitud de la lámina desde la base a la bifurcación del semento central
NS	Número de segmentos
S1P	Espinas con una punta
S2P	Espinas con dos puntas
S3P	Espinas con tres puntas
S4P	Espinas con cuatro puntas
WS1P	Ancho de la espina con un pico
LS1P	Largo de la espina con un pico
WS2P	Ancho de la espina con dos picos
LS2P	Largo de la espina con dos picos
WS3P	Ancho de la espina con tres picos
LS3P	Largo de la espina con tres picos
WS4P	Ancho de la espina con cuatro picos
LS4P	Largo de la espina con cuatro picos
Caracteres micromorfológicos	
Segmento	
ST	Ancho del segmento
MA	Área de la vena media
MH	Alto de la vena media
NVFA	Área de las fibras no vasculares
SD	Densidad estomatal
Vena Media	
ML	Largo de la vena media
META	Área del tejido en expansión de la media vena

Tabla 3. Media \pm la Desviación Estándar de los resultados de los ANOVA anidados (estadísticos de F) de todos los caracteres morfológicos de *Brahea dulcis* y *Brahea nitida* en México.

Caracter	Unidad	<i>B. dulcis</i>	<i>B. nitida</i>	Especie F	Localidad F
Caracteres macromorfológicos					
LP	cm	61.21 \pm 0.80	57.74 \pm 0.74	9.43***	64.97***
LL	cm	80.71 \pm 0.95	77.00 \pm 0.55	12.11**	38.09***
MWL	cm	79.74 \pm 2.73	87.42 \pm 1.31	3.86*	59.25***
LWB	cm	66.88 \pm 1.22	79.58 \pm 1.35	47.45***	191.49***
LWA	cm	65.68 \pm 1.43	70.06 \pm 1.67	5.71***	235.91***
LCSB	cm	37.95 \pm 0.43	40.63 \pm 0.46	17.59***	75.25***
NS	no.	29.19 \pm 0.19	26.41 \pm 0.21	93.24***	47.55***
S1P	no.	5.68 \pm 0.17	0.01 \pm 0.01	1262.71***	54.23***
S2P	no.	2.50 \pm 0.08	0.00 \pm 0.00	1243.61***	36.41***
S3P	no.	0.99 \pm 0.05	0.00 \pm 0.00	478.86***	30.00***
S4P	no.	0.30 \pm 0.03	0.00 \pm 0.00	125.85***	13.70***
WS1P	mm	2.15 \pm 0.04	0.00 \pm 0.00	3377.80***	82.39***
LS1P	mm	2.20 \pm 0.05	0.00 \pm 0.00	1839.89***	67.35***
WS2P	mm	3.01 \pm 0.06	0.00 \pm 0.00	2629.97***	84.40***
LS2P	mm	2.18 \pm 0.10	0.00 \pm 0.00	584.55***	36.30***
WS3P	mm	3.20 \pm 0.13	0.00 \pm 0.00	728.48***	45.18***
LS3P	mm	1.68 \pm 0.07	0.00 \pm 0.00	661.954***	39.44***
WS4P	mm	1.72 \pm 0.15	0.00 \pm 0.00	142.93***	17.56***
LS4P	mm	0.65 \pm 0.06	0.00 \pm 0.00	138.52***	14.87***
Caracteres micromorfológicos					
ST	μ m	27.96 \pm 0.46	31.77 \pm 0.76	16.58***	11.57***
MA	μ m	383.91 \pm 16.20	470.33 \pm 24.99	7.79**	13.35***
MH	μ m	20.91 \pm 0.61	26.19 \pm 0.81	25.74***	11.83***
NVFA	μ m	39.09 \pm 1.09	28.99 \pm 1.07	43.32***	9.08***
SD	no.	97.31 \pm 1.63	107.91 \pm 1.39	19.68***	2.04***
ML	μ m	40.31 \pm 1.60	55.04 \pm 2.09	29.05***	9.86***
META	μ m	699.52 \pm 68.29	1816.49 \pm 125.29	55.35***	10.58***

Tabla 4. Procedimiento de conteo de caracteres (Wilson 1992) y caracterización del fenotipo (Schwarzbach et al. 2001) de las cuatro zonas híbridas del complejo *Brahea dulcis* × *Brahea nitida* en México.

Caracter	<i>B.dulcis</i> media ± SD)	Híbridos (media ± SD)	<i>B.nitida</i> (media ± SD)	El híbrido es intermedio?	Fenotipo híbrido
XOCOMANATLAN					
LP	67.99 ± 1.14	70.13 ± 2.20	55.19 ± 2.40	-	parecido-dulcis
LL	83.40 ± 1.08	78.69 ± 1.42	75.44 ± 1.20	+	parecido-nitida
MWL	96.19 ± 1.41	105.92 ± 2.10	107.15 ± 1.95	+	parecido-nitida
LWB	91.81 ± 1.42	103.22 ± 1.84	104.40 ± 2.16	+	parecido-nitida
LWA	77.69 ± 1.45	85.70 ± 1.30	89.93 ± 1.81	+	parecido-nitida
LCSB	44.88 ± 0.59	44.20 ± 0.91	43.70 ± 0.71	-	n.s.
NS	32.73 ± 0.35	31.83 ± 0.69	27.84 ± 0.55	+	parecido-dulcis
S1P	5.07 ± 0.29	6.30 ± 0.82	0.02 ± 0.02	-	parecido-dulcis
S2P	2.39 ± 0.18	1.57 ± 0.36	0.00 ± 0.00	+	intermedio
S3P	0.61 ± 0.09	0.17 ± 0.07	0.00 ± 0.00	+	parecido-nitida
S4P	0.16 ± 0.04	0.13 ± 0.06	0.00 ± 0.00	+	intermedio
WS1P	2.46 ± 0.08	1.39 ± 0.15	0.00 ± 0.00	+	intermedio
LS1P	2.51 ± 0.14	0.92 ± 0.12	0.00 ± 0.00	+	intermedio
WS2P	3.49 ± 0.14	2.00 ± 0.29	0.00 ± 0.00	+	intermedio
LS2P	2.46 ± 0.12	0.76 ± 0.12	0.00 ± 0.00	+	intermedio
WS3P	4.48 ± 0.30	0.79 ± 0.35	0.00 ± 0.00	+	parecido-nitida
LS3P	2.10 ± 0.15	0.17 ± 0.07	0.00 ± 0.00	+	parecido-nitida
WS4P	2.82 ± 0.42	1.00 ± 0.50	0.00 ± 0.00	+	parecido-nitida
LS4P	0.96 ± 0.14	0.17 ± 0.14	0.00 ± 0.00	+	parecido-nitida
ST	26.04 ± 1.10	27.73 ± 0.88	30.19 ± 0.90	+	parecido-nitida
MA	334.26 ± 48.32	326.78 ± 8.67	285.39 ± 27.02	+	n.s.
MH	26.40 ± 1.10	26.56 ± 0.88	30.19 ± 0.90	+	intermedio
NVFA	37.05 ± 2.60	23.81 ± 1.46	28.73 ± 3.79	-	parecido-nitida
SD	95.08 ± 2.97	110.44 ± 2.78	114.85 ± 3.62	+	parecido-nitida
ML	37.79 ± 3.73	46.47 ± 1.96	53.74 ± 2.56	+	intermedio
META	892.66 ± 58.96	1142.39 ± 59.60	1285.53 ± 74.41	+	intermedio
Conteo de caracteres intermedios				22:04	
SANTIAGO NOPALA					
LP	39.34 ± 1.33	40.45 ± 0.85	41.98 ± 1.55	+	intermedio
LL	65.54 ± 0.74	71.92 ± 1.04	66.05 ± 1.05	-	pos. transgresivo
MWL	57.03 ± 1.81	64.20 ± 2.08	61.42 ± 1.42	-	nitida-like
LWB	52.74 ± 1.67	58.45 ± 2.10	54.43 ± 1.76	+	pos. transgresivo
LWA	47.18 ± 1.85	50.32 ± 1.55	51.16 ± 1.47	+	parecido-nitida
LCSB	28.96 ± 0.95	32.98 ± 0.86	30.71 ± 0.65	-	parecido-nitida
NS	27.00 ± 0.51	26.73 ± 0.53	24.09 ± 0.67	+	parecido-dulcis
S1P	7.82 ± 0.51	7.67 ± 0.79	0.00 ± 0.00	+	intermedio
S2P	2.82 ± 0.27	0.83 ± 0.18	0.00 ± 0.00	+	intermedio
S3P	0.53 ± 0.11	0.17 ± 0.07	0.00 ± 0.00	+	parecido-nitida
S4P	0.12 ± 0.06	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	-	parecido-nitida
WS1P	1.69 ± 0.10	0.63 ± 0.09	0.00 ± 0.00	+	intermedio
LS1P	1.65 ± 0.09	0.48 ± 0.08	0.00 ± 0.00	+	intermedio
WS2P	2.33 ± 0.19	0.48 ± 0.11	0.00 ± 0.00	+	intermedio
LS2P	1.56 ± 0.13	0.23 ± 0.06	0.00 ± 0.00	+	intermedio
WS3P	1.62 ± 0.32	0.32 ± 0.12	0.00 ± 0.00	+	parecido-nitida
LS3P	0.82 ± 0.18	0.15 ± 0.06	0.00 ± 0.00	+	parecido-nitida
WS4P	0.40 ± 0.23	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	-	parecido-nitida
LS4P	0.15 ± 0.08	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	-	parecido-nitida
ST	30.09 ± 1.33	35.72 ± 3.53	38.53 ± 0.40	+	intermedio
MA	333.81 ± 16.80	473.15 ± 60.53	607.96 ± 46.50	+	intermedio
MH	21.18 ± 0.73	26.22 ± 2.13	31.25 ± 1.06	+	intermedio
NVFA	40.50 ± 1.59	35.91 ± 1.96	32.89 ± 1.73	+	intermedio
SD	88.05 ± 0.5	89.93 ± 4.24	104 ± 0.81	+	parecido-dulcis
ML	48.74 ± 3.73	51.97 ± 5.47	65.91 ± 3.66	+	intermediate
META	424.34 ± 132.34	1188.10 ± 331.16	2282.12 ± 318.014	+	parecido-dulcis
Conteo de caracteres intermedios				20:06	

Tabla 4. Continuación

Caracter	<i>B.dulcis</i> media ± SD)	Híbridos (media ± SD)	<i>B.nitida</i> (media ± SD)	El híbrido es intermedio?	Fenotipo híbrido
SAN MARTÍN ATEXCAL					
LP	45.51 ± 1.46	58.14 ± 2.70	50.28 ± 1.58	-	pos. transgresivo
LL	68.29 ± 1.08	76.33 ± 1.85	77.33 ± 1.56	+	parecido-nitida
MWL	33.41 ± 1.80	57.26 ± 2.13	57.26 ± 2.35	-	parecido-nitida
LWB	26.21 ± 1.47	50.22 ± 2.07	46.08 ± 2.36	-	parecido-nitida
LWA	27.78 ± 1.45	44.64 ± 1.78	42.41 ± 2.12	-	parecido-nitida
LCSB	30.59 ± 0.92	33.55 ± 1.50	32.85 ± 0.88	-	n.s.
NS	26.91 ± 0.71	27.24 ± 0.64	25.03 ± 0.38	-	parecido-dulcis
S1P	7.15 ± 0.53	6.63 ± 0.79	0.48 ± 0.19	+	parecido-nitida
S2P	3.11 ± 0.28	0.33 ± 0.10	0.24 ± 0.11	+	parecido-nitida
S3P	0.83 ± 0.18	0.00 ± 0.00	0.10 ± 0.05	-	parecido-nitida
S4P	0.03 ± 0.02	0.00 ± 0.00	0.03 ± 0.02	-	n.s.
WS1P	2.14 ± 0.09	0.87 ± 0.08	0.14 ± 0.06	+	intermedio
LS1P	2.07 ± 0.09	0.60 ± 0.06	0.14 ± 0.06	+	intermedio
WS2P	2.78 ± 0.18	0.43 ± 0.12	0.20 ± 0.08	+	parecido-nitida
LS2P	2.02 ± 0.13	0.19 ± 0.06	0.14 ± 0.06	+	parecido-nitida
WS3P	2.15 ± 0.40	0.00 ± 0.00	0.22 ± 0.10	-	parecido-nitida
LS3P	1.01 ± 0.19	0.00 ± 0.00	0.09 ± 0.04	-	parecido-nitida
WS4P	0.15 ± 0.14	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.05	-	n.s.
LS4P	0.15 ± 0.14	0.00 ± 0.00	0.06 ± 0.05	-	n.s.
ST	27.63 ± 1.09	33.26 ± 2.33	34.98 ± 1.18	+	intermedio
MA	244.95 ± 9.87	474.61 ± 64.81	465.14 ± 33.93	-	parecido-nitida
MH	20.84 ± 1.00	26.26 ± 2.33	27.92 ± 1.62	+	n.s.
NVFA	36.00 ± 2.81	30.78 ± 2.79	35.22 ± 3.10	-	n.s.
SD	91.48 ± 2.47	108.44 ± 3.18	109.46 ± 2.40	+	parecido-nitida
ML	51.87 ± 6.51	49.30 ± 2.77	52.15 ± 3.17	-	n.s.
META	435.38 ± 76.01	1350.76 ± 298.91	1454.82 ± 226.39	+	parecido-nitida
Conteo de caracteres intermedios				11:15	
XOCHIPALA					
LP	56.13 ± 1.65	59.71 ± 1.70	59.88 ± 1.75	+	intermedio
LL	69.89 ± 0.79	74.59 ± 2.22	76.68 ± 1.17	+	parecido-nitida
MWL	61.38 ± 1.34	78.90 ± 3.99	87.08 ± 2.78	+	parecido-nitida
LWB	55.18 ± 1.41	70.58 ± 3.52	80.80 ± 2.81	+	intermedio
LWA	51.47 ± 1.21	67.83 ± 3.43	68.13 ± 2.31	+	parecido-nitida
LCSB	36.19 ± 0.87	44.97 ± 2.80	38.95 ± 0.98	-	pos. transgresivo
NS	27.17 ± 0.39	27.67 ± 0.54	26.39 ± 0.41	-	n.s.
S1P	5.48 ± 0.45	7.67 ± 0.71	0.00 ± 0.00	-	pos. transgresivo
S2P	2.75 ± 0.16	1.40 ± 0.28	0.00 ± 0.00	+	intermedio
S3P	1.05 ± 0.13	0.63 ± 0.15	0.00 ± 0.00	+	intermedio
S4P	0.32 ± 0.07	0.17 ± 0.07	0.00 ± 0.00	+	intermedio
WS1P	2.17 ± 0.12	1.29 ± 0.13	0.00 ± 0.00	+	intermedio
LS1P	2.11 ± 0.10	1.30 ± 0.12	0.00 ± 0.00	+	intermedio
WS2P	2.83 ± 0.13	1.24 ± 0.20	0.00 ± 0.00	+	intermedio
LS2P	1.90 ± 0.11	1.07 ± 0.18	0.00 ± 0.00	+	intermedio
WS3P	3.40 ± 0.29	1.61 ± 0.34	0.00 ± 0.00	+	intermedio
LS3P	2.14 ± 0.18	0.74 ± 0.17	0.00 ± 0.00	+	intermedio
WS4P	2.58 ± 0.42	1.00 ± 0.39	0.00 ± 0.00	+	parecido-nitida
LS4P	1.08 ± 0.18	0.36 ± 0.15	0.00 ± 0.00	+	parecido-nitida
ST	24.98 ± 0.89	24.00 ± 0.59	24.98 ± 0.97	-	n.s.
MA	303.60 ± 17.57	261.93 ± 33.39	284.39 ± 22.57	-	n.s.
MH	17.23 ± 0.82	18.59 ± 0.66	18.59 ± 0.80	-	n.s.
NVFA	45.38 ± 2.29	28.29 ± 2.13	24.34 ± 1.45	+	parecido-nitida
SD	88.95 ± 4.47	118.27 ± 4.42	112.38 ± 2.45	-	parecido-nitida
ML	35.30 ± 3.92	38.97 ± 3.47	36.79 ± 6.75	-	n.s.
META	383.29 ± 128.66	576.67 ± 155.59	1146.27 ± 277.92	+	parecido-nitida
Conteo de caracteres intermedios				18:08	

Fig. 2. Análisis de componentes principales de las variaciones de los caracteres micromorfológicos y macromorfológicos del complejo *Brahea dulcis* × *Brahea nitida* (26 caracteres medidos) en cuatro zonas simpátricas en México. Las plantas fueron identificados mediante el uso de marcadores genéticos y fueron definidas como híbridos los que están marcados con un círculo negro ●, como *Brahea dulcis* los marcados con un círculo blanco ○, y como *Brahea nitida* los marcados con un cuadrado □.

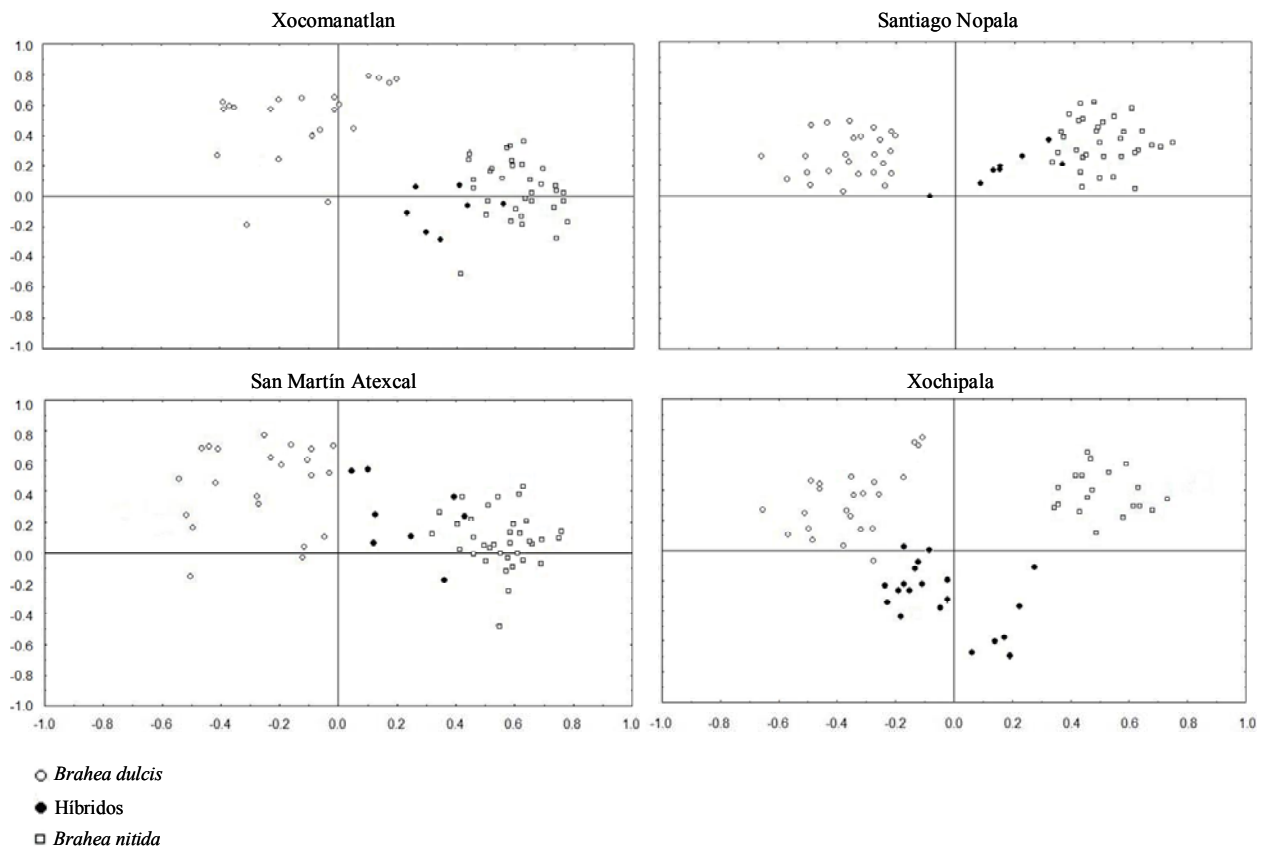


Fig. 3. Distribución de frecuencias de los individuos con al índice híbrido de Hardig, a partir de los datos de las bandas de ADN polimórficos amplificados al azar con cuatro cebadores s. La figura muestra los agrupamientos de los parentales puros o casi puros en cuatro zonas (índice = 0 ó 1), un grupo de híbridos F1 probables (índice = 0.437-0.562), retrocruzas probables hacia *Brahea dulcis* (índice = 0.687-0.750), y finalmente retrocruzas probables hacia *Brahea nitida* (índice = 0.250 a 0.312).

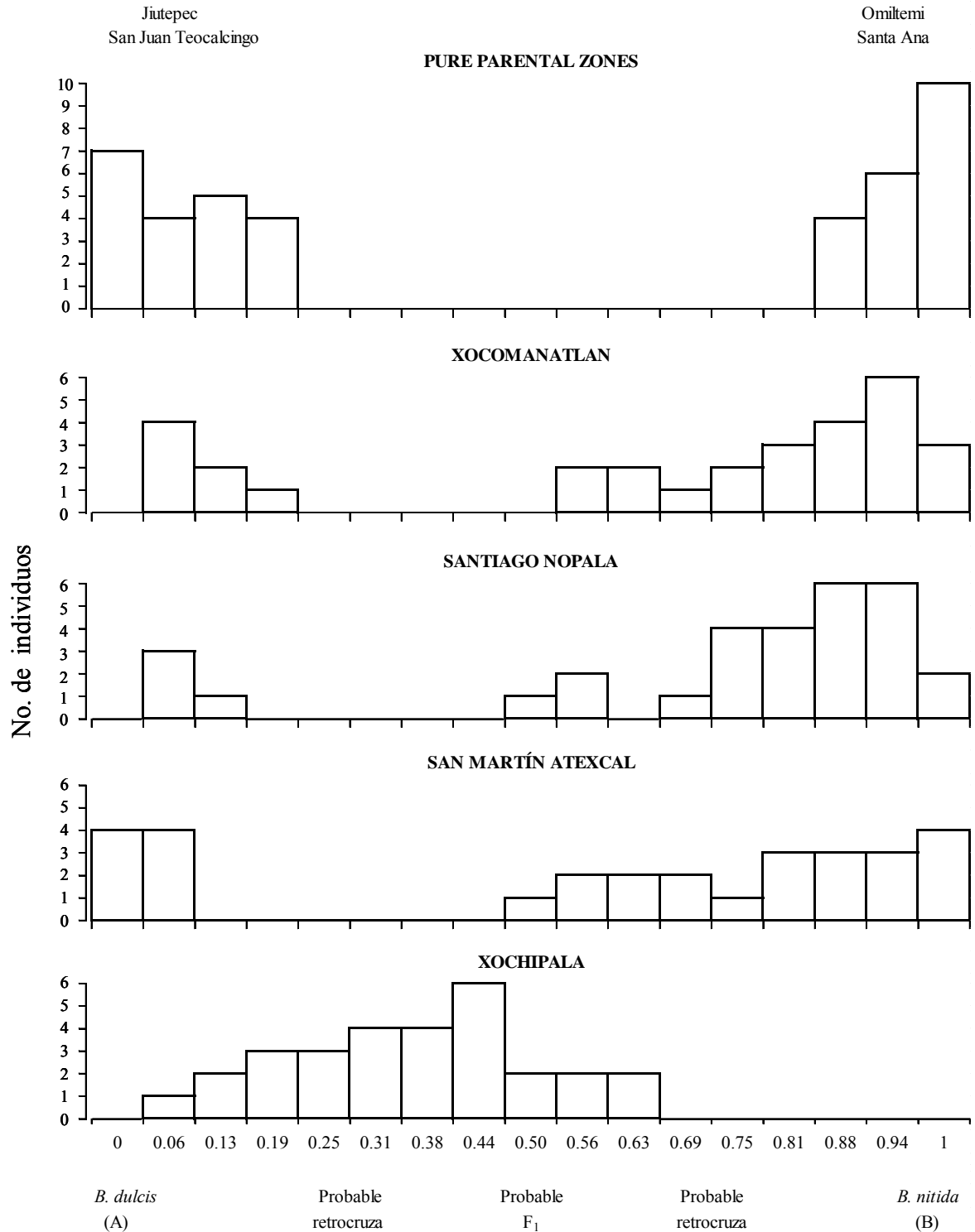
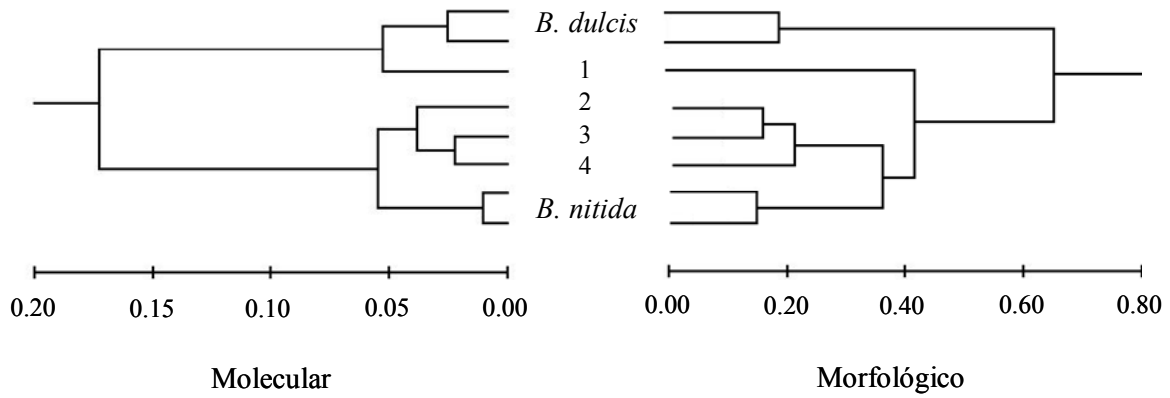


Fig. 4. Fenograma de similitud basado en la morfología de las hojas y el los datos de las bandas de ADN polimórfico amplificado al azar de las cuatro zonas híbridas del complejo *Brahea dulcis* y *Brahea nitida* en México. Las poblaciones mezcladas están representadas de la siguiente manera: 1, Xochipala; 2, Santiago Nopala; 3, Xocomanatlan; 4, San Martín Atexcal.



CAPÍTULO III

El manejo de la palma Mexicana *Brahea dulcis* y su relación con la hibridación su estructura genética y clonal

Nota: Ver anexo de la tesis donde se muestra este capítulo como artículo ya publicado.

Resumen

Las comunidades rurales comúnmente manejan especies nativas promoviendo cambios en la diversidad de la biota natural. En México, la palma *Brahea dulcis* (Kunth) C. Martius es un recurso manejado de forma tradicional por la comunidad rural Nahua de Huitziltepec, Eduardo Neri, Guerrero. Esta palma se usa para artesanías tradicionales. El corte continuo de las hojas ha promovido un cambio fisonómico en las poblaciones de palmas, una alta intensidad de corte promueve plantas de aspecto bajo, mientras que una baja intensidad de corte promueve palmas más altas, pero más bajas que las palmas sin manejo. En este estudio se evaluó cómo los diferentes regímenes de manejo (cosecha de hojas) de esta palma por la comunidad rural de Nahuas, está relacionada con la hibridación, estructura genética y clonal usando AND Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD). Este estudio se realizó en seis sitios con diferente régimen de manejo (dos sitios por régimen: palmas con alta y baja intensidad de corte, y palmas sin manejo). La densidad de palmas fue mayor en los regimenes de alta intensidad de corte y menor en las poblaciones sin corte. Un análisis de autocorrelación a nivel de ramet mostró una distribución agregada a distancias cortas en los genotipos relacionados y una distribución especial aleatoria a distancias mayores. Además, a nivel de genet el análisis de autocorrelación mostró una distribución aleatoria. La diversidad clonal fue alta en ambos regimenes de manejo (alta intensidad: $D = 0.96$, $G/N = 0.60$; baja intensidad: $D = 0.98$, $G/N = 0.77$) en comparación con las poblaciones sin manejo ($D = 0.99$, $G/N = 0.88$). La heterocigosis esperada se incrementa con la intensidad de corte: alta intensidad de corte (0.37) > baja intensidad de corte (0.25) > sin manejo (0.14). Por su parte, la diferenciación genética entre las poblaciones mostró un patrón inverso: sin manejo ($\Phi = 0.26$) > baja intensidad de corte ($\Phi = 0.19$) > alta intensidad de corte ($\Phi = 0.13$). La mayor diferenciación se observó en los regímenes de corte ($\Phi_{st| covariables} = 0.4802$), seguido por la población ($\Phi_{st| covariables} = 0.2453$) y la

localización geográfica (Φ_{st} covariables) = 0.1378). Se evidenció la presencia de individuos híbridos entre *B. dulcis* y *B. nitida* así como un patrón de flujo génico unidireccional hacia *B. dulcis* sólo en las poblaciones manejadas. El manejo tradicional de *B. dulcis* está basado en el conocimiento empírico de la comunidad Nahuas, el cual promueven altos niveles de diversidad genética y clonal así como eventos esporádicos de hibridación, probablemente debido a la reproducción sexual exitosa, que permite el flujo génico entre las poblaciones.

Palabras clave: Palma, propagación clonal, hibridación, variación genética, manejo tradicional.

Introducción

Ha sido ampliamente documentado el manejo de especies vegetales por pueblos indígenas (Casas et al. 2006; Martínez-Castillo et al. 2006; Casas y Parra 2007; Martínez-Ballesté et al. 2008), los cuales habitan y manejan las áreas con mayor biodiversidad de la Tierra (Brush y Stabinsky 1996; Toledo et al. 1993) y comúnmente manejan el entorno local de una manera que mantienen o modifica la diversidad de la biota natural (Haverkort y Millar 1994; Brush 2004; Casas et al. 2006).

Desde una perspectiva ecológica (Balslev 2011; Montúfar et al. 2011) y socioeconómica (Macía et al. 2011; Brokamp et al. 2011) la familia Arecaceae contiene numerosas especies clave en muchas regiones tropicales del mundo. Las palmas son uno de los productos forestales no maderables más importantes y muchas de sus especies son utilizadas y comercializadas en las regiones Neotropicales (Balick 1988; McKean 2003; Khan y Arana 2008). Más aún, en Américas las palmas suelen ser tan abundantes que conforman hasta el 72% de la cubierta forestal a nivel local (Montúfar et al. 2011).

También son relativamente diversas al estar conformadas por 730 especies contenidas en 65 géneros (Dransfield et al. 2008).

En México, esta familia incluye 100 especies agrupadas en 20 géneros (Quero y Yáñez 2000). Además las palmas son un grupo de plantas de una gran importancia cultural, ya que su manejo se ha mantenido durante más de 3000 años (Rzedowski 1983; Ugent 2000; Caballero et al. 2001; Martínez et al. 2002), principalmente por los grupos étnicos (e.g., mayas, mixtecos, nahuas, otomíes, tarahumaras y zapotecos). Por lo que, comprender la tecnología y el manejo ecosistémico que hacen las comunidades rurales puede contribuir al desarrollo de estrategias de conservación.

Particularmente, el género *Brahea* contiene entre 10 (Dransfield et al. 2008) y 13 especies (Quero y Yáñez 2000). *Brahea dulcis* (Kunth) C. Martius tiene una amplia variedad de usos, destacando su valor para la elaboración de artesanías, utensilios de uso doméstico y artículos religiosos (Pavón et al. 2006). En particular, en el estado de Guerrero las hojas de *B. dulcis* han sido tradicionalmente cosechadas por la comunidad rural Nahuas de Huitziltepec, municipio de Eduardo Neri (Illsley et al. 2001). El manejo tradicional ha promovido la formación de dos tipos de palmares entre las poblaciones de Palmas: a) Palmas donde las hojas jóvenes y las vainas son constantemente extraídas (corte de alta intensidad); inhibiendo el desarrollo del tronco y promoviendo individuos de baja altura con hojas pequeñas. En este tipo de manejo, la extracción de hojas es constante y promueve un incremento en la producción de follaje. Además, la tumba y quema es una actividad recurrente en este tipo de manejo. Estos palmares se caracterizan por una reproducción asexual y presentan un gran número de ramets (Illsley et al. 2001; Blancas 2001; Pavón et al. 2006). b) Las hojas maduras de las palmas son utilizadas principalmente para techos. En estos palmares la extracción de hojas es menos intensa, lo que promueve una forma de crecimiento arbórea. La práctica de tumba y quema sólo se realiza de manera

esporádica (quema una vez al año). Esta práctica de manejo promueve la reproducción sexual (Blancas 2001; Illsley et al. 2001).

Para el establecimiento de zonas de manejo de *B. dulcis* es recurrente la práctica de tumba y quema (Aguilar 1998; Blancas 2001; Illsley et al. 2001; Pavón et al. 2006; Casas y Parra 2007), lo que ha reducido, la extensión de las poblaciones silvestres vecinas a los palmares manejados (Blancas 2001; Illsley et al. 2001). Estos regimenes de manejo, son un mecanismo importante para el establecimiento de plántulas dentro de sitios establecidos por palmas adultas. Asimismo, se ha sugerido que estos tipos de disturbio favorecen la hibridación (Ellstrand et al. 1996), particularmente, individuos del complejo *B. dulcis* × *B. nitida* (Ramírez-Rodríguez et al. 2011) pueden originarse bajo estas circunstancias.

Aun cuando la producción de semillas puede ser común en especies clonales, el reclutamiento de plántulas es inusual (Eriksson 1989). Por lo que, las especies clonales pueden tener una dispersión reducida de la planta (Mandujano-Sánchez 2007), un proceso que puede generar un decremento en la variabilidad genética de la población (Eckert y Barret 1993; Kimy Chung 1995; Sydesy y Peakall 1998; Holsinger 2000). Sin embargo, varios estudios han documentado que la diversidad genética es frecuentemente alta en poblaciones que son predominantemente clonales (Ellstrand y Roose 1987; Hamrick y Godt 1989; McLellan et al. 1997; Alfonso-Corrado et al. 2004). Probablemente, relacionado con un frecuente reclutamiento de plántulas con nuevos genotipos dentro de parches que promueven una alta diversidad genotípica. Más aún, las proporciones relativas de la progenie producida o reclutada sexual vs. asexual, puede afectar directamente la diversidad genotípica dentro de las poblaciones naturales y entre las especies. Lo anterior, debido a variaciones en los factores ecológicos y/o genéticos que promueven uno u otro mecanismo de reproducción (Eckert 2002). El balance demográfico entre el reclutamiento sexual,

clonal e híbrido parece tener consecuencias importantes para la diversidad y estructura genética de las poblaciones de plantas (Ellstrand y Roose 1987; Eckert y Barrett 1993).

Considerando los altos porcentajes de clonalidad e hibridación entre especies de plantas, se espera que algunos individuos de origen híbridos recurran a la clonalidad para el establecimiento y las eventuales retrocurzas con sus especies parentales putativas, debido a que los mecanismos de reproducción asexual permiten el establecimiento de alta heterocigocidad de los fenotipos híbridos (Grant 1981).

En este estudio, se ha hipotetizado que los diferentes regímenes de cosecha de la hoja de palma, afectarán la hibridación, el grado de propagación clonal, la estructura de la planta así como la estructura y diversidad genética de *B. dulcis*.

Materiales y Métodos

Especie de estudio

Brahea dulcis presenta tallos solitarios erectos de hasta 8 m de altura y 20 cm de diámetro. Tiene un dosel con 10 a 15 hojas. Los pecíolos son 50-70 cm de largo y 1.5-2.5 cm de ancho, con los márgenes armados con dientes de 2-4 mm de largo (Quero 1989; Castillo 1993). La hoja es palmada verde en la parte superior y pálido en la parte inferior, está dividida entre 50 y 80 segmentos de 40-50cm de largo. La inflorescencia es un racimo que excede la longitud de las hojas y se ramifica a partir del primer tercio del raquis. El crecimiento es clonal y la floración se puede presentar en cualquier época del año (Quero y Yáñez, 2000).

En general, las palmas son polinizadas por el viento, además de animales como los escarabajos, abejas, moscas, hormigas y murciélagos (Barfod et al. 2011). En las flores de *B. dulcis* se observó la presencia de insectos pertenecientes al orden Coleoptera, Diptera e Himenóptera. Estos últimos órdenes son polinizadores del género *Licuala* (Barfod et al.

2003), que pertenece al igual que *Brahea*, a la subfamilia Coryphideae (Barfod et al. 2011). *B. dulcis* es una especie que crece en bosques tropicales caducifolios y bosques de encino. Además, es una especie favorecida por las alteraciones de los ecosistemas en donde se desarrolla. Sin embargo, en estos escenarios con condiciones de perturbación, desempeña un papel importante contra la erosión del suelo (Blancas 2001). En los sitios perturbados, se han observado individuos de *B. dulcis* postrados, con muchos brotes y agrupados en colonias. Sin embargo, en las áreas conservadas o sin alteración los individuos crecen erguidos y alcanzan la forma arbórea (Blancas 2001). Esta especie se desarrolla principalmente sobre suelos calcáreos, en altitudes de 600-2500m, pero generalmente se encuentra en elevaciones de más de 800 m s.n.m. (Rzedowski 1983). Presenta una amplia distribución geográfica y se le puede encontrar desde el norte de México hasta Guatemala (Quero 1994). Cuando *B. dulcis* se distribuye en simpatria con *B. nitida*, se han detectado individuos híbridos que muestran hibridación introgresiva unidireccional hacia *B. nitida* (Ramírez-Rodríguez et al. 2011).

Sitios de estudio y muestreo

La comunidad de Huitziltepec se encuentra en el municipio de Eduardo Neri (17 ° 45 'N - 99 ° 29' W), en el estado de Guerrero, México, a una altitud de 1,320 m (INEGI 1994). La gente de Huitziltepec han realizado prácticas tradicionales de manejo de la palma *B. dulcis* desde tiempos precoloniales. Sin embargo, este manejo se intensificó durante la época de la colonia (Mastache et al. 1982; Illsley et al. 2001). En este sitio, se eligieron cuatro poblaciones de *B. dulcis*, dos sitios por régimen de manejo: a) corte de baja intensidad en las palmas y b) corte de alta intensidad en las palmas. Adicionalmente, se seleccionaron dos poblaciones sin manejo de *B. dulcis*, una en Chilpancingo y la otra en Xochipala, estado de Guerrero (Fig. 1). Estos sitio fueron seleccionados debido a que no existen

registros o antecedentes de manejo de *B. dulcis*. Para minimizar la posibilidad de un efecto de la historia geológica así como del ambiente, las localidades seleccionadas presentaron las siguientes características en común: una misma historia geológica (pertenecen a la subprovincia fisiográfica "Cuenca del Balsas-Mezcala" dentro de las provincias florísticas de la Sierra Madre del Sur), clima (cálido-seco), altitud (entre 1305 a 1470 m), y el tipo de vegetación (bosque tropical seco).

Con el fin de analizar la estructura genética de esta especie, en cada localidad (población) se realizó un transecto de 1.5 km y cada 50 m se muestreó al individuo más cercano (30 individuos por localidad). En cada planta se colectó un segmento de lámina foliar que no presentara algún daño aparente (e.g., insectos, bacterias, hongo, etc.). Para estimar la estructura clonal de *B. dulcis* se eligieron tres sitios con diferentes regímenes de manejo (corte de alta intensidad, corte de baja intensidad y palmares sin ningún). Se marcaron parcelas de 10 x 50 m en cada sitio. Se mapearon y registraron todos los ramets dentro de cada parcela. La ubicación exacta se registró a través de la toma de la distancia de cada ramet a los márgenes de la parcela. Con el fin de determinar la distribución espacial y la extensión de cada clon, se registró la posición de cada individuo seleccionado y se midió la distancia entre ellos.

Las muestras de tejido fueron tomadas durante agosto de 2007. Para su transporte al laboratorio se almacenaron en nitrógeno. Posteriormente, las muestras de tejido fueron almacenadas en un ultracongelador (-80 ° C) antes de la extracción de ADN.

Datos moleculares

El ADN total fue extraído por medio del Mini Kit DNAeasy Plant (Qiagen, Valencia, California, EE.UU.). La concentración de ADN de cada muestra se obtuvo mediante análisis fluorométrico (Eppendorf, Biophotometer, Hamburgo, Alemania) y la

calidad del ADN se calculó comparando la intensidad de las bandas con los estándares conocidos de ADN lambda en un gel de agarosa al 0,8%. Finalmente, se diluyeron todas las muestras de ADN a una concentración final de 10 ng/ml. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en una mezcla de 25-ml conformada por 10 ng de ADN base, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9, 0.1% de Triton X-100, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM de cada dNTP, 0.2 mM de un primer 10-mero, y una unidad de Taq polimerasa (Gibco / Invitrogen, San Diego, California, EE.UU.). El programa del termociclador se llevó a cabo en un modelo Mastercycler Eppendorf AG (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). El programa consistió en 45 ciclos, cada uno de 94 °C durante 1 min, alineación a 36 °C durante 1 min y extensión a 72 °C durante 2 min. Se incluyó una extensión final a 72 °C durante 15 min. Los fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en geles de agarosa a 1.5%, se tiñeron con bromuro de etidio, y se revelaron en una cámara UV. El tamaño de los fragmentos de ADN se estimaron con ADN kb ladder de 1-kilo bases de ADN (kb).

El análisis genético se realizó utilizando RAPD (Welsh y McClelland 1990; Williams et al. 1990) y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se probaron cuarenta cebadores de 10-pares de bases de secuencia aleatoria (Kits A, B, C, D, R, S, T; Operon Technologies, Alameda, California, EE.UU.) para determinar patrones de amplificación reproducibles utilizando muestras de ADN de prueba de seis diferentes poblaciones de *B. dulcis*. Para el análisis de datos se seleccionaron cinco cebadores informativos y reproducibles (A02, A03, B01, C08 y C09). Se seleccionaron sólo bandas polimórficas y nítidas. Cada banda de RAPDs se anotó como presente (1) o ausente (0) para construir la matriz de datos. Por último, utilizando cuatro cebadores (A01, A02, A04, B04 y) (Ramírez-Rodríguez et al. 2011), se pusieron a prueba 180 individuos para determinar la hibridación entre *B. dulcis* y *B. nitida* (seis marcadores diagnósticos y dos marcadores

especies-específicas). Los marcadores diagnósticos son aquellos que están presentes en todos los individuos de una especie y ausente en una segunda especie, mientras que los marcadores especies-específicos son aquellos únicos para una especie, pero que no necesariamente están presentes en todos los individuos dentro de la segunda especie (Howard et al. 1997).

Análisis de datos

Variación genética

Con el fin de determinar la estructura genética de las poblaciones manejadas y no manejadas de *B. dulcis*, fueron evaluados un total de 37 loci derivados de cinco cebadores. Mediante el uso de herramientas estadísticas para el análisis de genética de poblaciones (TFPGA) Software v.1.3 (Miller 1997), se obtuvieron los siguientes parámetros de variación: porcentaje de loci polimórficos (P) y la heterocigosidad esperada (He). Estos análisis se llevaron a cabo con muestras de 30 individuos de cada población.

Se realizó un análisis Kruskal-Wallis de la varianza con el fin de detectar si existe un efecto de los regímenes de manejo (de alta intensidad de corte, baja intensidad corte y palmares sin manejado) sobre la diversidad genética (He). Posteriormente, se utilizó una prueba de comparación múltiple de Tukey (P), para determinar las diferencias significativas entre los regímenes de manejo; particularmente, se analizó si la población no manejada difería significativamente con cada régimen de manejo (Zar 2010).

Estructura Genética

El nivel de diferenciación genética entre la población se obtuvo con el estimador Φ , utilizando el análisis de varianza molecular (AMOVA) (Excoffier et al. 1992). Además, el AMOVA se utiliza para describir cómo la variabilidad genética se repartió entre y dentro de

las poblaciones. Todos los análisis de varianza molecular se realizaron con WINAMOVA v.1.55 (Excoffier 1993). WINAMOVA genera Φ_{st} , un parámetro análogo al F_{ST} de Wright, y por lo tanto, facilita la comparación de los resultados con los de otros estudios. Bajo los supuestos del modelo de isla de Wright, la estimación del número de migrantes (Nm) puede analizarse a partir de un estadístico AMOVA Φ como:

$$Nm = \frac{\left(\frac{1}{\phi_{st}} - 1 \right)}{4\alpha}$$

donde, $\alpha = (n / n - 1) / 2$, n es el número total de las poblaciones, y Φ es el valor promedio de diferenciación genética por loci (Crow y Aoku 1984).

La Heterocigosis (H_T , H_S) fue obtenida con base en las modificaciones de Lynch y Milligan (1994), debido a la sobreestimación que los marcadores RAPD presentan para estos parámetros.

Basándose en los datos de distancia genética e identidad de Nei (1978), se construyó un dendograma para todas las poblaciones utilizando UPGMA (Sneath y Sokal 1973). El análisis Bootstrap se utilizó para probar la solidez del dendograma utilizando 1.000 reasignaciones al azar, para este análisis se utilizó el software POPGENE v.32.

Además, se uso un análisis paso a paso de la varianza molecular (StAMOVA), para evaluar los efectos de las covariables latitud y longitud, el nivel de diferenciación en los regímenes de manejo, y la población sobre la diferenciación genética (Φ_{st} | covariables) (Dyer et al. 2004; Dye 2009). Todos los análisis de StAMOVA se llevaron a cabo en GENETICSTUDIO (Dye 2009).

Diversidad clonal

Se determinó la identidad genética de los individuos muestreados y la estructura clonal espacial en tres sitios con diferentes regímenes de manejo (palmas de alta intensidad de corte, palmas de baja intensidad de corte y palmas sin manejo). La diversidad clonal se estimó de acuerdo a los siguientes parámetros: (a) proporción de genotipos distinguibles, la cual fue medida como G/N , donde G es el número de genets y N es el número total de individuos de la muestra (Ellstrand y Roose 1987), (b) índice de diversidad de Simpson (D) para tamaños de muestra finita (modificado por Pielou 1969), se calculó como:

$$D = 1 - \sum \frac{n_i(n_i - 1)}{n(n - 1)}$$

donde n_i es el número de clones con el genotipo i , n es el tamaño de la muestra y el índice de diversidad de Simpson toma valores de $0 < D < 1$, cuando los clones tienen el mismo o un único genotipo respectivamente.

Se realizó un análisis de autocorrelación espacial a nivel de ramet y de genet, basado en la similitud/disimilitud de los patrones de bandas de RAPD, utilizando el índice de distancia de Tanimoto (D_G) (Deichsel y Trampisch 1985). Para el análisis de autocorrelación a nivel de clones se incluyeron todos los individuos de la muestra; mientras que a nivel Genet se incluyeron sólo los genets. Para probar desviaciones significativas de una distribución espacial aleatoria del valor medio de la D_G , se realizó un procedimiento de permutación de Monte Carlo con intervalos de confianza del 99%. Cada permutación consistía en una redistribución al azar de cada perfil de RAPD sobre las coordenadas espaciales de la muestra de los individuos. Utilizando el Software SGS v.1.0 (Degen et al. 2001), para producir un correlograma, se trazaron los coeficientes espaciales en 10 clases de distancia.

Hibridación

Se calculó el índice de hibridación de Hardig utilizando los datos obtenidos por los RAPDs, mediante el uso del software Hardig-Hybrid (Hardig et al. 2000). Este índice es útil para identificar individuos intermedios, para mostrar retrocruzas, así como las estructuras de enjambres híbridos.

Además, para evaluar la relación entre los diferentes regímenes de manejo y los eventos de hibridación, los datos de la frecuencia de los híbridos F1 y retrocruzas se clasificaron en tablas de contingencia y las diferencias entre los regímenes de manejo fueron evaluados con una prueba de chi-cuadrada.

Estructura poblacional

Se realizaron análisis de ANCOVA incluyendo la ubicación geográfica como una covariable, para evaluar el efecto de los diferentes regímenes de manejo sobre la altura de las plantas adultas, la densidad de ramets, y el número de ramets por genotipo de *B. dulcis*. Posteriormente, se utilizó una prueba de comparación múltiple de Tukey (*P*) para determinar las diferencias significativas entre los regímenes de manejo, particularmente se analizó si las poblaciones no manejadas diferían significativamente de cada población manejada (Zar 2010).

Resultados

Altura de las plantas

En general, las pruebas de ANCOVA mostraron un efecto significativamente de los regímenes de manejo ($F_{2, 177} = 22.612, P < 0.001$) sobre la altura de las plantas adultas, pero la ubicación geográfica no tuvo un efecto significativo ($F_{2, 177} = 2.043, P > 0.05$) sobre la altura de las plantas adultas. La prueba de comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$)

mostró que los valores promedio (promedio \pm DE) fueron significativamente diferentes entre los regímenes de manejo: no manejadas (7.53 ± 0.25) > de baja intensidad de manejo (6.27 ± 0.18) > de alta intensidad de manejo (1.41 ± 0.15).

Diversidad genética

De las 57 bandas analizadas, 37 (65%) fueron polimórficos. La heterocigocidad esperada mostró el siguiente patrón: alta intensidad de corte ($He = 0,37$) > baja intensidad de corte ($He = 0,25$) > sin manejo ($He = 0.14$) (Tabla 1). Un análisis de varianza de Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas en He estimada entre los regímenes de manejo ($H = 17.62$, $P < 0.001$). Asimismo, una prueba de comparación múltiple de Tukey mostró que estos índices fueron significativamente diferentes uno de otro.

El análisis de varianza molecular (AMOVA) mostró que la mayor parte de la variación de la diversidad genética se encontró dentro de las poblaciones. La diferenciación genética entre poblaciones (Φ) fue la siguiente: sin manejo ($\Phi = 0.26$) > baja intensidad de corte ($\Phi = 0.19$) > alta intensidad de corte ($\Phi = 0.13$). Una proporción significativa de la diversidad genética ($P < 0.0001$) se debió a diferencias entre poblaciones. El número de migrantes por generación (Nm) mostró un patrón inverso: sin manejado (1.42) > baja intensidad de corte (2.01) > alta intensidad de corte (2.54).

Un análisis de agrupamiento utilizando datos genéticos mostró agrupamientos dentro de cada régimen de manejo (Fig. 2). El cluster se conformó por dos grupos, el primer grupo fue formado por las poblaciones no manejadas y las poblaciones con baja intensidad de corte. En particularmente, las poblaciones no manejadas fueron más similares genéticamente entre ellas y, posteriormente, las poblaciones con baja intensidad de corte. El segundo grupo consistió en poblaciones de alta intensidad de corte de hoja palma.

El análisis StAMOVA mostró una interacción significativa entre latitud \times longitud, cuando se analizaron los diferentes niveles de regímenes de manejo y las poblaciones. Los diferentes regímenes de manejo mostraron la mayor cantidad de diferenciación ($\Phi_{st|covariables} = 0.4802$), seguido por la población ($\Phi_{st|covariables} = 0.2453$) y la ubicación geográfica ($\Phi_{st|covariables} = 0.1378$).

Estructura clonal espacial

La distribución espacial de los clones de *B. dulcis* muestra que los ramets crecen cerca uno del otro. La distancia máxima entre pares de ramets con el mismo genotipo era de 14 m. En general, la prueba de ANCOVA mostró un efecto significativo de regímenes de manejo ($F_{2,13} = 5.607$, $P < 0,05$) en la densidad de genets (ind./ha), la ubicación geográfica sin embargo no tuvo un efecto significativo ($F_{2,13} = 1.336$, $P > 0.05$). Una comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$) mostró que estas densidades medias (ind./ha \pm SD) fueron significativamente diferentes entre los regímenes: alta intensidad de corte (1619.80 ± 440.71) $>$ baja intensidad de corte (1010.83 ± 233.77) $>$ sin manejo (277.17 ± 77.04).

Adicionalmente, la prueba de ANCOVA mostró un efecto significativo de los regímenes de manejo ($F_{2,13} = 4.406$, $P < 0.05$) sobre la densidad de ramets (ind./ha), sin embargo, la ubicación geográfica no tuvo un efecto significativo ($F_{2,13} = 2.024$, $P > 0.05$). Una comparación múltiple de Tukey ($P < 0.05$) mostró que las densidades medias fueron diferentes entre ellos: alta intensidad de corte (23360.0 ± 5977.66) $>$ baja intensidad de corte (11020.5 ± 1787.85) = sin manejo (6578 ± 2630.20).

Por último, la prueba de ANCOVA no detectó un efecto significativo de los regímenes de manejo ($F_{2,13} = 0.933$, $P > 0.05$) y la ubicación geográfica ($F_{2,13} = 1.082$, $P > 0.05$) sobre el número de ramets por genotipo (media \pm DE): alta intensidad de manejo (15.63 ± 4.58) = baja intensidad de corte (15.13 ± 2.42) = sin manejo (11.20 ± 5.59).

El correlograma de *B. dulcis* calculado con varias clases de distancia y con intervalos de confianza del 99%, se muestra en la figura 3. A nivel de ramet (a = palmas sin manejo, b = baja intensidad de corte, y c = alta intensidad de corte) una autocorrelación significativa y positiva en las distancias cortas se observó (<11 m), sugiriendo una distribución espacial agregada. Por el contrario, a grandes distancias una autocorrelación negativa fue observada, lo que significa que ramets tienen una distribución espacial aleatoria. También, en el nivel de genet (c = palmas sin manejo, d = baja intensidad de corte, y e = alta intensidad de corte) los análisis de autocorrelación mostraron una distribución aleatoria.

Diversidad clonal

A una amplia escala espacial la diversidad clonal fue alta para *B. dulcis* en todos los regímenes de manejo ($G/N = 1$, $D = 1$), todos los individuos son genéticamente diferentes. Sin embargo, a pequeña escala espacial, algunos individuos presentaron un genotipo idéntico, por lo que la diversidad clonal fue menor (sin manejado: $G/N = 0.88$, $D = 0.99$; baja intensidad de corte: $G/N = 0.77$, $D = 0.98$, y alta intensidad de corte: $G/N = 0.60$, $D = 0.96$). Por lo que, los genotipos entre las poblaciones manejadas consistió de 12% (sin manejo), 23% (baja intensidad de corte) y 40% (alta intensidad de corte) genotipos idénticos.

Hibridación

En general, el índice de hibridación de Hardig no reveló individuos híbridos en las poblaciones sin manejo. Por otro lado, se observaron probables individuos híbridos F1 entre *B. dulcis* y *B. nitida* (índice = 0.437 a 0.562) en los regímenes de bajo intensidad de corte ($n = 1$) y alta intensidad de corte ($n = 1$). Además, en poblaciones con alta intensidad de corte

se consideraron a tres individuos, que contenía 16 ramets, como probables retrocruzas hacia *B. dulcis* (índice = 0.250 a 0.312). En general, la frecuencia relativa de los híbridos y retrocruzas fue diferente entre los regímenes de manejo ($X^2 = 7.22$, $df = 2$, $P < 0.05$).

Discusión

El efecto de los diferentes regímenes de manejo sobre la estructura de la población

La extracción de las hojas de *B. dulcis* tuvo un efecto significativo sobre la fisonomía de la planta. Los sitios con corte de hojas continuo de *B. dulcis* (alta intensidad de corte) presentaron plantas con el menor tamaño y fueron las más abundantes, seguidas por las palmas de baja intensidad de corte y finalmente por las palmas sin manejo. Estos resultados coinciden con las observaciones de las poblaciones palmas defoliadas de esta misma especie en los estados de Guerrero (Illsley et al. 2001) e Hidalgo (Pavón et al. 2006), México. La observación de la reducción de la altura en *B. dulcis* es un fenómeno recurrente en otras especies de palmeras manejadas, como *Livistona rotundifolia* (Lam.) Mart. (O'Brien y Kinnaird 1996), *Sabal* sp. (Caballero et al. 2001), *Chamaedorea radicalis* Mart. (Endress et al. 2004), y *Thrinax radiata* Lodd. ex Schult. & Schult. F. (Calvo-Irabien et al. 2009). Además, Pavón et al. (2006) reportaron que la extracción de hojas de *B. dulcis* promueve la producción de hoja. Por lo tanto, el corte de hojas en esta familia de plantas promueve palmas con baja altura y con alta producción de hojas, esto como un resultado del manejo que hacen los diferentes grupos étnicos.

Los resultados obtenidos mostraron un efecto significativo del régimen de manejo sobre la densidad de palmas. Estos resultados concuerdan con los reportados por Pavón et al. (2006) e Illsley et al. (2001) en palmas de *B. dulcis* en los estado de Guerrero e Hidalgo, México. Se sugiere que el aumento de la densidad de *B. dulcis* es el resultado de la práctica de tala y quema hechas por las comunidades rurales en los sitios de manejo. Esta práctica

genera parches que reducen la competencia de *B. dulcis* con otras especies vegetales, lo que promueve un incremento en el reclutamiento de individuos a través de los mecanismos sexuales o asexuales.

La ubicación geográfica de las poblaciones muestreadas no tuvo un efecto significativo sobre la altura de la palma, ni la densidad de genets y ramets. Estos resultados sugieren, que los criterios de elección de los sitios de muestreo disminuyeron los efectos de factores confundidos como las variables ecológicas. Las variables que comparten las poblaciones muestreadas fueron: historia geológica, clima, altitud, tipo de vegetación y tipo de suelo.

Estructura clonal espacial

En general, independientemente del régimen de manejo de *B. dulcis*, los ramets que comparten el mismo genotipo presentan una distribución espacial agregada, mientras que sólo unos pocos genets se extiende a grandes distancias. La distribución espacial de *B. dulcis* es similar a otras especies de palmas clonales, como: *Geonoma congesta* H. Wendl. ex Spruce (Chazdon 1992), *G. deversa* (Poit.) Kunth (Zuidema y Werger 2000) y *Reinhardtia gracilis* (H. Wendl.) Drude ex Dammer (Mendoza y Franco 1998), donde los ramets de estas especies crecen relativamente cerca de su planta parental.

La clonalidad tiene una fuerte influencia sobre la estructura espacial clonal de *B. dulcis* a distancias menores de <14 m. Las distancias cortas entre ramets dentro de los genets y un análisis de autocorrelación mostró un patrón de distribución agregado.

En cambio, a mayores distancias, *B. dulcis* mostró una distribución espacial aleatoria. Es probable que a distancias limitadas los ramets puedan extenderse y que la disponibilidad de parches de hábitat adecuados puede influir en los patrones de distribución espacial de esta especie. Burke et al. (2000) sugieren que los ramets tienden a agregarse en parches

adecuados, independientemente de si son o no son producidos por el mismo genet. La propagación clonal puede facilitar la captación de recursos en ambientes irregulares (Wijesinghe y Hutchings 1997). Por lo que, la distribución aleatoria de la variación genética que se encuentra a distancias mayores en esta especie es compatible con esta idea.

A nivel de genet hay una estructura aleatoria genética entre los genotipos individuales de *B. dulcis*, en esta especie los genotipos están distribuidas de forma aleatoria en toda la zona. Numerosos estudios con especies perennes han demostrado una distribución aleatoria (Montalvo et al. 1997; Streiff et al. 1998; Chung y Chung 1999; Chung et al. 2002; Alfonso-Corrado et al. 2004). Las especies de palmas son auto-incompatibles y polinizadas por escarabajos, abejas, moscas y murciélagos (Barfod et al. 2011), por lo tanto, es probable que las flores reciban una cantidad suficiente de polen de otras genets. Esto podría explicar la estructura genética al azar que se ha encontrado en las poblaciones de *B. dulcis*.

Aunque las semillas son producidas en grandes cantidades, la propagación vegetativa parece ser el principal modo de reproducción (Richards 1986). Sin embargo, la presencia de relación genética entre genets cercanos y los niveles moderados de diversidad de genets (G/N : 0.60 a 0.88) sugieren un reclutamiento recurrente de semillas de *B. dulcis*. Tomando en cuenta la alta densidad de brotes y la rápida propagación clonal de las plántulas, es extremadamente difícil observar y cuantificar el reclutamiento de plántulas en las poblaciones de *B. dulcis*.

El efecto de los diferentes regímenes de manejo sobre la estructura y diversidad genética de B. dulcis

Los resultados revelaron un efecto significativo del régimen de manejo sobre los niveles de la diversidad genética (H_e) de *B. dulcis*, siendo significativamente menor en los palmares

no manejados, seguidos de baja intensidad de corte y, finalmente, por las palmas de alta intensidad de corte. Estos resultados concuerdan con los reportados por Casas et al. (2006) en poblaciones de *Stenocereus stellatus* (Pfeiff.) Riccob, donde encontró el siguiente patrón de *He*: sin manejo < manejado < cultivado, y con los de Martínez-Castillo et al. (2006) en poblaciones de *Phaseolus lunatus* L. Estos resultados contrastan con los resultados encontrados en las poblaciones de *Polaskia chichipe* (Gosselin, Backeb. (Lucio 2006; Otero-Arnaiz et al. 2005; Ruiz-Durán 2006) y *Escontria chiotilla* (F.A.C. Weber) Rose (Tinoco et al, 2005.), donde las poblaciones silvestres o no manejadas mantienen los más altos niveles de diversidad genética.

El gradiente de diversidad genética encontrado en las poblaciones palmas de *B. dulcis* bajo diferentes regímenes de manejo (sin manejado < baja intensidad de corte < alta intensidad de corte) esta de acuerdo con los resultados obtenidos con la densidad de genet y ramet, así como con la abundancia de híbridos F1 entre *B. dulcis* y *B. nitida* y las probables retrocruzas hacia *B. dulcis*. Por estas razones, se sugiere que un aumento en el número de genotipos y de la diversidad clonal en sitios bajo diferentes regímenes de manejo favorece un aumento de los niveles de diversidad genética, como resultado de:

1) Los disturbios antropocéntricos en los sitios de manejo (por ejemplo, la tumba y quema) que favorecen el reclutamiento de genets, de individuos híbridos y de retrocruzas. La alteración de los hábitats naturales por el hombre, puede promover la hibridación y la disponibilidad de hábitats adecuados para la supervivencia de los híbridos. Por ejemplo, las modificaciones antropocéntricas pueden romper las barreras ecológicas entre *B. dulcis* y *B. nitida* (Ramírez-Rodríguez et al. 2011), y las barreras fenológicas entre *Banksia hookeriana* Meisn. y *B. prionotes* Lindl., estimulando la hibridación (Lamont et al. 2003). Además, Martínez-Castillo et al. (2004) encontraron que las plantas de malezas (*Phaseolus lunatus*)

podrían ser formas híbridas generadas por eventos de flujo de genes entre poblaciones domesticadas y silvestres.

2) El manejo de la palma (defoliación de la hoja) estimula el crecimiento clonal. Velasco (1994); Illsley et al. (2001) y Pavón et al. (2006) documentaron que el manejo tradicional de las poblaciones de *B. dulcis* se limita al corte constante de hojas, lo que promueve un aumento en la densidad de ramets.

3) El reclutamiento frecuente de plántulas con nuevos genotipos dentro de los parches promueven una alta diversidad genética. La evidencia de la alta diversidad clonal sugiere que el reclutamiento sexual es un mecanismo muy importante de la regeneración en las poblaciones manejadas de *B. dulcis*. Las simulaciones por computadora de poblaciones de *Ranunculus repens* L. sugieren que el reclutamiento de plántulas y el mantenimiento de la diversidad clonal, puede ser mantenido por una pequeña tasa constante de reclutamiento de nuevas plántulas en poblaciones establecidas (Watkinson y Powell 1993). Por lo tanto, el manejo tradicional de *B. dulcis* promueve el reclutamiento frecuente de plántulas de diferentes genotipos, cuando se producen condiciones favorables, a este proceso que se le conoce como "ventanas estrechas de oportunidad" (Eriksson y Fröborg 1996).

4) El material genético introducido por hibridación introgresiva excede al que se produce directamente por mutación (Anderson 1949). Por ejemplo, el aumento de la diversidad genética de una población, como resultado de la hibridación introgresiva se ha documentado en *Pinus montezumae* × *P. pseudostrobus* (Delgado y Piñero 2002), *Quercus crassipes* × *Q. crassifolia* (Tovar-Sánchez et al. 2008), y *Populus alba* × *P. tremula* (Castiglione et al. 2010).

Se ha documentado que las poblaciones de *B. dulcis* bajo diferentes regímenes de manejo, donde la quema controlada es una práctica común y constante, se promueve el crecimiento vegetativo así como el establecimiento de genets (Casas et al. 1994; Velasco

1994; Illsley et al. 2001). Por lo tanto, si una o pocas plántulas se establecen con éxito, entonces estos nuevos genotipos introducidos en la población aumentarán significativamente la diversidad genotípica (Pappert et al. 2000).

Los altos niveles de variación de las poblaciones manipuladas podría deberse en parte a la presencia de altos niveles de flujo de genes entre toda la población, favorecida por la intervención de los escarabajos, abejas, moscas y murciélagos en la polinización (Barfod et al. 2011), así como por la dispersión de semillas por coyotes, zorros, murciélagos, y los seres humanos (Romero-Morales 2004). La alta diversidad encontrada en las poblaciones manejadas de *B. dulcis* al parecer también puede ser originada por la práctica común de tala y quema. Esto implica una continua introducción y sustitución de plantas (Illsley et al. 2001). Por lo tanto, la diversidad genética de *B. dulcis* puede mantenerse y aún más mejorarse con las prácticas de manejo tradicional.

Aunque el nivel de diferenciación genética entre las poblaciones de *B. dulcis* (sin manejado, $\Phi = 0.26$; baja intensidad de corte, $\Phi = 0.19$; alta intensidad de corte, $\Phi = 0.13$), fue similar a la media reportada por Petit et al. (2005) para 77 especies de angiospermas (media de 0.184). En general, se encontró que las poblaciones de *B. dulcis* bajo regímenes de manejo, presentaron niveles significativos de variación genética dentro de las poblaciones en comparación con las no manejados, mientras que la diferenciación sustancial se observó entre las poblaciones. La evidencia disponible indica de manera general que *B. dulcis* combina reclutamiento sexual y la propagación clonal como mecanismos de regeneración.

Los diferentes regímenes de manejo mostraron la mayor cantidad de diferenciación, por ejemplo, la alta intensidad de corte de los palmares registró la mayor diversidad genética, ya que el 87% de su diferenciación genética estaba presente dentro de sus poblaciones. Estos resultados pueden explicarse por el hecho de que los individuos que

conforman estas poblaciones son un mosaico de genets de: *B. dulcis* pura, híbridos F1 entre *B. dulcis* y *B. nitida*, probables retrocruzas hacia *B. dulcis*. Además, en este grupo de palmas se registran las densidades de genets y ramets significativamente más altas que en las palmas de baja intensidad corte y los palmares sin manejo. Estas observaciones muestran que el manejo sistemático de las palmas de corte de alta intensidad, promueve un constante reclutamiento de plántulas de diferentes orígenes genéticos “ventanas de oportunidad estrechas” (Eriksson y Fröborg 1996), y que la pérdida de la diversidad genética en el corte de baja intensidad y de las no manejadas está relacionada con una reducción en la intensidad de las prácticas de manejo.

Por otro lado, la estructura geográfica observada podría explicarse por diferentes factores, incluyendo la fragmentación de los hábitats por la actividad antrópica, que actúa como barrera para la dispersión *B. dulcis*, como lo muestra la distribución discontinua de esta palma. Además, la dispersión de semillas de *B. dulcis* al ser facilitada por coyotes, zorros, aves y seres humanos (Aguilar 1996; Romero-Morales 2004), y el forrajeo de los polinizadores, tales como: coleópteros, dípteros e himenópteros (Barfod et al. 2003), podría explicar la falta de una estructura espacial a escala intra-poblacional.

Implicaciones de manejo tradicional de B. dulcis sobre sus recursos genéticos

El manejo tradicional *in situ* de *B. dulcis* por los nahuas de la comunidad rural de Huitziltepec, ha generado el mantenimiento de un reservorio significativo de la diversidad genética de *B. dulcis*. Este estudio sugiere que las poblaciones de *B. dulcis* manejadas se ven favorecidas por este manejo, dado que estas prácticas promueven el establecimiento de genets con diferente origen, que a su vez, aumentan sus niveles de diversidad genética (por ejemplo, *B. dulcis*, F1 entre *B. dulcis* y *B. nitida*, probables retrocruzas hacia *B. dulcis*). Por lo tanto, el mantenimiento de la biodiversidad se ve influida por los procesos culturales

humanos (Bellón y Brush 1994; Bellón 1996) y la supervivencia cultural es consideradas cada vez más como una piedra angular para la conservación de la diversidad biológica (Gadgil et al. 1993). Por otra parte, se observó que la manipulación humana y la transformación de los entornos, que se traduce en el establecimiento de palmares de *B. dulcis* para corte (manejo) de baja y alta intensidad tiene un efecto negativo en la diversidad biológica, tanto a nivel de población como de comunidad. La presencia de los campos de manejo de la palma sugiere que a medida que aumenta la manipulación de palma, también aumenta la densidad y este aumento genera que las especies que componen la comunidad sean casi eliminadas del sitio. Este último escenario, sumado a una ganadería extensiva y a los incendios forestales, hacen difícil la regeneración de otras especies, favoreciendo así la expansión *B. dulcis* (Illsley et al. 2001). Sin embargo, un aumento de la densidad de la palma no implica necesariamente la disponibilidad de más material para uso indígena. Las palmas con grandes densidades se encuentran por lo general en los sitios más deteriorados. Esto conlleva el desarrollo de hojas cuyas características no son las adecuadas para la elaboración de artesanías.

En consecuencia, se ha sugerido que estos sitios puedan ser considerados dentro de programas de restauración ecológica, debido a las importantes funciones que desempeñan las especies de palmas, como son la protección contra la erosión del suelo, favoreciendo la formación de materia orgánica y la creación de microclimas adecuados para el establecimiento de otras plantas especies.

Tablas y Figuras del capítulo

Fig. 1. Mapa de las poblaciones muestreadas de *Brahea dulcis* en el estado de Guerrero, México. 1 y 2 = poblaciones de palma no manejadas, 3 y 4 = poblaciones de palma de baja intensidad de corte de hoja, 5 y 6 = poblaciones de palma con alta intensidad de corte hoja..

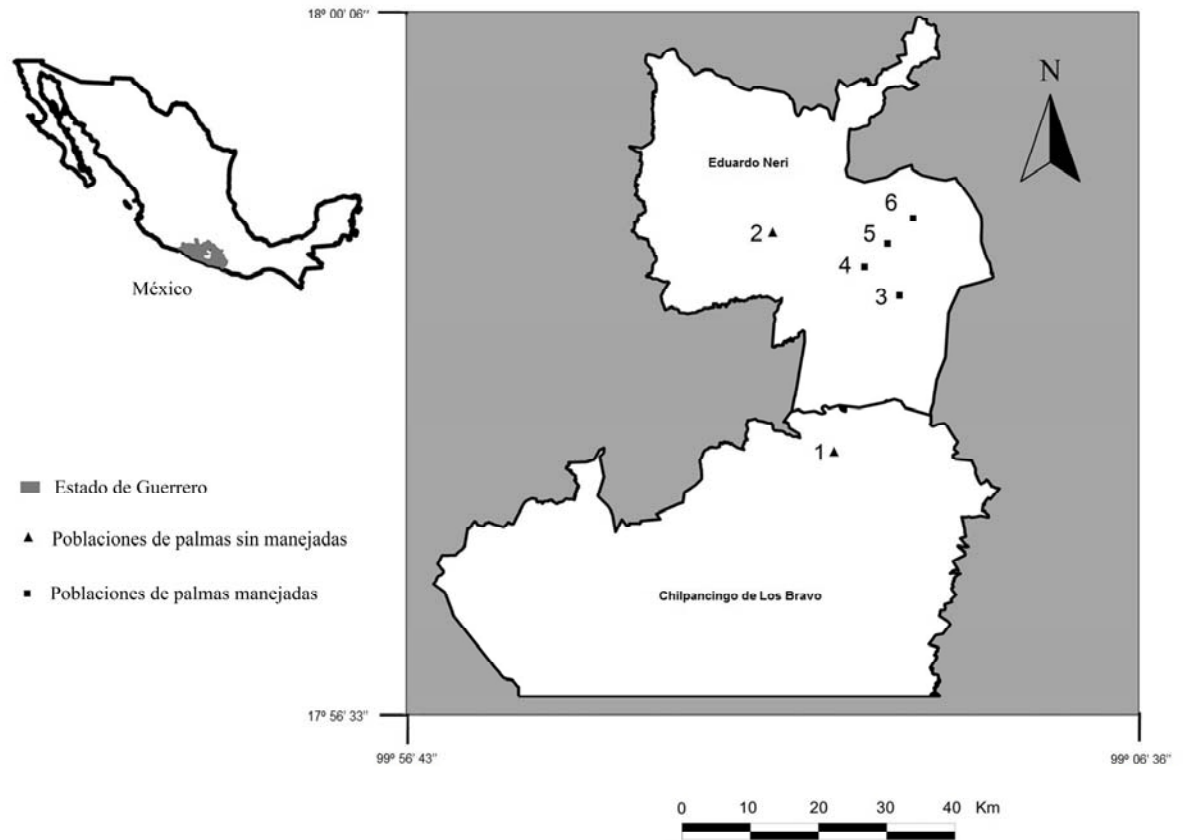


Tabla 1. Parámetros de diversidad genética para 37 loci de seis poblaciones de *Brahea dulcis* con diferentes regímenes de manejo.

Régimen de Manejo	Población	N	<i>He</i>	% <i>P</i>	<i>Nm</i>	Φ
Palmas sin manejo	1	30	0.12±0.09	44.8		
	2	30	0.16±0.08	47.3		
Media (±D.E.)			0.14±0.07	46.0±1.8	1.42	0.26
Palmas con baja intensidad de corte	1	30	0.23±0.11	49.2		
	2	30	0.27±0.14	55.9		
Media (±D.E.)			0.25±0.12	52.5±4.7	20.1	0.19
Palmas con alta intensidad de corte	1	30	0.38±0.15	66.1		
	2	30	0.36±0.13	56		
Media (±D.E.)			0.37±0.12	61.0±7.1	2.54	0.13

Nota: N = número de individuos muestreado por población, *He* = heterocigosis esperada, %*P* = porcentaje de loci polimórficos, *Nm* = número de migrantes, Φ = diferenciación genética, y D.E. = desviación estándar.

Fig. 2. Fenograma de similitud basado en los datos de RAPD de seis poblaciones de *Brahea dulcis* en el estado de Guerrero, México. 1 y 2 = poblaciones de palma no manejadas, 3 y 4 = poblaciones de palma de baja intensidad de corte de hoja, 5 y 6 = poblaciones de palma de alta intensidad de corte hoja.

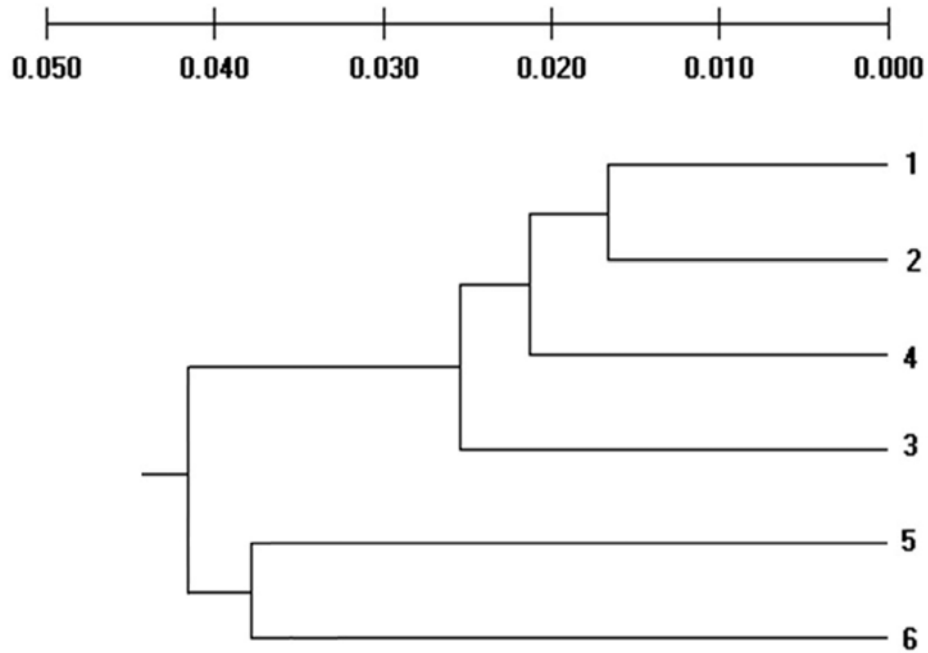
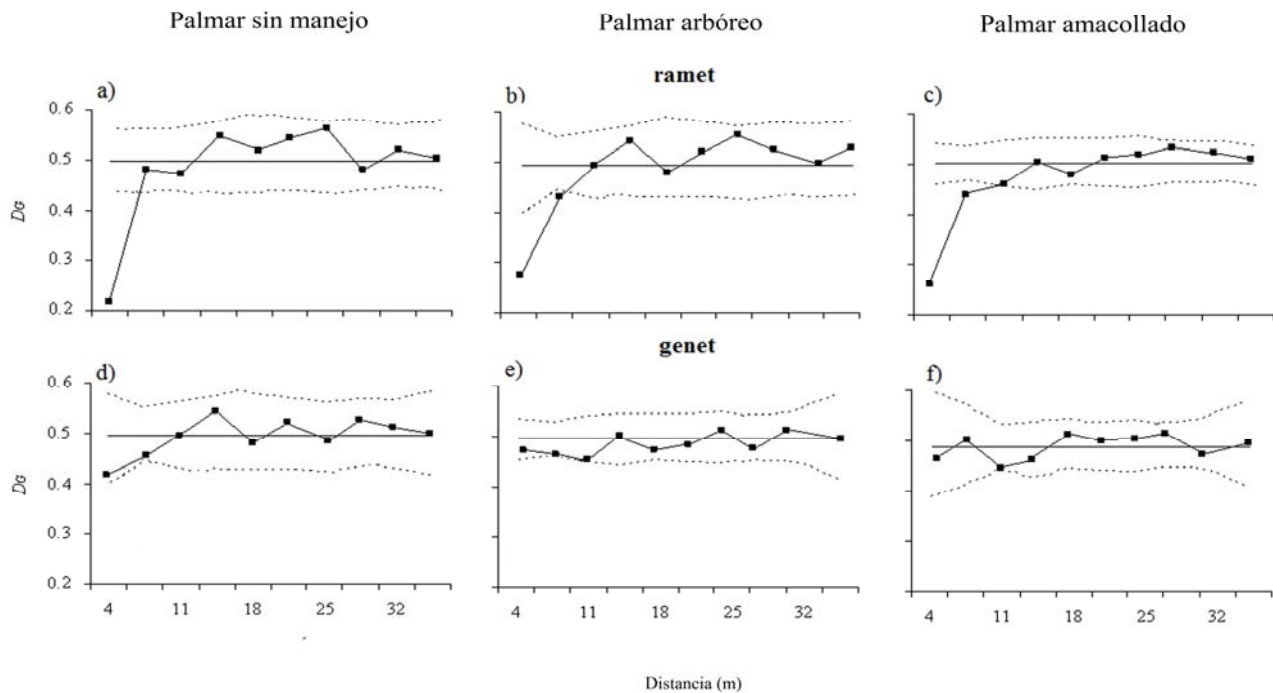


Fig. 3. Correlograma que grafica la distancia Tanimoto (DG) de todos los individuos de *Brahea dulcis* en función de la distancia (en metros) de las poblaciones de palma no manejadas: (a) a nivel de ramets, y (d) a nivel de genet; de poblaciones de palma de baja intensidad de corte de hoja: (b) a nivel de ramets, y (e) a nivel de genet; y de poblaciones de palma de corte de alta intensidad: (c) a nivel de ramet, y (f) a nivel de genet. Los cuadros negros representan los valores observados de DG estimados usando 5000 permutaciones. Las líneas sólidas representan los valores esperados y las líneas discontinuas representan los valores superior e inferior con un intervalo de confianza 99%.



CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES GENERALES

DISCUSIÓN GENERAL

En México la pérdida de cubierta vegetal por disturbios, el cambio climático, así como el frecuente manejo que los grupos indígenas han hecho de *Brahea dulcis* durante siglos, han promovido que *B. dulcis* entre en contacto con otras especies cercanas filogenéticamente. En la presente investigación se ha documentado, mediante marcadores moleculares y morfológicos, que la presencia de individuos con morfología atípica en sitios de simpatria entre *B. dulcis* y *B. nitida*, son el resultado del flujo genético entre estas dos especies parentales.

En general, los disturbios promueven cambios en el uso de suelo, facilitando con esto la ruptura de las barreras ecológicas que previenen la cruce entre individuos de diferentes taxa (Gross y Rieseberg 2005). Estas nuevas condiciones ambientales son aprovechadas por otras especies como *B. dulcis* cuyas características biológicas le permiten incrementar su distribución espacial generando con ello el potencial de entrar en simpatria con congéneres como *B. nitida* y con ello la posibilidad de hibridar

Cuando el fenómeno de hibridación se presenta entre individuos de especies con amplia distribución geográfica e individuos de especies con distribución restringida (e.g., especies raras), los individuos híbridos pueden funcionar como reservorios del material genético de las especies parentales. Si ocurre hibridación introgresiva simétrica o asimétrica, entonces se pueden presentar dos escenarios: 1) incremento en la diversidad genética al presentarse genotipos recombinantes que pueden, en ciertos ambientes, superar la adecuación de las especies parentales putativas (Arnold 1997); 2) puede significar la erosión genética de la especie rara y una eventual pérdida de identidad taxonómica (Wolf et al. 2000; Honnay y Jacquemyn 2006). Este último escenario se observó en la zona híbrida de Xochipala, Guerrero, donde se registró que *B. nitida* es erosionada genéticamente por *B. dulcis*. Lo anterior, pone de manifiesto la necesidad de

establecer programas adecuados de protección de *B. nitida*, donde no sólo se consideren aspectos de una conservación del fenotipo, sino también de la identidad genética de la especie.

En general, las zonas híbridas evaluadas del complejo *B. dulcis* × *B. nitida* con mayor disturbio contienen las mayores densidades de retrocruzas. Lo anterior, apoya la el planteamiento de que los disturbios rompen las barreras ecológicas que mantienen separadas las poblaciones de *B. dulcis* y *B. nitida*. En consecuencia, los disturbios favorecen el entrecruzamiento interespecífico, la formación de individuos híbridos, y la creación de zonas híbridas.

Los disturbios son un factor determinante en la amplitud de distribución geográfica que ha tenido *B. dulcis* en México. En particular, ha sido documentado que diversas comunidades rurales (e.g., Mixtecos, Nahuas, Otomíes) han manejado a las poblaciones de *B. dulcis* de manera frecuente para elaborar artesanías. Para el establecimiento de los palmares se recurre a quemas controladas que eliminan la vegetación original y promueven el reclutamiento de individuos de *B. dulcis*.

Los resultados obtenidos en este estudio evidencian que las poblaciones manejadas de *B. dulcis*, han promovido el establecimiento de individuos híbridos F₁ e introgresos con *B. nitida*, el incremento de diversidad genética, el aumento en la formación de ramets con distribución agregada, y el establecimiento de genets de forma aleatoria. En general, las poblaciones con un manejo más intensivo registran los mayores valores de variabilidad genética. Por lo que, se puede sugerir que el manejo *B. dulcis* es una actividad que permite mantener poblaciones con alta variabilidad genética, y por tanto como un escenario a considerar en términos de la conservación de esta especie. Sin embargo, es importante tomar en cuenta que para la formación de poblaciones manejadas de *Brahea*, se recurre a la roza, tumba y quema, lo que puede

afectar de manera importante, la estructura de la comunidad y la dinámica del ecosistema al que se asocian las especies del género *Brahea* (Ochoa-Gaona et al. 2007).

Lo anterior, permite sugerir que si algunos de los palmares de *Brahea* que forman parte de los tipos de vegetación de México (Rzedowski 1983), se originaron a partir de palmares manejados, entonces, los disturbios como el fuego han favorecido un incremento en su amplitud de distribución geográfica, ya que tienen la peculiaridad de establecerse en suelos pobres en nutrientes. Además, el manejo ha promovido un incremento en su variabilidad genética que permite responder favorablemente a diferentes ambientes.

Las actividades antrópicas han sido un factor determinante en el incremento de la temperatura ambiental promoviendo un cambio climático. Esta condición puede significar ventajas adaptativas para especies propias de ambientes xéricos como *B. dulcis*. Por ejemplo, *B. dulcis* es una especie favorecida por disturbios, con débiles barreras reproductivas que facilitan intercambio genético con otras especies (e.g., *B. nitida*), y que puede reproducirse sexual y asexualmente. Lo anterior, genera un escenario ideal para que *B. dulcis* pueda incrementar su amplitud de distribución geográfica, entrando en contacto con especies cercanas y con el potencial de generar eventos de hibridación que favorecerían un aumento en su diversidad genética.

Las actividades de cambio de uso de suelo, han promovido la ruptura de barreras ecológicas y reproductivas poniendo en contacto a *B. dulcis* con sus congéneres que se encontraban aislados generando con ello eventos de hibridación introgresiva, así como una eventual asimilación genética de uno u otra especie introgresante. Ante esta situación las acciones de conservación de las especies deben considerar una disminución del impacto del hombre sobre las condiciones aun conservadas de los tipos de vegetación en donde se encuentran una y/u otra especie parental.

CONCLUSIONES GENERALES

De este estudio se desprenden las siguientes conclusiones

Brahea dulcis, es una especie manejada asociada a ambientes xéricos y favorecida por el disturbio, mientras que *B. nitida* se una especie poco utilizada, asociada a ambientes mésicos.

Los disturbios antropogénicos han promovido la ruptura de las barreras reproductivas entre estas especies por lo que al encontrarse en áreas de simpatria se han detectado organismos con morfología atípica a una u otra especie producto de hibridación.

Los caracteres fenotípicos son una herramienta útil para la identificación en plantas de individuos de origen híbrido. La información macromorfológica, micromorfológica y molecular (RAPDs) ha permitido establecer que la presencia de organismos con morfología atípica en las zonas de simpatria de *Brahea dulcis* y *B. nitida* se debe a flujo génico horizontal entre estas dos especies.

Se ha evidenciado que los fenotipos híbridos no sólo están caracterizados por rasgos intermedios de los parentales sino que también están presentes caracteres transgresivos positivos y negativos.

Ambientalmente se ha logrado establecer una relación entre el nivel de hibridación introgresiva y las condiciones de disturbio. A mayor nivel de alteración o disturbio mayor nivel de hibridación introgresiva. En esta dinámica de hibridación introgresiva la condición mésica o xérica en la cual se encuentre la población simpátrida define la dirección y nivel de introgresión

Bajo este escenario ha sido posible documentar la erosión genética que se está presentando en *B. nitida* producto de hibridación introgresiva de *B. dulcis*. Por lo que es necesario reconsiderar los esquemas convencionales de conservación y utilizar como herramienta complementaria para la toma de decisiones los análisis moleculares; sobre todo

en aquellas especies que se encuentran bajo algún estatus de protección por la NOM-059-SEMARNAT, como es el caso de *B. nitida*.

Tomando en cuenta que el cambio climático está promoviendo la transformación de ambientes méxicos a xéricos, se proyecta una invasión de *B. dulcis* hacia nuevos ambientes y un probable incremento de los fenómenos de hibridación con otros congéneres.

En este sentido *B. dulcis* es una especie favorecida el fuego que se presenta al establecer los palmares manejados de esta especie.

Los diferentes esquemas de manejo que durante siglos se han hecho de *B. dulcis* han tenido un efecto sobre su fisonomía, sobre la estructura genética y clonal así como la promoción de la hibridación.

La intensidad de corte de hoja que se hace de los individuos de las poblaciones manejadas ha promovido una diferenciación en el tamaño de éstos. Siendo los de mayor intensidad de corte los de tamaño más bajo (amacollados), seguido de los de menor intensidad de corte o arborescentes manejados y los más altos los individuos de poblaciones no manejadas.

La diversidad genética es mayor en las amacolladas seguida de las arborescentes manejadas y por último las no manejadas.

En clones de *B. dulcis* los ramets crecen cerca uno de otro. El manejo afecta de manera significativa la densidad de genets. La densidad de éstos fue mayor en las poblaciones de individuos amacollados seguido de las poblaciones de arborescentes manejadas y finalmente la de poblaciones no manejadas. El mismo patrón se presentó en la densidad de ramets. Sin embargo no hay diferencia entre regimenes de manejo y el número de ramets por genotipo. Los ramets presentan una distribución espacial agregada en distancias cortas, pero a distancias largas, su distribución es al azar.

La escala de análisis de las poblaciones manejadas puede presentar ciertas diferencias, ya que a una escala mayor la diversidad clonal fue alta para los individuos manejados. Básicamente todos los individuos fueron genéticamente diferentes; sin embargo, a una escala pequeña algunos individuos presentan genotipos similares.

El manejo ha permitido el establecimiento de híbridos y retrocruzas de *B. dulcis* × *B. nitida* tanto en las amacolladas como en las arborescentes manejadas. La reproducción clonal es un mecanismo por el cual las retrocruzas han logrado establecerse.

Este trabajo evidencia por primera vez en México el fenómeno de hibridación en palmas arborescentes así como el papel que el manejo tiene en el establecimiento de híbridos dentro del complejo *B. dulcis* × *B. nitida*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, R.J., James, J.K., Milne, R.I., Gillies, A.C.M., 2003. Plant introductions, hybridization, and gene flow. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B.* 358, 1123–1132.
- Aguilar, J.G., 1996. Manejo de recursos naturales de la selva baja caducifolia, en particular *Brahea dulcis*, en la región de Chilapa, Guerrero. Informe final del proyecto C105, CONABIO, México.
- Aguilar, J.G., 1998. Manejo campesino de recursos naturales de la Selva Baja Caducifolia, en particular *Brahea dulcis*, en la región de Chilapa Guerrero: Segunda fase. Grupo de Estudios Ambientales A.C. Informe final SNIB-CONABIO proyecto J095. México.
- Alfonso-Corrado, C., Esteban-Jiménez, R., Clark-Tapia, R., Piñero, D., Campos, J., Mendoza, A., 2004. Clonal and genetic structure of two Mexican oaks: *Quercus eduardii* and *Quercus potosina* (Fagaceae). *Evol. Ecol.* 18, 585–599.
- Allendorf, F.W., Leary, R.F., Spruell, P., Wenburg, J.K., 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends Ecol. Evol.* 16: 613–622.
- Anderson, E., 1949. Introgressive hybridization. John Wiley & Sons, New York.
- Arnold, M.L. 1992. Natural hybridization as an evolutionary process. *Ann. Ecol. Syst.* 23: 237–261.
- Arnold, M.L., 1997. Natural hybridization and evolution. Oxford University Press, New York.
- Arnold, M.L., 2006. Evolution through genetic exchange. Oxford University Press; Oxford, UK.
- Arnold, M.L., Hamrick, J.L., Bennett, B.D., 1990. Allozyme variation in Louisiana Irises: a test for introgression and hybrid speciation. *Heredity* 65, 297–306.
- Baker, H.G., 1986. Patterns of plant invasion in North America. In: Mooney H.A. and Drake J.A. (Eds.), *Ecology of Biological Invasions of North America and Hawaii*, pp 44–57. Ecological Studies 58. Springer-Verlag, New York.
- Balick, M.J., 1986. The palm - tree of life: biology, utilization and conservation. Proceedings of a symposium at the annual meeting of the Society for Economic Botany held at the New York Botanical Garden, Bronx, on 13–14 June.
- Balick, M.J., Pinheiro, C.U.B., Anderson, A.B., 1987. Hybridization on the babassu palm complex *Orbignya phalerata* x *O. Eichleri*. *Amer. J. Bot.* 74, 1013–1032.

- Balick, M.J., 1988. The Palm-Tree of Life: Biology, utilization and conservation. Advances in Economic Botany 6. The New York Botanical Garden.
- Balslev, H., 2011. Palm Harvest Impacts in North-Western South America. Bot. Rev. 77, 370-380.
- Bangert, R.K., Turek, R.J., Martinsen, G.D., Wimp, G.M., Bailey, J.K., Whitham, T.G., 2005. Benefits of conservation of plant genetic diversity to arthropod diversity. Cons. Biol. 19, 379-390.
- Barfod, A., Hagen M., Borchsenius, F., 2011. Twenty-five years of progress in understanding pollination mechanisms in palms (Arecaceae). Ann. Bot. 108, 1503-1516.
- Barfod, A.S., Burholt, T., Borchsenius, F., 2003. Contrasting pollination modes in three species of *Licuala* (Arecaceae: Coryphoideae). Telopea 10, 207-223.
- Barton, N.H., Hewitt, G.M., 1985. Analysis of hybrid zones. Ann. Rev. Ecol. Syst. 16, 113-148.
- Bellon, M.R., 1996. The dynamics of crop infraspecific diversity: a conceptual framework at the farmer level. Econ. Bot. 50, 26-39.
- Bellon, M.R., Brush, S.B., 1994. Keepers of maize in Chiapas, Mexico. Econ. Bot. 48, 196-209.
- Blancas, V.J.J., 2001. Estudio etnobotánico del “soyatl” o palma (*Brahea dulcis* (HBK) C. Martius en la comunidad náhuatl de Huitziltepec, Eduardo Neri, Guerrero, Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F.
- Borchsenius, F., 1999. Morphological variation in *Geonoma cuneata* (Palmae) in western Ecuador. Mem. N.Y. Bot. Gard. 83, 131-139.
- Brokamp, G., Valderrama, N., Mittelbach, M., Grandez, R., Barfod, A.S., Weigend, M., 2011. Trade in palm products in North-Western South America. Bot. Rev. 77, 571-606.
- Brown, K.E., 1976. Ecological studies of the Cabbage Palm, *Sabal palmetto*. Principes 20, 3-10.
- Bruschi, P., Vendramin, G.G., Bussotti, F., Grossoni, P., 2000. Morphological and molecular differentiation between *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus pubescens* Willd. (Fagaceae) in northern and central Italy. Ann. Bot. 85, 325-333.

- Brush, S.B., 2004. *Farmers' Bounty. Locating crop diversity in the contemporary world.* Yale University Press, New Haven and London.
- Brush, S.B., Stabinsky, D., 1996. *Valuing local knowledge. Indigenous people and intellectual property rights.* Island Press, Washington DC.
- Burke, J.M., Bulger M.R., Wesselingh, R.A., Arnold, M.L., 2000. Frequency and spatial patterning of clonal reproduction in Louisiana Iris hybrid populations. *Evolution* 54, 137–144.
- Caballero, J., Martínez, A., Gama, V., 2001. El uso y manejo tradicional de la palma de guano en el área maya de Yucatán. *Biodiversitas* 39, 1–16.
- Calvo-Irabien, L.M., Zapata, M.T., Iriarte-Vivar, S., 2009. Effects of leaf harvest on *Thrinax radiata*, a threatened palm species: implications for management and conservation. *JTFS* 21, 34–44.
- Caraco, T., Kelly, C.K., 1991. On the adaptive value of physiological integration in clonal plants, *Ecology*, 72, 81–93
- Caraway, V., Carr, G.D., Morden, C.W., 2001. Assessment of hybridization and introgression in lava-colonizing *Dubautia* (Asteraceae: Madiinae) using RAPD markers. *Am. J. Bot.*, 88, 1688–1694.
- Carney, S.E., Gardner, K.A., Rieseberg, L.H., 2000. Evolutionary changes over the fifty-year history of a hybrid population of sunflowers (*Helianthus*). *Evolution* 54, 462–474.
- Casas, A., Cruse, J., Morales, E., Otero-Arnaiz, A., Valiente-Banuet, A., 2006. Maintenance of phenotypic and genotypic diversity of *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) by indigenous peoples in Central Mexico. *Biodivers. Conserv.* 15, 879–898.
- Casas, A., Parra, F., 2007. Agrobiodiversidad, parientes silvestres y cultura. *LEISA* 23, 5–8, Perú.
- Casas, A., Viveros, J.L., Caballero, J., 1994. *Etnobotánica Mixteca: sociedad, recursos naturales y subsistencia en la Montaña de Guerrero.* Consejo Nacional Para la Cultura y las Artes/Instituto Nacional Indigenista, México D.F.
- Castiglione, S., Cicutelli, A., Lupi, R., Patrignani, G., Fossati, T., Brundu, G., Sabatti, M., Van Loo, M., Lexer, C., 2010. Genetic structure and introgression in riparian populations of *Populus alba* L. *Plants Biosyst.* 144, 656–668.

- Castillo, G.C., 1993. Contribución al conocimiento sobre *Brahea dulcis* (H.B.K.) C. Martius, en la región Mixteca de Cárdenas, Oaxaca. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo, Estado de México.
- Chazdon, R.L., 1992. Patterns of growth and reproduction of *Genoma congesta*, a clonal understorey palm. *Biotropica* 24, 43–51.
- Chung, M.G., Chung, M.Y., 1999. Spatial genetic structure of clonal and sexual reproduction in a population of *Abeliophyllum distichum* (Oleaceae), an endangered monotypic genus. *Genes Genet. Syst.* 74, 9–14.
- Chung, M.Y., Nason, J., Chung, M.G., Kim K.J., Park C.W., Sun B.Y., Pak. J.H., 2002. Landscape-level spatial genetic structure in *Quercus acutissima* (Fagaceae). *Am. J. Bot.* 89, 1229–1236.
- Crow, J.F., Aoku, K., 1984. Group selection for a polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 6073–6077.
- Davis, M.A., 2010. *Invasion Biology*. Oxford University Press. New York.
- Degen, B., Petit, R., Kremer, A., 2001. SGS Spatial Genetic Software: A computer program for analysis of spatial genetic and phenotypic structures of individuals and populations. *J. Hered.* 92, 447–448.
- Dehgan, B. 1998. *Landscape plants for subtropical climates*. University Press of Florida, Gainesville, FL.
- Deichsel, G., Trampisch, H.J., 1985. *Clusteranalyse und diskriminanzanalyse*. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Delgado, P., Piñero, D., 2002. Sistemática filogeográfica y sus aplicaciones a la evolución y conservación de los bosques de coníferas en México: el caso de *Pinus montezumae* y *P. pseudostrobus*. *Acta Universitaria (Guanajuato)* 12, 3–19.
- Dransfield, J., Uhl, N., Asmussen, C., Baker, W., Harley, M., Lewis, C., 2008. *Genera Palmarum*. Kew publishing, Royal Botanic Garden, United Kingdom.
- Dye, R.J., 2009. Genetic Studio: A suite of programs for the spatial analysis of genetic marker data. *Mol. Ecol. Res.* 9, 110–113.
- Dyer, R.J., Westfall, R.D., Sork, V.L., Smouse, P.E., 2004. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape V: a stepwise approach for extracting factors contributing to pollen structure. *Heredity* 92, 204–211.
- Eckert, C.G., 2002. The loss of sex in clonal plants. *Evol. Ecol.* 15, 501–520.

- Eckert, C.G., Barrett, S.C.H., 1993. Clonal reproduction and patterns of genotypic diversity in *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Am. J. Bot.* 80, 1175–1182.
- Ellstrand, N.C., 1992. Gene flow by pollen: implications for plant conservation genetics. *Oikos*, 63, 77–86.
- Ellstrand, N.C., Ellam, D.R., 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 24, 217–242.
- Ellstrand, N.C., Prentice, H.C., Hancock, J.F., 1999. Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 30, 539–563.
- Ellstrand, N.C., Roose, M.L., 1987. Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. *Am. J. Bot.* 74, 123–131.
- Ellstrand, N.C., Schierenbeck, K.A., 2000. Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 7043–50.
- Ellstrand, N.C., Whitkus, R., Rieseberg, L.H., 1996. Distribution of spontaneous plant hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5090–5093.
- Endress, B., Gorchov, D., Peterson, M., Serrano, E., 2004. Harvest of the palm *Chamaedorea radicalis*, its effects on leaf production, and implications for sustainable management. *Cons. Biol.* 18, 822–830.
- Eriksson, O., 1989. Seedling dynamics and life histories in clonal plants. *Oikos* 55, 231–238.
- Eriksson, O., Fröberg, H., 1996. "Windows of opportunity" for recruitment in long-lived clonal plants: experimental studies of seedling establishment in *Vaccinium* shrubs. *Can. J. Bot.* 74, 1369–1374.
- Excoffier, L., 1993. AMOVA 1.5 Analysis of molecular variance. Computer program supplied by the author. Geneva, Switzerland.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479–491.
- Fernandez-Manjarres, J.F., Gerard, P.R., Dufour, J., Raquin, C., Frascaria-Lacoste, N., 2006. Differential patterns of morphological and molecular hybridization between *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl (Oleaceae) in eastern and western France. *Mol. Ecol.* 15, 245–257.
- Fontdevila, A., Moya, A., 2003. Evolución: Origen, adaptación y divergencia de las especies. Madrid: Editorial Síntesis.

- Fritz R., Hochwender, C.G., Albrechtsen B.R., Czesak, M.E., 2006. Fitness and genetic architecture of parent and hybrid willows in common gardens. *Evolution* 60, 1215–1227.
- Fritz, R.S., Moulia, C., Newcombe, G., 1999. Resistance of hybrid plants and animals to herbivores, pathogens and parasites. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 30, 565–591.
- Futuyma, D.J., 1998. *Evolutionary biology*. 3rd ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Gadgil, M., Berkes, F., Folke, C., 1993. Indigenous knowledge for biodiversity conservation. *Ambio* 22, 151–156.
- Grant, V., 1981. *Plant speciation*. Columbia University Press, New York.
- Gross, B.L., Rieseberg, L.H., 2005. The ecological genetics of homoploid hybrid speciation. *Journal of Heredity* 96, 41–252.
- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W., 1989 Allozyme diversity in plant species, In: Brown, A.H.D., Clegg, M.T., Kahler, A.L., Weir, B.S. (Eds.), *Plant population genetics, breeding and germplasm resources*. Sinauer, Sunderland, MA., pp. 43–63.
- Hardig, T.M., Brunsfeld, S.J., Fritz, R.S., Morgan, M., Orrians, C.M., 2000. Morphological and molecular evidence for hybridization and introgression in a willow (*Salix*) hybrid zone. *Mol. Ecol.* 9, 9–24.
- Harrison, R.G., 1993. *Hybrid and hybrid zones: Historical perspective*. Oxford University Press.
- Haverkort, B., Millar, D., 1994. Constructing diversity: the active role of rural people in maintaining and enhancing biodiversity. *Etnoecológica* 2, 51–64.
- Henderson, A., 1984. Observations on pollination of *Cryosophila albida* (Palmae). *Principes* 28, 20–126.
- Henderson, A., Galeano, G., Bernal, R., 1995. *Field guide to the palms of the Americas*. Princeton University Press. Princeton, New Jersey.
- Holsinger, K.E., 2000. Reproductive systems and evolution in vascular plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 7037–7042.
- Honnay, O., Jacquemyn, H., 2006. Susceptibility of common and rare plant species to the generic consequences of habitat fragmentation. *Cons. Biol.* 21, 823–831.
- Howard, D.J., Preszler, R.W., Williams, J., Fenchel, S., Boecklen, W.J., 1997. How discrete are oak species? insights from a hybrid zone between *Quercus grisea* and *Q. gambelli*. *Evolution* 5, 47–755.

- Illsley, C., Aguilar, J., Acosta, G.J., García, B.J., Gómez, A.T., Caballero N.J., 2001. Contribuciones al conocimiento y manejo campesino de los palmares de *Brahea dulcis* (HBK) C. Martius en la región de Chilapa, Guerrero. In: Plantas, Cultura y Sociedad. Estudio de la relación entre seres humanos y plantas en los albores del Siglo XXI. (Eds.), Rendón, A.B., Rebollar, D.S., Caballero, N.J., y Martínez, A.M.A. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Secretaría del Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca. México, D.F. Pp. 259–287.
- INEGI, 1994. X Censo General de Población y Vivienda de México. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. México.
- Jensen, R.J., Hokanson, S.C., Isebrands, J.G., Hancock, J.F., 1993. Morphometric variation in oaks of the Apostle Islands in Wisconsin: evidence of hybridization between *Quercus rubra* and *Q. ellipsoidalis* (Fagaceae). *Am. J. Bot.* 80, 358–1366.
- Jones, L.D., 1995. Palms throughout the World. Smithsonian Institution Press. Washington, DC.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F., Donoghue, M.J., 2002. Plant systematics: a phylogenetic approach. Sunderland, MA: Sinauer.
- Kahn, F., Arana, C., 2008. Las palmeras en el marco de la investigación para el desarrollo en América del Sur. *Rev. Per. Biol.* 15, 5–6.
- Kanno, H., Seiwa, K., 2004. Sexual vs. vegetative reproduction in relation to forest dynamics in the understory shrub, *Hydrangea paniculata* (Saxifragaceae). *Plant Ecology* 170, 43–53.
- Kim, S.T., Chung, M.G., 1995. Genetic and clonal structure in Korean populations *Clystegia japonica* (Convolvulaceae). *Bot. Bull. Acad. Sin.* 36, 135–141.
- Kleinschmit, J.R.G., Bacilieri, R., Kremer, A., Roloff, A., 1995. Comparison of morphological and genetic traits of pedunculata oak (*Quercus robur* L.) and sessile oak (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.). *Silvae Genetica* 44, 5–6.
- Klier, K., Leoschke, M.J., Wendel, J.F., 1991. Hybridization and introgression in white and yellow lady'slipper orchids (*Cypripedium candidum* and *C. pubescens*). *J. Heredity* 82, 305–319.
- Lamont, B.B., Enright, N.J., Krauss, S.L. Miller, B.P., 2003. Anthropogenic disturbance promotes hybridization between Banksia species by altering their biology. *J. Evol. Biol.* 16, 551–557.

- Lau, C.P.Y., Ramsden, L., Saunders, R.M.K., 2005. Hybrid origin of “*Bauhinia blakeana*” (Leguminosae: Caesalpinioideae), inferred using morphological, reproductive, and molecular data. *Am. J. Bot.* 92, 525–533.
- Levin, D.A., 2000. The origin, expansion, and demise of plant species. Oxford University Press, New York.
- Levin, D.A., Francisco-Ortega, J., Jansen, R.K., 1996. Hybridization and the extinction of rare plant species. *Cons. Biol.* 10, 10–16.
- Lucio, J., 2005. Patrones de diversidad genética y proceso de domesticación de *Polaskia chichipe* (Cactaceae) en el Valle de Tehuacán, Puebla. BSc Thesis Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.
- Lynch, M., Milligan, B.G., 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecol.* 3, 91–99.
- Macía, M.J., Armesilla, P.J., Cámara-Leret, R., Paniagua-Zambrana, N., Villalba, S., Balslev, H., Pardo-de-Santayana, M., 2011. Palm uses in Northwestern South America: A Quantitative review. *Bot. Rev.* 77, 462–570.
- Mallet, J., 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends Ecol. Evol.* 20, 229–237.
- Mandujano-Sánchez, M.C., 2007. La clonalidad y sus efectos en la biología de poblaciones, In: Eguiarte, L.E., Souza V., Aguirre, X. (Eds.), *Ecología Molecular*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, CONABIO, México, D.F., pp. 215–250.
- Martínez, B.A., Caballero, J., Gama, V., Flores, S., Martorell, C., 2002. Sustainability of the traditional management of Xa’an palms by the lowland Maya of Yucatan, México, In: Stepp, J., Wyndham, F.S., Zarger, R.K. (Eds.), *Ethnobiology and biocultural diversity*. International Society of Ethnobiology. Georgia, pp. 381–388.
- Martínez-Ballesté, A., Martorell, C., Caballero, J., 2008. The effect of Maya traditional harvesting on the leaf production, and demographic parameters of Sabal palm in the Yucatán Peninsula, Mexico. *Forest Ecol. Manag.* 256, 1320–24.
- Martínez-Castillo, J., Zizumbo-Villarreal, D., Gepts, P., Delgado-Valerio, P., Colunga-García Marín, P., 2006. Structure and genetic diversity of wild populations of

- Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) from the Yucatan peninsula, Mexico. *Crop. Sci.* 46, 1071–1080.
- Martínez-Castillo, J., Zizumbo-Villarreal, D., Perales-Rivera, H., Colunga-Garcíamarín, P., 2004. Intraspecific diversity and morpho-phenological variation in *Phaseolus lunatus* L. from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Econ. Bot.* 58, 354–380.
- Mastache, F., Alba, G., Morett, E.N., 1982. El trabajo de la palma en la región de la Montaña, Guerrero. Universidad Autónoma de Guerrero. Cuadernos de Ciencias Sociales 4. Chilpancingo, Guerrero, México.
- Masterson, J., 1994. Stomatal size in fossil plants: evidence for polyploidy in majority of angiosperms. *Science*, 264, 421–423.
- McKean, S.G., 2003. Toward sustainable use of palm leaves by a rural community in Kwazulu-Natal, South Africa. *Econ. Bot.* 57, 65–72.
- McLellan, A.J., Pratt, D., Kaltz, O., Schmid, B., 1997. Structure and analysis of phenotypic and genetic variation in clonal plants, In: Kroon, H., van Groenendael, J. (Eds.), *The Ecology and Evolution of Clonal Plants*. The Backhuys Publishers, Leiden, pp. 185–210.
- Mendoza, A., Franco, M., 1998. Sexual reproduction and clonal growth in *Reinhardtia gracilis* (Palmae), an understory tropical palm. *Am. J. Bot.* 85, 521–527.
- Miller, M.P., 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: a windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by the author. Northern Arizona University.
- Montalvo, A.M., Conard, S.G., Conkle, M.T., Hodgskiss, P.D., 1997. Population structure, genetic diversity and clone formation in *Quercus chrysolepis* (Fagaceae). *Am. J. Bot.* 84, 1553–1564.
- Montúfar, R., Anthelme, F., Pintaud, J.C., Balslev, H., 2011. Disturbance and resilience in tropical American palm populations and communities. *Bot. Rev.* 77, 426–461.
- Moore, H.E., Uhl, N.W., 1982. The major trends of evolution in palms. *Bot. Rev.* 48, 1–69.
- Mooring, J., 2001. Barriers to interbreeding in the *Eriophyllum lanatum* (Asteraceae, Helenieae) species complex. *Am. J. Bot.* 88, 285–312.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89, 583–590.
- O'Brien, T.G., Kinnaird, M.F., 1996. Birds and mammals of the Bukit Barisan Selatan National Park, Sumatra, Indonesia. *Oryx*. 30, 207–217.

- Ochoa-Gaona, S., Hernández-Vázquez, F., De Jong, B.H.J., Gurri-García, F.D., 2007. Pérdida de diversidad florística ante un gradiente de intensificación del sistema de roza-tumba-quema: un estudio de caso en la selva Lacandona, Chiapas, México. *Bol. Soc. Bot. Mex.* 81, 65–80.
- Oliva-Tejera, F., Caujape-Castells, J., Navarro-Deniz, J., Reyes-Betancort, A., Scholz, S., Baccarani-Rosas, M., Cabrera-García, N., 2006. Patterns of genetic divergence of three Canarian endemic *Lotus* (Fabaceae): implications for the conservation of the endangered *L. kunkelii*. *Am. J. Bot.* 93, 1116–1124.
- Orians, C.M., 2000. The effects of hybridization in plants on secondary chemistry: implications for the ecology and evolution of plant–herbivore interactions. *Am. J. Bot.* 87, 1749–1756.
- Otero-Arnaiz, A., Casas, A., Hamrick, J.L., Cruz, J., 2005. Direct and indirect estimates of gene flow among wild and managed populations of *Polaskia chichipe*, an endemic columnar cactus in central México. *Mol. Ecol.* 14, 3313–4322.
- Pappert, R.A., Hamrick, J.L., Donovan, L.A., 2000. Genetic variation in *Pueraria lobata* (Fabaceae), an introduced, clonal, invasive plant of the Southeastern United States. *Am. J. Bot.* 87, 1240–1245.
- Pavón, N.P., Escobar, R., Ortiz-Pulido, R., 2006. Extracción de hojas de la palma *Brahea dulcis* en una comunidad otomí en Hidalgo, México: efecto sobre algunos parámetros poblacionales. *Interciencia* 31, 57–61.
- Perry, W.L., Lodge, D.M., Feder, J.L., 2002. Importance of hybridization between indigenous and nonindigenous freshwater species: an overlooked threat to North American biodiversity. *Syst. Biol.* 51, 255–275.
- Petit, R.J., Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Salvini, D., Vendramin, G.G., 2005. Comparative organisation of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Mol. Ecol.* 14, 689–711.
- Pielou, E.C., 1969. *An introduction to mathematical ecology*, Wiley, New York.
- Pintaud, J.Ch., 2008. An overview of the taxonomy of *Attalea* (Arecaceae). *Rev. Peru. Biol.* 1, 55–63.
- Quero, H., 1989. *Flora Genérica de Arecaceas de México*. Tesis de Doctorado, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
- Quero, H., 1994. *Arecaceae* C.H. Shultz. Fascículo 7. *Flora de Tehuacán-Cuicatlán*. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.

- Quero, H., Yáñez, E., 2000. El complejo *Brahea-Erythea* (Palmae: Coryphideae). Proyecto CONABIO L216. Informe final. [http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/ InfL216](http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/InfL216).
- Ramírez-Rodríguez, R., Tovar-Sánchez, E., Jiménez-Ramírez, J. Vega-Flores, K., Rodríguez, V., 2011. Intogressive hybridization between *Brahea dulcis* y *B. nitida* (Arecaceae) in Mexico: evidence from morophological and PCR-RAPD patterns. *Botany* 89, 545–557.
- Rhymer, J., Simberloff, D., 1996. Extinsion by hybridization and introgression. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 27, 83–109.
- Richards, A.J., 1986. *Plant Breeding Systems*. George Allen & Unwin, London.
- Riesberg, L.H., Willis, J., 2007. Plant speciation. *Science* 317, 910–914.
- Rieseberg, L.H. 1991. Hybridization in rare plants: insights from case studies in *Cercocarpus* and *Helianthus*. In *Genetics and conservation of rare plants*. Edited by D.A. Falk, K.E. Holsinger. Oxford University Press, New York. pp. 171–181.
- Rieseberg, L.H., Ellstrand, N.C., 1993. What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridization? *Crit. Rev. Plant Sci.* 12, 213–241.
- Rieseberg, L.H., Archer, M.A., Wayne, R.K., 1999. Transgressive segregation, adaptation, and speciation. *Heredity* 83, 363–372.
- Rieseberg, L.H., Gerber, D., 1995. Hybridization in the Catalina mahogany: RAPD evidence. *Cons. Biol.* 9, 199–203.
- Rieseberg, L.H., Wendel J.F., 1993. Introgression and its consequences in plants. Pp. 70-109. In: Harrison, R. G. (ed.), *Hybrid zones and the evolutionary process*. Oxford University Press, Oxford.
- Romero-Morales, M.A., 2004. Factores que controlan la germinación en semillas de palma dulce, *Brahea dulcis* (H. B. K.) C. Martius Tesis de Licenicatura, Universidad Autónoma de Chapingo, Mexico.
- Ruíz-Durán, M. E., 2006. Patrones de diversidad genética y proceso de domesticación de *Polaskia chende* (Cactaceae) en el Valle de Tehuacán, Puebla. Tesis de Liceciatura, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.
- Rzedowski, J., 1983. *Vegetación de México*. Limusa, México
- Schierenbeck, K., Ellstrand, N.C., 2009. Hybridization and the evolution of invasiveness in plants and other organisms. *Biological Invasions* doi:10.1007/s10530-008-9388-x

- Schilthuizen, M., 2002. Mollusca: an evolutionary cornucopia. *Trends Ecol. Evol.* 17, 8–9.
- Schwarzbach, A.E., Donovan, L.A., Rieseberg, L.H., 2001. Transgressive character expression in a hybrid sunflower species. *Am. J. Bot.* 88, 270–277.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres - categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. *Diario Oficial (segunda sección)*.
- Silander, J. A. Jr., 1985. Microevolution in clonal plants. In: Jackson, J. B. C., Buss, L. W., Cook, R. E. (Eds.), *Population biology and evolution of clonal organisms*. Yale Univ. Press, New Haven, CT, pp. 107–152.
- Sneath, I.H.A., Sokal, R.R., 1973. *Numerical taxonomy*. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Soltis, P.S., Gitzendanner, M.A., 1999. Molecular systematics and the conservation of rare species. *Cons. Biol.* 13, 471–483.
- Statsoft, 1998. *STATISTICA*. For Windows. Manual version 6.0. Statsoft, Tulsa, Oklahoma, USA.
- Stebbins, G.L., 1950. *Variation and evolution in plants*. New York: Columbia Univ. Press.
- Stebbins, G.L., 1959. The role of hybridization in evolution. *Proc. Am. Phil. Soc.* 103, 231–251.
- Stebbins, G.L., 1985. Polyploidy, hybridization, and the invasion of new habitats. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 72, 824–832.
- Strauss, S.Y., 1994. Levels of herbivory and parasitism in host hybrid zones. *Trends Ecol. Evol.* 9, 209–214.
- Streiff, R., Labbe, T., Bacilieri, R., Steinkellner, H., Glössl, J., 1998. Within population genetic structure in *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. assessed with isozymes and microsatellites. *Mol. Ecol.* 7, 317–328.
- Sydes, M., Peakall, R., 1998. Extensive clonality in the endangered shrub *Haloragodendron lucasii* (Haloragaceae) revealed by allozymes and RAPDs. *Mol. Ecol.* 7, 87–93.
- Szymura, J.M., Barton N.H., 1986. Genetic analysis of a hybrid zone between the fire-bellied toads *Bombina bombina* and *B. variegata*, near Cracow in southern Poland. *Evolution* 40, 1141–1159.

- Thompson, J.D., Lumaret, R., 1992. The evolutionary dynamics of polyploid: origins, establishment and persistence. *Trends Ecol. Evol.* 7, 302–307.
- Tiffney, B.H., Niklas, K.J., 1985. Clonal growth in land plants: a paleobotanical perspective, In: Jackson, J.B.C., Buss, L., Cook, E. (Eds.), *Population biology and evolution of clonal organisms*. Yale University Press, New Haven, Conn., pp. 35–66.
- Tinoco, A., Casas, A., Luna, R., Oyama, K., 2005. Population genetics of *Escontria chiotilla* in wild and silvicultural managed populations in the Tehuacán Valley, Central México. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 52, 525–538.
- Toledo, V.M., Ordonez, M.J., 1993. The biodiversity scenario of Mexico: a review of terrestrial habitats, In: Ramamoorthy, T.P., Bye, R., Lot, A., Fa, J. (Eds.), *Biological Diversity of Mexico*. Oxford University Press, New York, pp. 757–777.
- Tovar-Sánchez, E., Oyama, K., 2004. Natural hybridization and hybrid zones between *Quercus crassifolia* and *Quercus crassipes* (Fagaceae) in Mexico: morphological and molecular evidence. *Am. J. Bot.* 91, 1352–1363.
- Tovar-Sánchez, E., Oyama, K., 2006a. Community structure of canopy arthropods associated to *Quercus crassifolia* × *Quercus crassipes* complex. *Oikos* 112, 370–38.
- Tovar-Sánchez, E., Oyama, K., 2006b. Effect of hybridization of the *Quercus crassifolia* × *Quercus crassipes* complex on the community structure of endophagous insects. *Oecologia* 147, 702–713.
- Tovar-Sánchez, E., Mussali-Galante, P., Esteban-Jiménez, R., Piñero, D., Arias, D.M., Dorado, O., Oyama, K., 2008. Chloroplast DNA polymorphism reveals geographic structure and introgression in the *Quercus crassipes* × *Quercus crassifolia* hybrid complex in Mexico. *Can. J. Bot.* 86, 228–239.
- Ugent, D., 2000. Medicine, myths and magic: The folk healers of a Mexican market. *Econ. Bot.* 54, 27–438.
- Uhl, N.W., Dransfield, J., 1987. *Genera Palmarum*. Allen Press, Lawrence, Kansas.
- Urbanska, K.M., 1987. Disturbance, hybridization and hybrid speciation. In: van Andel J, Bakker, J.P, Snaydon. R.W. (Eds.), *Disturbance in Grasslands*, pp 67–77. Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

- Valéry, L., Fritz, H., Lefeuvre J.C., Simberloff, D., 2008. In search of a real definition of the biological invasion phenomenon itself. *Biological Invasions* 10,1345–1351.
- Velasco, G.J., 1994. La artesanía de la palma en la Mixteca Oaxaqueña. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral regional, Instituto Politécnico Nacional, Unidad Oaxaca, México.
- Villers-Ruiz L., Trejo-Vázquez, I., 2000. El cambio climático y la vegetación en México. In: Una visión hacia el siglo XXI. El cambio climático en México. Edited by C. Gay García. México Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, US Country Studies Program. pp. 239–254.
- Vitousek, P.M., D'Antonio, C.M., Loope, L.L., Rejmánek, M., Westbrooks, R., 1997. Introduced species: a significant component of human caused global change. *New Zealand Journal of Ecology* 21, 1–16.
- Watkinson, A.R., Powell, J.C., 1993. Seedling recruitment and the maintenance of clonal diversity in plant populations—a computer simulation of *Ranunculus repens*. *J. Ecol.* 81, 707–717.
- Welsh, J., McClelland, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18, 7213–7218.
- Westhoff, P., 1998. Molecular development from gene to plant. Oxford University Press, pp. 272.
- Whitham, T.G., Martinsen, G.D., Floate, K.D., Dungey, H.S., Potts, B.M., Keim, P., 1999. Plant hybrid zones affect biodiversity: tools for a genetic-based understanding of community structure. *Ecology* 80, 416–428.
- Whitham, T.G., Morrow, P.A., Potts, B.M., 1991. Conservation of hybrid plants. *Science* 254, 779–780.
- Whitney K.D., Ahern, J.R., Campbell, L.G., Albert L.P., King M.S., 2010. Patterns of hybridization in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 12, 175–182
- Wijesinghe, D.K., Hutchings, M.J., 1997. The effects of spatial scale of environmental heterogeneity on the growth of a clonal plant: an experimental study with *Glechoma hederacea*. *J. Ecol.* 85, 17–28.
- Wilcox, M., Tollefson, D., 1998. Hybridization *Butia* x *Sygarus*. *Principes* 42, 13–14.

- Wilcox, M., Wilcox, E.B., Raulerson, Ch.W., Wass, I.I., Pfahler, P.L., 1990. Practical method for hybridization in the *Syagrus* alliance. Proc. Fla. Hort. Soc. 103, 385–386.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.L., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res. 18, 531–6535.
- Williamson, M., Fitter, A., 1996. The characters of successful invaders. Biological Conservation 78, 163–170.
- Wilson, A.S.G., van der Kamp, B.J., Ritland, C., 2005. Spatial genetic and clonal structure in *Maianthemum dilatatum* as defined by AFLP Markers. Can. J. Bot. 83, 1126–1132.
- Wilson, P., 1992. On inferring hybridity from morphological intermediacy. Taxon 41, 1–23.
- Wolf, D.E., Takebayashi, N., Rieseberg, L.H., 2000. Risk of extinction through hybridization. Cons. Biol. 15, 1039–1053.
- Zar, J.H., 2010. Biostatistical analysis. 4th ed. Prentice Hall. Englewood Cliffs. New Jersey.
- Zona, S., 1990. A Monograph of *Sabal* (Arecaceae: Coryphodeae). Aliso 12, 583–666.
- Zuidema, P.A., Werger, M.J.A., 2000. Impact of artificial defoliation on ramet and genet demography in a Neotropical understory palm, In: Zuidema, P.A. (Eds.), Demography exploited tree species in the Bolivian Amazon. PROMAB, Riberalta, pp. 109–131.

ANEXOS

Introgressive hybridization between *Brahea dulcis* and *Brahea nitida* (Arecaceae) in Mexico: evidence from morphological and PCR–RAPD patterns

R. Ramírez-Rodríguez, E. Tovar-Sánchez, J. Jiménez Ramírez, K. Vega Flores, and V. Rodríguez

Abstract: Gene introgression usually results from spontaneous hybridization among closely related species in sympatric populations. This phenomenon has recently become a frequent topic of interest in evolutionary and conservation biology. A palm species complex occurring in Mexico formed by two native species, *Brahea dulcis* (Kunth) C. Martius and *Brahea nitida* André, and their putative hybrids, was analyzed with morphological and molecular markers in four hybrid zones and two pure sites for each parental species. Our results showed that the closeness of the hybrids to an allopatric site of either parental species (*B. nitida*, mesic habitat, and *B. dulcis*, xeric habitat) is directly related to their morphological and genetic similarity. Also, *B. dulcis* differed significantly from *B. nitida* in all the examined characters. Morphological and molecular data were highly coincident and supported the hypothesized hybridization. Hybrid phenotypes were morphologically parent-like for 46.4% of traits, intermediate for 33.2% of traits, and transgressive for 10.0% of traits. Thus, individual hybrids appear to be a mosaic of parent-like, intermediate, and transgressive phenotypes. Our results suggest that *B. nitida* has been genetically assimilated by *B. dulcis* in Xochiapala, and in the remaining hybrid zones a unidirectional pattern of gene flow towards *B. nitida* exists. Therefore, hybridization may threaten the conservation status of species through genetic assimilation and may confound the ability to distinguish among taxa.

Key words: introgressive hybridization, *Brahea dulcis*, *Brahea nitida*, genetic assimilation, Mexico.

Résumé : L'introgression génétique provient généralement d'hybridations spontanées entre des espèces étroitement reliées dans des populations sympatriques. Ce phénomène est récemment devenu un sujet d'intérêt fréquent en biologie évolutive et en conservation. On observe un complexe de palmiers dans la région de Mexico, formé par deux espèces indigènes, *Brahea dulcis* (Kunth) C. Martius et *Brahea nitida* André, ainsi que leurs hybrides présumés. Les auteurs ont analysé cette population à l'aide de caractéristiques morphologiques ainsi que de marqueurs moléculaires incluant quatre zones d'hybridation et deux sites de populations pures pour chaque espèce parentale. Les résultats montrent que la proximité des hybrides avec un site allopatric d'une ou l'autre des deux espèces parentes (*B. nitida*, habitat mésique et *B. dulcis* habitat xérique) est directement reliée à leur similarité morphologique et génétique. De plus, le *B. dulcis* diffère significativement du *B. nitida* pour tous les caractères examinés. Les données morphologiques et moléculaires montrent une forte coïncidence et supportent l'hypothèse de l'hybridation. Les phénotypes hybrides ressemblent morphologiquement aux parents pour 46.4% des caractères, sont intermédiaires pour 33.2% des caractères et sont transgressifs pour 10.0% des caractères. Ainsi, les hybrides individuels semblent constituer une mosaïque de phénotypes similaires, intermédiaires et transgressifs avec les parents. Les résultats suggèrent que le *B. nitida* a été génétiquement assimilé par le *B. dulcis* dans le Xochiapala, et qu'il existe dans les zones hybrides résiduelles un patron unidirectionnel de flux génétique vers le *B. nitida*. Conséquemment, l'hybridation peut menacer le statut de conservation des espèces via une assimilation génétique et rendre confuse la capacité de distinguer entre les taxons.

Mots-clés : hybridation introgressive, *Brahea dulcis*, *Brahea nitida*, assimilation génétique, Mexique.

[Traduit par la Rédaction]

Received 8 April 2011. Accepted 21 June 2011. Published at www.nrcresearchpress.com/cjb on 25 August 2011.

R. Ramírez-Rodríguez and E. Tovar-Sánchez. CIByC, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Avenue Universidad No. 1001, Col. Chamilpa, C.P. 62209, Cuernavaca Morelos, México.

J. Jiménez Ramírez. Departamento de biología comparada, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-181, Delegación Coyoacán 04510, México, D.F., México.

K. Vega Flores. Herbario y Jardín Botánico, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Edificio 112-A, Ciudad Universitaria, Avenue San Claudio s/n, Col. San Manuel 72570, Puebla, México.

V. Rodríguez. Departamento de biología celular y tisular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-275, Delegación Coyoacán 04510, México, D.F., México.

Corresponding author: E. Tovar-Sánchez (e-mail: efrain_tovar@uaem.mx).

Introduction

Hybridization is a natural phenomenon that occurs in many taxa, but appears to be particularly common in plants (Anderson 1949; Stebbins 1959; Arnold 1992; Rieseberg and Wendel 1993; Ellstrand et al. 1996). Recently it has been documented that at least 25% of plant species, mostly the youngest species, are implicated in hybridization and possible introgression with other species (Mallet 2005). However, the frequency of hybridization varies considerably between families (Ellstrand et al. 1996) and may therefore contribute to the evolutionary process among taxa.

Hybrid zones are geographic regions in which populations of two or more closely related taxa come into contact and where processes of genetic exchange are established among them (Arnold 1997). They persist as a result of a more or less stable balance among selection processes (Barton and Hewitt 1985). Hybridization can also result in rare species extinctions, either directly through genetic assimilation or indirectly by introducing genetic impurities and thereby reducing perceived conservation value (i.e., Rieseberg 1991; Soltis and Gitzendanner 1999; Levin 2000; Perry et al. 2002).

Recent hybrids are usually given lesser conservation status than more ancient hybrids, particularly if hybridization has resulted from anthropogenic influences. Disturbance by human activities, including deforestation (Tovar-Sánchez and Oyama 2004), exotic species introductions (Abbott et al. 2003), and cultivar crosses with wild relatives (Ellstrand et al. 1999), can break down ecological barriers (Allendorf et al. 2001) and increase the probability of hybridization. They therefore form a fascinating natural laboratory that has held the interest of ecologists and taxonomists for the last few decades.

Molecular studies help to explain hybrid ancestry and show that in some studies morphological characters alone do not corroborate unequivocally the existence of hybridization (i.e., Tovar-Sánchez and Oyama 2004; Lau et al. 2005). Whereas first-generation and (or) sterile hybrids are often distinguishable by the intermediacy of their morphological characters (i.e., Fernandez-Manjarres et al. 2006), fully fertile, advanced-generation hybrids may represent a confusing array of characters depending on random segregation and the gradual decay of linkage disequilibrium over time (Rieseberg and Ellstrand 1993; Carney et al. 2000). Morphological variation may not only confound taxonomic identity, but may necessitate an exploration of the degree and potential threats of hybridization and may cause a review of the species' conservation status (Oliva-Tejera et al. 2006). In particular, randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers have been successful in the detection of interspecific hybridization and introgression in plants (i.e., Tovar-Sánchez and Oyama 2004).

Arecaceae is represented by 2779 species and 211 genera (Moore and Uhl 1982). Palms represent an important component of tropical forests because they are conspicuous, abundant, and impact forest community structure. Moreover, approximately 10% of Neotropical palms have been described as components of species complexes, including groups of organisms that exhibit diverse forms. The boundaries between putative species are often obscured by a lack of identified fixed morphological differences and potential hybridization

(Henderson et al. 1995; Borchsenius 1999). The Arecaceae family contains a large number of species in which hybridization may play an important role in evolution and speciation. Horticultural hybrids in existence (>33; Jones 1995) testify to the weakness of genetic barriers towards hybridization in this genus, and the few studies of natural hybridization in Arecaceae confirm this pattern. In general, hybridization phenomena have been registered in 5.2% of the genera and 1% of species (Balick et al. 1987; Wilcox et al. 1990; Jones 1995; Pintaud 2008). In Mexico, Arecaceae contains 100 species and 20 genera (Quero and Yáñez 2000). In particular, the genus *Brahea* is considered typically Mexican and is represented by 13 species (Quero and Yáñez 2000). However, hybridization has not been reported for some species of Mexican palms. The taxonomy and evolutionary relationships of Mexican palms are currently being studied, and some species complexes formed by potential parental species and putative hybrids have been recently detected by taxonomic specialists. We chose two palm species for this study, *Brahea dulcis* (Kunth) C. Martius and *Brahea nitida* André. *Brahea dulcis* is characteristic of xeric habitats and is favored by anthropogenic disturbances (i.e., deforestation and forest fires), improving its establishment and increasing its geographical distribution range; thus, this species is considered an invasive plant and is not subject to conservation status. In contrast, *B. nitida* is associated with mesic habitats and is less frequent in disturbed temperate forest, and thus this species is subject to conservation protection under Mexican conservation law NOM-059-SEMARNAT-2001 (SEMARNAT 2002).

Flowering of *B. dulcis* and *B. nitida* occurs throughout the year (Quero and Yáñez 2000). In general, palms are pollinated by animals such as beetles, bees, flies, ants, and bats (Uhl and Dransfield 1987; Dehgan 1998). Our field observations registered the presence of insects belonging to the orders Coleoptera and Hymenoptera on *B. dulcis* and *B. nitida* flowers. These observations are in agreement with those of other reports in closely related palm species such as *Cryosophila albida* (Henderson 1984) and *Sabal palmetto* (Brown 1976). Seed dispersal in *B. dulcis* is facilitated by coyotes, foxes, birds, and humans (Aguilar 1996; Romero-Morales 2004), but seed dispersal in *B. nitida* is still unknown.

Brahea dulcis and *B. nitida* have noticeable differences in several morphological characters (Quero and Yáñez 2000) when they form allopatric pure stands. However, trees with atypical leaf traits are observed when both species occur in sympatry, suggesting that hybridization may explain the observed variations.

In this paper, we describe and compare the patterns of morphological and genetic variation of the *B. dulcis* × *B. nitida* complex, document the flow and direction of introgressive hybridization in the overlapping zones in Mexico, assess the taxonomic distinctness of the two species and the putative hybrid, and describe whether the degree of genetic admixture could be predicted on the basis of morphology.

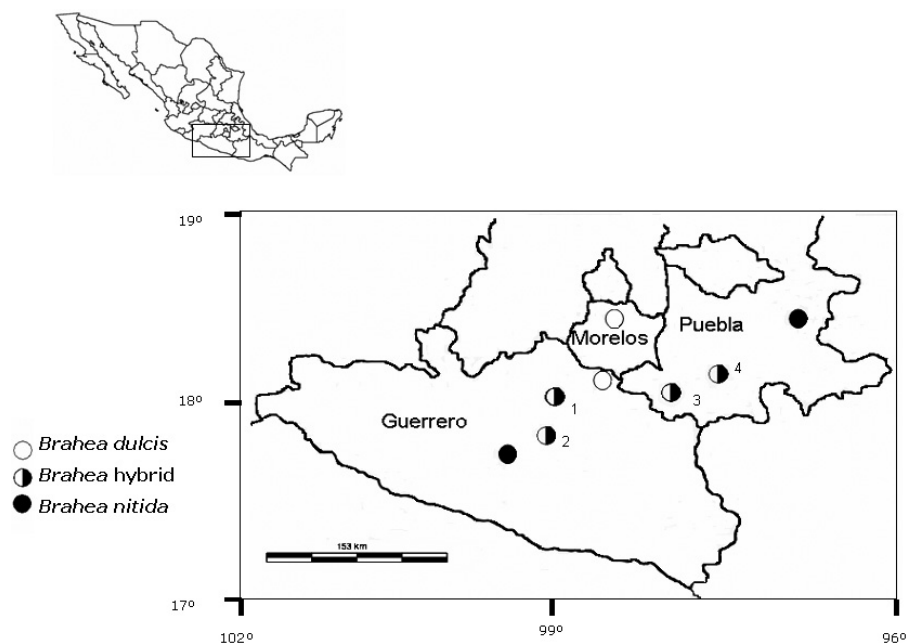
Materials and methods

Study sites

Four sympatric zones were chosen where *B. dulcis* and *B. nitida* overlap geographically. These localities were chosen because they contain the highest numbers of atypical individ-

Table 1. Locality name, state, geographic coordinates, altitude, and sample size for the collecting sites of *Brahea dulcis* and *Brahea nitida* in Mexico.

Locality	State	Latitude (N), longitude (W)	Altitude (m)	Sample size
<i>B. dulcis</i> stand				
Jiutepec	Morelos	18°43'04", 99°08'15"	1457	20
San Juan Teocalcingo	Guerrero	18°21'54", 99°38'45"	1005	20
Mixed stand				
Xochipala	Guerrero	17°48'44", 99°38'36"	1640	30
Xocomanatlan	Guerrero	17°33'15", 99°37'07"	1890	30
San Martín Atexcal	Puebla	18°26'01", 97°39'50"	1800	30
Santiago Nopala	Puebla	18°24'23", 97°39'34"	1890	30
<i>B. nitida</i> stand				
Omiltemi	Guerrero	17°33'10", 99°39'47"	2150	20
Santa Ana	Puebla	18°35'46", 99°22'42"	2270	20

Fig. 1. Map of sampled populations of *Brahea dulcis* × *Brahea nitida* complex. The mixed stands are represented as follows: 1, Xochipala; 2, Xocomanatlan; 3, San Martín Atexcal; 4, Santiago Nopala (located at 1 and 2 in Guerrero state and at 3 and 4 in Puebla state).

uals of this complex. Two allopatric localities were also chosen for each parental species where they are dominant and no hybrids were observed (Table 1, Fig. 1). In general, the hybrids occur in a low frequency sporadically interspersed and near the putative parents. Trees with atypical morphology occur in more disturbed habitats, but we cannot assess the preference of hybrids for some type of habitats (i.e., type of soils, forest gaps). It is rare to find atypical trees outside the contact zones. No evidence exists on another palm species hybridizing with trees of the species studied.

Xocomanatlan is the most conserved area with almost no local disturbance inside the forest. Locally, only one dirt road was registered. There is a *Quercus*–*Pinus* forest with natural regeneration. There are no records of palm species management in the area. San Martín Atexcal and Santiago Nopala have an intermediate state of conservation. There are *Quercus* individuals present, but no natural regeneration of oaks was registered in these areas. The area contains calcareous soil unsuitable for agriculture, and palm *Brahea* is em-

ployed locally to make crafts. Xochipala is a heavily disturbed locality and has suffered a strong reduction in forest availability because of increasing human population density, and some *Quercus* individuals are present. Now, people cut small trees or tree branches for firewood. Local urbanization, modest homes, roadways, presence of livestock, and traditional crops surround the forest.

Morphological data

Transects of 1500 m in sympatric sites and 1000 m in allopatric sites were made. Each 50 m, the nearest individual was sampled. Trees selected met the following characters: (i) height greater than 3 m, (ii) more than five mature leaves with no apparent leaf damage, and (iii) presence of young leaves to extract DNA. Nineteen macromorphological characters of leaves were measured (Table 2) in 200 trees. A total of 120 trees were sampled in the four mixed stands. Twenty trees were sampled in each pure site (two sites for each parental species). Five mature leaves, without any apparent

Table 2. List of the leaf morphological characters examined for the *Brahea dulcis* × *Brahea nitida* complex in Mexico.

Abbreviation	Description
Macromorphological characters	
LP	Length of petiole
LL	Length of lamina
MWL	Maximal width of lamina
LWB	Leaf width at basal one third of leaf
LWA	Leaf width at apical one third of leaf
LCSB	Length of lamina from the base to the central segment bifurcation
NS	Number of segments
S1P	Spine with one peak
S2P	Spine with two peaks
S3P	Spine with three peaks
S4P	Spine with four peaks
WS1P	Width of the spine with one peak
LS1P	Length of the spine with one peak
WS2P	Width of the spine with two peaks
LS2P	Length of the spine with two peaks
WS3P	Width of the spine with three peaks
LS3P	Length of the spine with three peaks
WS4P	Width of the spine with four peaks
LS4P	Length of the spine with four peaks
Micromorphological characters	
Segment	
ST	Segment thickness
MA	Midvein area
MH	Midvein height
NVFA	Nonvascular fibres area
SD	Stomatal density
Midrib	
ML	Midrib length
META	Midrib expansion tissue area

damage, were randomly sampled from each tree. Nineteen macromorphological characters were measured in a total of 1000 leaves.

Also, seven micromorphological characters of nine individual trees in each site were sampled (Table 2). In total, 48 trees were sampled, 12 from the allopatric sites (tree individuals per site) and 36 from sympatric sites (tree individuals per taxa per site). Three leaves per each individual were randomly collected and fixed with formaldehyde – acetic acid – alcohol – water). In the laboratory the leaves were dehydrated with alcohol at different concentrations, then they were put in xylene and embedded in paraffin. From each leaf, four tissue sections of 5 µm were obtained; thereafter, they were dried at 60 °C for 30 min and then incubated in xylene for 20 min. Tissue sections were rehydrated with decreasing alcohol concentrations for 15 min and stained with Safranin O, rehydrated again, and contrasted with Fast Green FCF for 2 min. Finally, sections were dehydrated, mounted with synthetic resin, and dried at 60 °C for 15 days. A total of 576 tissue sections were obtained.

To determine stomatal density, three leaves were randomly chosen from each individual. Systematically, the middle part of the central segment of each leaf was analyzed by the replicate technique with cyanoacrylate glue. A total of 96 tissue sections were obtained. All tissue sections were observed

with a Nikon Eclipse 80i microscope at 10×, and all samples were analyzed using the NIS-Elements image analyzer (Melville, N.Y.).

Molecular data

We collected young undamaged leaves from 200 trees distributed in four mixed stands ($n = 120$) and 40 trees in two pure zones for each parental species. Total DNA was extracted using a DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, Calif.). A genetic analysis was performed using RAPD (Welsh and McClelland 1990; Williams et al. 1990) and the polymerase chain reaction (PCR). Forty-eight 10-bp primers of random sequence (Kits A, B, C; Operon Technologies, Alameda, Calif.) were tested to find specific, diagnostic markers for each parental species. Diagnostic markers are those that are present in all individuals of one species and absent in a second species, while species-specific markers are those unique to one species but not necessarily present in all individuals within the species (Howard et al. 1997). Lastly, 200 individuals were tested using four primers (six diagnostic markers (*B. dulcis*: OPA-1, OPA-2, OPA-4, OPB-4; *B. nitida*: OPB-4) and two species-specific markers (*B. nitida*: OPA-1, OPB-4)). DNA fragments were separated by electrophoresis in a 1.5% agarose gel. The gel was stained with ethidium bromide and developed on an UV table. The molecular mass of the DNA fragments was estimated with a 1-kb DNA ladder.

Statistical analysis

Nested variance analyses were conducted (ANOVA) to determine the effects of palm species and locality on the morphological leaf variability of each of the 26 studied characters (Table 2). Putative hybrids were not included in this analysis. Trees were considered a random factor nested within species because they were representative of each population. Percentage data were corrected as $X = \arcsin(\%x)^{1/2}$, and discontinuous data were transformed as $X = x^{1/2} + 0.5$ (Zar 2010).

Molecular analyses allowed us to determine the genetic identity of each individual (*B. dulcis*, *B. nitida*, or putative hybrids) inside the sympatric zones. Thereafter, character count (Wilson 1992) and phenotypic characterization (Schwarzbach et al. 2001) procedures from the four hybrid zones of the *B. dulcis* × *B. nitida* complex were used as follows.

Twenty-six characters were measured for the character count procedure to determine hybrids with intermediate leaf morphology of the *B. dulcis* × *B. nitida* complex following the procedure of Wilson (1992). This method is based on selection of characters showing significant differences between the supposed parental groups, followed by a binomial sign test (Zar 2010) of intermediate versus nonintermediate traits. Briefly, groups for each taxa were formed (*B. dulcis*, *B. nitida*, and the putative hybrids). Then a one-way ANOVA test was performed to determine the effect of taxa on each morphological character. Thereafter, a multiple comparison test (Tukey) was used to determine whether the putative hybrids present intermediate characters with respect to their putative parental species. A positive sign denotes an intermediate character, while a negative sign represents a nonintermediate character.

Also, to determine the number of intermediate, transgres-

Table 3. Mean \pm SE and nested ANOVA results (F statistics) for all morphological characters of *Brahea dulcis* and *Brahea nitida* in Mexico.

Character	Units	<i>B. dulcis</i>	<i>B. nitida</i>	Species F	Locality F
Macromorphological characters					
LP	cm	61.21 \pm 0.80	57.54 \pm 0.74	9.43***	64.97***
LL	cm	80.71 \pm 0.95	77.00 \pm 0.55	12.11**	38.09***
MWL	cm	79.74 \pm 2.73	87.42 \pm 1.31	3.86*	59.25***
LWB	cm	66.88 \pm 1.22	79.58 \pm 1.35	47.45***	191.49***
LWA	cm	65.68 \pm 1.43	70.06 \pm 1.67	5.71***	235.91***
LCSB	cm	37.95 \pm 0.43	40.63 \pm 0.46	17.59***	75.25***
NS	No.	29.19 \pm 0.19	26.41 \pm 0.21	93.24***	47.55***
S1P	No.	5.68 \pm 0.17	0.01 \pm 0.01	1262.71***	54.23***
S2P	No.	2.50 \pm 0.08	0.00 \pm 0.00	1243.61***	36.41***
S3P	No.	0.99 \pm 0.05	0.00 \pm 0.00	478.86***	30.00***
S4P	No.	0.30 \pm 0.03	0.00 \pm 0.00	125.85***	13.70***
WS1P	mm	2.15 \pm 0.04	0.00 \pm 0.00	3377.80***	82.39***
LS1P	mm	2.20 \pm 0.05	0.00 \pm 0.00	1839.89***	67.35***
WS2P	mm	3.01 \pm 0.06	0.00 \pm 0.00	2629.97***	84.40***
LS2P	mm	2.18 \pm 0.10	0.00 \pm 0.00	584.55***	36.30***
WS3P	mm	3.20 \pm 0.13	0.00 \pm 0.00	728.48***	45.18***
LS3P	mm	1.68 \pm 0.07	0.00 \pm 0.00	661.954***	39.44***
WS4P	mm	1.72 \pm 0.15	0.00 \pm 0.00	142.93***	17.56***
LS4P	mm	0.65 \pm 0.06	0.00 \pm 0.00	138.52***	14.87***
Micromorphological characters					
ST	μ m	27.96 \pm 0.46	31.77 \pm 0.76	16.58***	11.57***
MA	μ m	383.91 \pm 16.20	470.33 \pm 24.99	7.79**	13.35***
MH	μ m	20.91 \pm 0.61	26.19 \pm 0.81	25.74***	11.83***
NVFA	μ m	39.09 \pm 1.09	28.99 \pm 1.07	43.32***	9.08***
SD	No.	97.31 \pm 1.63	107.91 \pm 1.39	19.68***	2.04***
ML	μ m	40.31 \pm 1.60	55.04 \pm 2.09	29.05***	9.86***
META	μ m	699.52 \pm 68.29	1816.49 \pm 125.29	55.35***	10.58***

Note: Abbreviations of characters are described in Table 2. Significance of F : *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.001$.

sive, and parent-like characters in each sympatric zone (Schwarzbach et al. 2001), the phenotypic characterization method was used. Twenty-six characters were analyzed using a one-way ANOVA test with taxa (*B. dulcis*, *B. nitida*, putative hybrids) as the independent variable. Significant mean differences between taxa were determined with a multiple comparison test (Tukey). When a character differed significantly between taxa, the character was reported as transgressive (negative or positive) if the value for the hybrids significantly exceeded the parental values. Otherwise the character of the hybrids was reported as intermediate, *B. dulcis*-like, or *B. nitida*-like.

Principal component analysis was used to assess the most useful character for taxonomic ordination between *B. dulcis* and *B. nitida*. Moreover, to know the degree of importance of each morphological character in the ordination model, the Pearson (r) correlation was conducted between each variable (morphological character) and each principal component ($\alpha < 0.05$).

Finally, correlation analysis was used to assess the correlation between morphological and molecular markers in the *B. dulcis* \times *B. nitida* complex. STATISTICA 6.0 for Windows was used for all the statistical analyses (Statsoft 1998).

The maximum likelihood (ML) hybrid index score from RAPD analysis was calculated using Hardig-Hybrid software (Hardig et al. 2000). This index is useful to identify intermediate individuals, showing backcrosses as well as the

structures of hybrid swarms. The results were represented in a frequency histogram for each mixed stand and for the pure sites. A Mantel Z test matrix and Tools for Population Genetic Analyses (version 1.3) were used to test isolation by distance, as well as to create a general cluster diagram for the mixed stands and the four pure zones (Miller 1997).

Results

Morphological analysis for parental and hybrid trees

All the examined characters in *B. dulcis* differ significantly from those of *B. nitida*. Locality had highly significant effects on each of the measured leaf characters (Table 3). Spine characters (length, width, and number of spines) were clearly separated without overlap between the two species in the pure zones as well as in the mixed stands and can be considered species-specific characters. In general, hybrids presented morphological leaf traits that were intermediate between *B. dulcis* and *B. nitida*. The binomial sign analysis showed that the deviation was highly significant ($P < 0.001$), resulting in the hybridization hypothesis being accepted in three sympatric zones (Xocomanatlan, Xochipala, and Santiago Nopala). Intermediate characters were found in 22 of 26 examined characters of the samples from Xocomanatlan; 20 of 26 examined characters in the samples from Santiago Nopala; 18 of 26 examined characters in the samples from Xochipala; and 11 of 26 examined characters in the samples from San

Table 4. Character count (Wilson 1992) and phenotypic characterization (Schwarzbach et al. 2001) procedure from the four hybrid zones of the *Brahea dulcis* × *Brahea nitida* complex in Mexico.

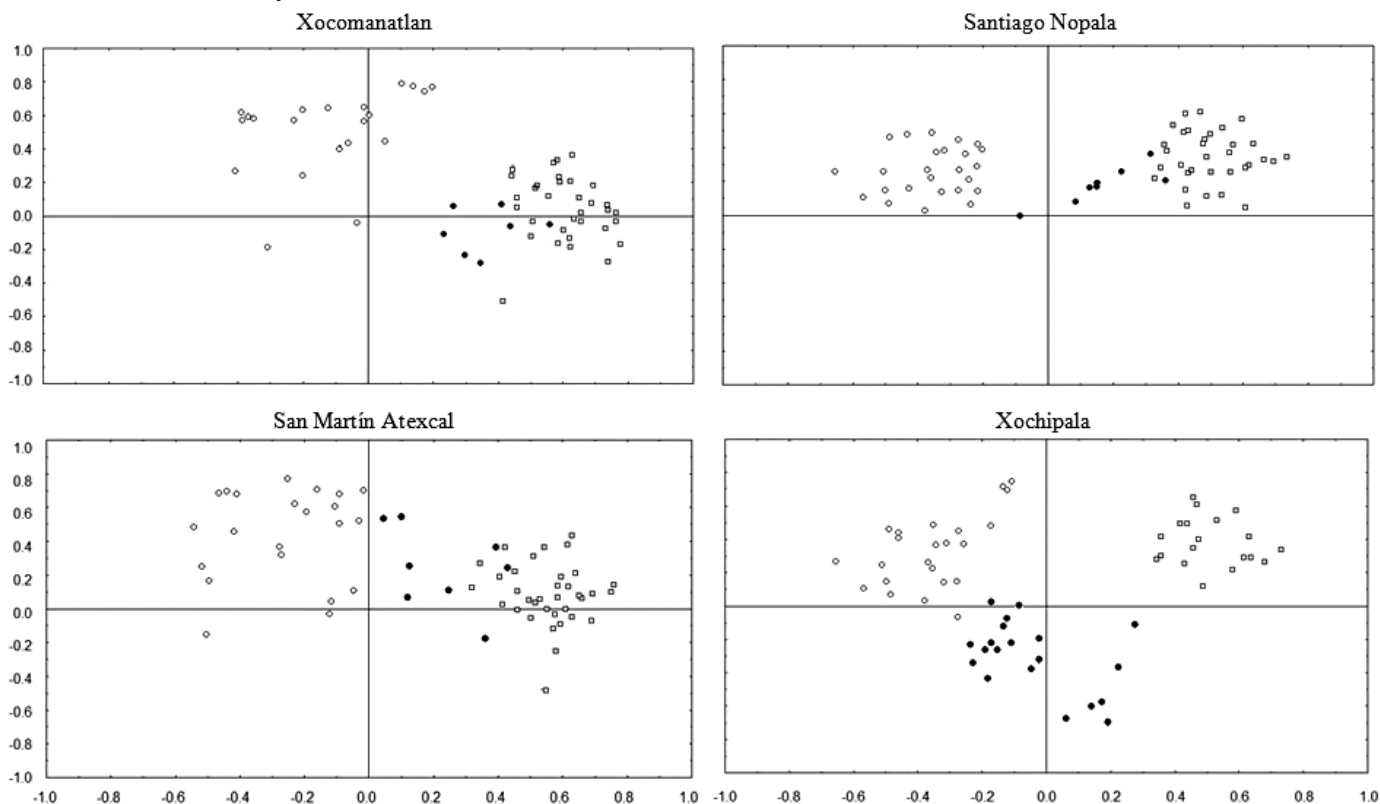
Character	<i>B. dulcis</i> (mean ± SD)	Hybrid (mean ± SD)	<i>B. nitida</i> (mean ± SD)	Is the hybrid intermediate?	Hybrid phenotype
Xocomanatlan					
LP	67.99±1.14	70.13±2.20	55.19±2.40	–	<i>B. dulcis</i> -like
LL	83.40±1.08	78.69±1.42	75.44±1.20	+	<i>B. nitida</i> -like
MWL	96.19±1.41	105.92±2.10	107.15±1.95	+	<i>B. nitida</i> -like
LWB	91.81±1.42	103.22±1.84	104.40±2.16	+	<i>B. nitida</i> -like
LWA	77.69±1.45	85.70±1.30	89.93±1.81	+	<i>B. nitida</i> -like
LCSB	44.88±0.59	44.20±0.91	43.70±0.71	–	ns
NS	32.73±0.35	31.83±0.69	27.84±0.55	+	<i>B. dulcis</i> -like
S1P	5.07±0.29	6.30±0.82	0.02±0.02	–	<i>B. dulcis</i> -like
S2P	2.39±0.18	1.57±0.36	0.00±0.00	+	Intermediate
S3P	0.61±0.09	0.17±0.07	0.00±0.00	+	<i>B. nitida</i> -like
S4P	0.16±0.04	0.13±0.06	0.00±0.00	+	Intermediate
WS1P	2.46±0.08	1.39±0.15	0.00±0.00	+	Intermediate
LS1P	2.51±0.14	0.92±0.12	0.00±0.00	+	Intermediate
WS2P	3.49±0.14	2.00±0.29	0.00±0.00	+	Intermediate
LS2P	2.46±0.12	0.76±0.12	0.00±0.00	+	Intermediate
WS3P	4.48±0.30	0.79±0.35	0.00±0.00	+	<i>B. nitida</i> -like
LS3P	2.10±0.15	0.17±0.07	0.00±0.00	+	<i>B. nitida</i> -like
WS4P	2.82±0.42	1.00±0.50	0.00±0.00	+	<i>B. nitida</i> -like
LS4P	0.96±0.14	0.17±0.14	0.00±0.00	+	<i>B. nitida</i> -like
ST	26.04±1.10	27.73±0.88	30.19±0.90	+	<i>B. nitida</i> -like
MA	334.26±48.32	326.78±8.67	285.39±27.02	+	ns
MH	26.40±1.10	26.56±0.88	30.19±0.90	+	Intermediate
NVFA	37.05±2.60	23.81±1.46	28.73±3.79	–	<i>B. nitida</i> -like
SD	95.08±2.97	110.44±2.78	114.85±3.62	+	<i>B. nitida</i> -like
ML	37.79±3.73	46.47±1.96	53.74±2.56	+	Intermediate
META	892.66±58.96	1142.39±59.60	1285.53±74.41	+	Intermediate
Subtotal				22 (+), 4 (–)	
Santiago Nopala					
LP	39.34±1.33	40.45±0.85	41.98±1.55	+	Intermediate
LL	65.54±0.74	71.92±1.04	66.05±1.05	–	Pos. transgressive
MWL	57.03±1.81	64.20±2.08	61.42±1.42	–	<i>B. nitida</i> -like
LWB	52.74±1.67	58.45±2.10	54.43±1.76	+	Pos. transgressive
LWA	47.18±1.85	50.32±1.55	51.16±1.47	+	<i>B. nitida</i> -like
LCSB	28.96±0.95	32.98±0.86	30.71±0.65	–	<i>B. nitida</i> -like
NS	27.00±0.51	26.73±0.53	24.09±0.67	+	<i>B. dulcis</i> -like
S1P	7.82±0.51	7.67±0.79	0.00±0.00	+	Intermediate
S2P	2.82±0.27	0.83±0.18	0.00±0.00	+	Intermediate
S3P	0.53±0.11	0.17±0.07	0.00±0.00	+	<i>B. nitida</i> -like
S4P	0.12±0.06	0.00±0.00	0.00±0.00	–	<i>B. nitida</i> -like
WS1P	1.69±0.10	0.63±0.09	0.00±0.00	+	Intermediate
LS1P	1.65±0.09	0.48±0.08	0.00±0.00	+	Intermediate
WS2P	2.33±0.19	0.48±0.11	0.00±0.00	+	Intermediate
LS2P	1.56±0.13	0.23±0.06	0.00±0.00	+	Intermediate
WS3P	0.62±0.32	0.32±0.12	0.00±0.00	+	<i>B. nitida</i> -like
LS3P	0.82±0.18	0.15±0.06	0.00±0.00	+	<i>B. nitida</i> -like
WS4P	0.40±0.23	0.00±0.00	0.00±0.00	–	<i>B. nitida</i> -like
LS4P	0.15±0.08	0.00±0.00	0.00±0.00	–	<i>B. nitida</i> -like
ST	30.09±1.33	35.72±3.53	38.53±0.40	+	Intermediate
MA	333.81±16.80	473.15±60.53	607.96±46.50	+	Intermediate
MH	21.18±0.73	26.22±2.13	31.25±1.06	+	Intermediate
NVFA	40.50±1.59	35.91±1.96	32.89±1.73	+	Intermediate
SD	88.05±0.5	89.93±4.24	104±0.81	+	<i>B. dulcis</i> -like
ML	48.74±3.73	51.97±5.47	65.91±3.66	+	Intermediate
META	424.34±132.34	1188.10±331.16	2282.12±318.014	+	<i>B. dulcis</i> -like
Subtotal				20 (+), 6 (–)	

Table 4 (concluded).

Character	<i>B. dulcis</i> (mean ± SD)	Hybrid (mean ± SD)	<i>B. nitida</i> (mean ± SD)	Is the hybrid intermediate?	Hybrid phenotype
San Martín Atexcal					
LP	45.51±1.46	54.14±2.70	50.28±1.58	–	Pos. transgressive
LL	68.29±1.08	76.33±1.85	77.33±1.56	+	<i>B. nitida</i> -like
MWL	33.41±1.80	57.26±2.13	57.26±2.35	–	<i>B. nitida</i> -like
LWB	26.21±1.47	50.22±2.07	46.08±2.36	–	<i>B. nitida</i> -like
LWA	27.78±1.45	44.64±1.78	42.41±2.12	–	<i>B. nitida</i> -like
LCSB	30.59±0.92	33.55±1.50	32.85±0.88	–	ns
NS	26.91±0.71	27.24±0.64	25.03±0.38	–	<i>B. dulcis</i> -like
S1P	7.15±0.53	6.63±0.79	0.48±0.19	+	<i>B. dulcis</i> -like
S2P	3.11±0.28	0.33±0.10	0.24±0.11	+	<i>B. nitida</i> -like
S3P	0.83±0.18	0.00±0.00	0.10±0.05	–	<i>B. nitida</i> -like
S4P	0.03±0.02	0.00±0.00	0.03±0.02	–	ns
WS1P	2.14±0.09	0.87±0.08	0.14±0.06	+	Intermediate
LS1P	2.07±0.09	0.60±0.06	0.14±0.06	+	Intermediate
WS2P	2.78±0.18	0.43±0.12	0.20±0.08	+	<i>B. nitida</i> -like
LS2P	2.02±0.13	0.19±0.06	0.14±0.06	+	<i>B. nitida</i> -like
WS3P	2.15±0.40	0.00±0.00	0.22±0.10	–	<i>B. nitida</i> -like
LS3P	1.01±0.19	0.00±0.00	0.09±0.04	–	<i>B. nitida</i> -like
WS4P	0.15±0.14	0.00±0.00	0.06±0.05	–	ns
LS4P	0.15±0.14	0.00±0.00	0.06±0.05	–	ns
ST	27.63±1.09	33.26±2.33	34.98±1.18	+	Intermediate
MA	244.95±9.87	474.61±64.81	465.14±33.93	–	<i>B. nitida</i> -like
MH	20.84±1.00	26.26±2.33	27.92±1.62	+	ns
NVFA	36.00±2.81	30.78±2.79	35.22±3.10	–	ns
SD	91.48±2.47	108.44±3.18	109.46±2.40	+	<i>B. nitida</i> -like
ML	51.87±6.51	49.30±2.77	52.15±3.17	–	ns
META	435.38±76.01	1350.76±298.91	1454.82±226.39	+	<i>B. nitida</i> -like
Subtotal					11 (+), 15 (–)
Xochipala					
LP	56.13±1.65	59.71±1.70	59.88±1.75	+	Intermediate
LL	69.89±0.79	74.59±2.22	76.68±1.17	+	<i>B. nitida</i> -like
MWL	61.38±1.34	78.90±3.99	87.08±2.78	+	<i>B. nitida</i> -like
LWB	55.18±1.41	70.58±3.52	80.80±2.81	+	Intermediate
LWA	51.47±1.21	67.83±3.43	68.13±2.31	+	<i>B. nitida</i> -like
LCSB	36.19±0.87	44.97±2.80	38.95±0.98	–	Pos. transgressive
NS	27.17±0.39	27.67±0.54	26.39±0.41	–	ns
S1P	5.48±0.45	7.67±0.71	0.00±0.00	–	Pos. transgressive
S2P	2.75±0.16	1.40±0.28	0.00±0.00	+	Intermediate
S3P	1.05±0.13	0.63±0.15	0.00±0.00	+	Intermediate
S4P	0.32±0.07	0.17±0.07	0.00±0.00	+	Intermediate
WS1P	2.17±0.12	1.29±0.13	0.00±0.00	+	Intermediate
LS1P	2.11±0.10	1.30±0.12	0.00±0.00	+	Intermediate
WS2P	2.83±0.13	1.24±0.20	0.00±0.00	+	Intermediate
LS2P	1.90±0.11	1.07±0.18	0.00±0.00	+	Intermediate
WS3P	3.40±0.29	1.61±0.34	0.00±0.00	+	Intermediate
LS3P	2.14±0.18	0.74±0.17	0.00±0.00	+	Intermediate
WS4P	2.58±0.42	1.00±0.39	0.00±0.00	+	<i>B. nitida</i> -like
LS4P	1.08±0.18	0.36±0.15	0.00±0.00	+	<i>B. nitida</i> -like
ST	24.98±0.89	24.00±0.59	24.98±0.97	–	ns
MA	303.60±17.57	261.93±33.39	284.39±22.57	–	ns
MH	17.23±0.82	18.59±0.66	18.59±0.80	–	ns
NVFA	45.38±2.29	28.29±2.13	24.34±1.45	+	<i>B. nitida</i> -like
SD	88.95±4.47	118.27±4.42	112.38±2.45	–	<i>B. nitida</i> -like
ML	35.30±3.92	38.97±3.47	36.79±6.75	–	ns
META	383.29±128.66	576.67±155.59	1146.27±277.92	+	<i>B. nitida</i> -like
Subtotal					18 (+), 8 (–)

Note: Abbreviations of characters are described in Table 2. +, the hybrid is intermediate between the parental species; –, the hybrid is not intermediate; ns, not significant; pos. transgressive, positive transgressive.

Fig. 2. Principal components analysis for leaf micromorphological and macromorphological variation in the *Brahea dulcis* × *Brahea nitida* complex (26 measured characters) in four sympatric zones in Mexico. Plants marked as hybrids were identified using genetic markers. ○, *Brahea dulcis*; ●, *Brahea* hybrid; □, *Brahea nitida*.



Martín Atexcal. In this last sympatric zone the hybridization hypothesis was not accepted (Table 4).

In general, the hybrid phenotype was morphologically *B. nitida*-like for 38.9% of traits, intermediate for 33.2% of traits, and transgressive for 10.0% of traits, and *B. dulcis*-like for 7.5% of traits. The remaining 10.4% of the traits did not differ among the three taxa.

Phenotypic characterization showed the following patterns in each sympatric zone. San Martín Atexcal was morphologically *B. nitida*-like for 50.0% of traits, intermediate for 11.5% of traits, *B. dulcis*-like for 7.7% of traits, positive transgressive for 3.8% of traits, and did not differ among the three taxa for 26.9% of traits. Xocomanatlan was morphologically *B. nitida*-like for 46.1% of traits, intermediate for 34.6% of traits, *B. dulcis*-like for 11.6% of traits, and did not differ among the three taxa for 7.7% of traits. Xochipala was morphologically intermediate for 43.3% of traits, *B. nitida*-like for 30.8% of traits, positive transgressive for 7.7% of traits, and did not differ among the three taxa for 19.3% of traits. Santiago Nopala was morphologically intermediate for 46.1% of traits, *B. nitida*-like for 34.6% of traits, *B. dulcis*-like for 11.6% of traits, and positive transgressive for 7.7% of traits.

For the *B. dulcis* × *B. nitida* comparison, one highly significant ($P < 0.001$) component axis accounted for between 88.61% (Xocomanatlan) and 98.40% (Santiago Nopala) of the variation among taxa. For the four sympatric zones, principal components analysis showed the separation between taxa. Principal components analysis for leaf micromorphology and macromorphology variation showed that in general the characters that presented a better correlation with PC1

were foliar size characters: MWL, LCSB, LP, and LWB in Santiago Nopala and Xochipala, while in Xocomanatlan and San Martín Atexcal it was MWL, LL, and LWA. On the other hand, the best correlated orders with PC2 were in characters in the spine: S1P, LS4P, and S4P in San Martín Atexcal and Xocomatlan, while in Xochipala and Santiago Nopala micromorphological characters MA and META showed the best correlation with this component (Fig. 2).

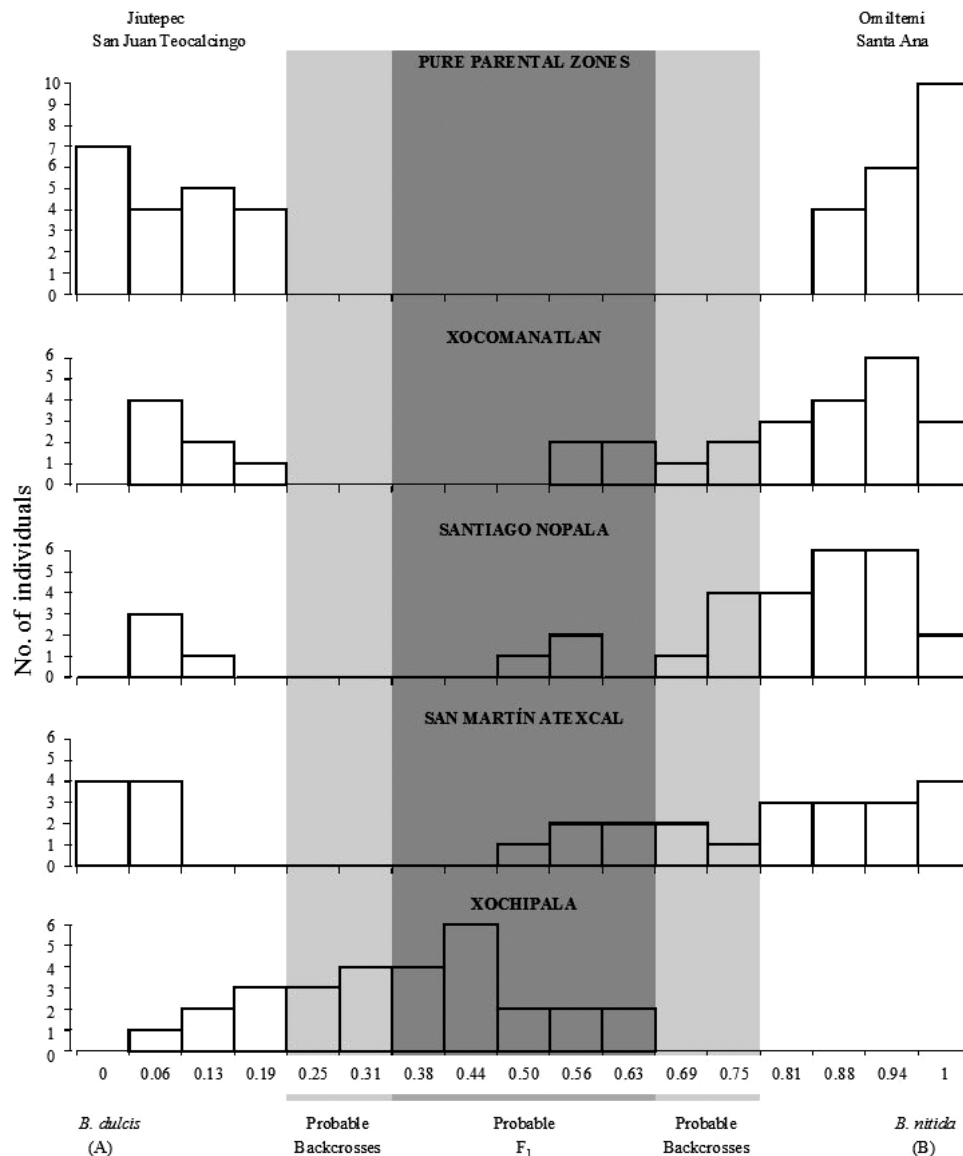
Genetic analysis (RAPD) of the *B. dulcis* × *B. nitida* complex

We used six diagnostic markers and two species-specific markers to estimate the genetic status of *B. dulcis* and *B. nitida* trees morphologically identified as “pure” or “hybrid” plants. These primers yielded a total of 31 distinct markers (bands). The RAPD analysis proved to be a powerful tool for characterizing individuals that were a hybrid of *B. dulcis* and *B. nitida*. The analysis of the ML hybrid index using four RAPD markers supported the field identification of 200 trees (Fig. 3).

In hybrid zones, few trees had perfect marker additivity, as may be expected in F1 (3.4%), but 23.7% of individuals were interpreted as F1, 11.9% deviated by only one character (0.437–0.562), and 8.5% deviated by only two characters (0.375–0.625). Also, 9.3% were interpreted as backcrosses toward *B. nitida* (0.250–0.312) and 5.9% as backcrosses toward *B. dulcis* (0.687–0.750) (Fig. 3).

The mean ML hybrid index for *B. nitida* individuals was (SD in parentheses) 0.92 (0.06), 0.09 (0.07) for *B. dulcis*, and 0.58 (0.14) for the hybrids.

Fig. 3. Frequency distribution of individuals versus the Hardig hybrid index derived from randomly amplified polymorphic DNA band data using four primers. The number of individuals of each plant evaluated is represented. The figure shows cluster results of the pure or nearly pure parentals in four zones (index = 0 or 1), a cluster of probable F₁ hybrids (index = 0.437–0.562), probable backcrosses toward *Brahea dulcis* (index = 0.687–0.750), and finally probable backcrosses towards *Brahea nitida* (index = 0.250–0.312).



The analysis of the ML hybrid index using six RAPD markers supported the field identification of 200 plants (Fig. 3). Four individuals in San Martín Atexcal were classified as *B. dulcis* in the field, but the index showed that they were hybrids. Eleven individuals in Xochipala and one in San Martín Atexcal were classified as *B. nitida* in the field, but the index showed that nine were hybrids F₁ and three were backcrosses towards *B. nitida*. Four individuals in Santiago Nopala and three in Xocomanatlan as well as four in San Martín Atexcal, were marked as hybrids, but the index showed that they were individuals of *B. nitida* and *B. dulcis*, respectively.

Regression analyses showed a positive and significant relationship between morphological traits and molecular markers for Xochipala ($r = 0.33$, $P < 0.05$), Santiago Nopala ($r = 0.48$, $P < 0.05$), Xocomanatlan ($r = 0.55$, $P < 0.05$), and San Martín Atexcal ($r = 0.57$, $P < 0.05$).

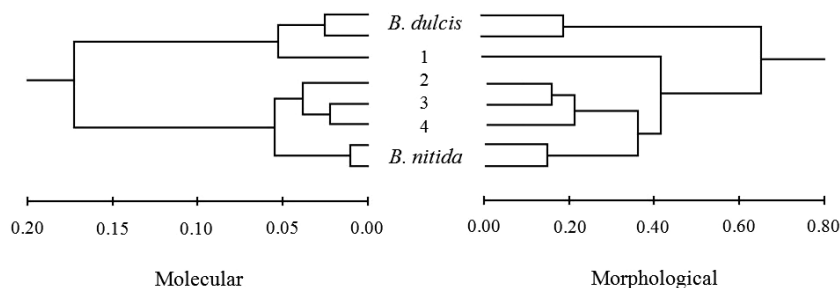
The cluster analysis for genetic (RAPD) and morphological data showed that these are very similar. The allopatric zones (two zones for *B. dulcis* and two for *B. nitida*) were located at the edges, while the four hybrid zones were located between them (Fig. 4). In particular, Santiago Nopala, San Martín Atexcal, and Xocomanatlan were more similar towards *B. nitida*, while Xochipala was more similar towards *B. dulcis*.

The Mantel Z test matrix showed that no correlation exists between the geographic distances and the genetic distances for any of the species (*B. dulcis*, $r = 0.36$, $P > 0.05$; *B. nitida*, $r = 0.32$, $P > 0.05$). Genetic distance between populations varied from 0.024 to 0.16.

Discussion

Palms frequently present complex patterns of variation,

Fig. 4. Phenogram of similarity based on leaf morphology and randomly amplified polymorphic DNA data in four hybrids zones of the *Brahea dulcis* and *Brahea nitida* complex in Mexico. The mixed stands are represented as follows: 1, Xochipala; 2, Santiago Nopala; 3, Xocomanatlan; 4, San Martín Atexcal.



leading to taxonomic problems in differentiating species (Uhl and Dransfield 1987; Quero 1989). Interspecific hybridization and shared ancestral polymorphisms are two of the most common explanations for the observed patterns of variation (Jensen et al. 1993; Kleinschmit et al. 1995; Bruschi et al. 2000; Tovar-Sánchez and Oyama 2004). *Brahea dulcis* and *B. nitida* form hybrids, but they remain morphologically distinct in their allopatric and sympatric distribution, except in one (Xochipala) of the four sympatric zones, where *B. nitida* pure individuals were not able to be genetically identified. All the examined micromorphological and macromorphological leaf characters in these species differed significantly by locality and by species. Relatively few diagnostic molecular markers and species-specific markers differentiated between *B. dulcis* and *B. nitida*. However, these markers demonstrated geographic consistency in support of the morphological evidence, indicating that each species is distinct and that each has some degree of genetic cohesiveness.

Furthermore, the character count procedure allowed us to confirm statistically that individuals with atypical leaf morphology are the result of hybridization between *B. dulcis* and *B. nitida* in the four hybrid zones. Hence, phenotypic characterization showed that hybrid trees of the *B. dulcis* × *B. nitida* complex are a mosaic of parent-like, intermediate, and transgressive phenotypes. The proportion of transgressive traits reported in this study (10.0%), as well as the proportion of hybrid parent-like (46.4%) characters and the proportion of intermediate phenotype traits (33.2%), are in accordance with the values reported by Rieseberg and Ellstrand (1993), who documented values of 16%, 48.7%, and 35.3%, respectively.

These phenotypic patterns may suggest that hybrid taxa have the ability to colonize a different habitat from that preferred by either putative species. In other words, a new combination of parental traits may facilitate hybrids to colonize intermediate, novel, or extreme habitats or may indicate that habitat divergence has evolved gradually via the fixation of favorable mutations. Therefore, the new phenotypic novelty of putative hybrids of *B. dulcis* × *B. nitida* may provide the raw material for adaptation to a new habitat and a possible niche divergence (Strauss 1994; Fritz et al. 1999; Rieseberg et al. 1999; Orians 2000; Rieseberg and Willis 2007).

Phenotypic characterization varied among sympatric zones — which might be seen as a differential dynamic process of gene flow between individuals of *B. dulcis* × *B. nitida* complex — and the particular environmental conditions in each locality. This last statement is supported by the principal components

analyses, which showed that among sympatric zones there is a complex array of intermediate and transgressive individuals.

The genetic results indicate that the introgression process is present in both species, but the direction of introgression depends on the habitat characteristics (mesic or xeric) of the hybrid zones. The hybrid zones closest to the mesic habitat (Santiago Nopala, San Martín Atexcal, and Xocomanatlan) registered unidirectional introgression towards *B. nitida*, while the hybrids from the closest xeric habitat (Xochipala) registered unidirectional introgression towards *B. dulcis*. These findings suggest that the closeness of hybrids to an allopatric site of either parental species (*B. nitida*, mesic habitat; *B. dulcis*, xeric habitat) is directly related to their similarity and vice versa. This last scenario is supported by the study of Tovar-Sánchez and Oyama (2004) in *Quercus crassifolia* × *Quercus crassipes* complex in Mexico.

Levels of conservation of the sympatric zones showed the following pattern: Xocomanatlan > San Martín Atexcal = Santiago Nopala > Xochipala. A similar pattern was recorded with the abundance of hybrid and introgressive trees, showing a relationship between degree of disturbance and abundance of hybrids and backcrosses (Arnold et al. 1990; Klier et al. 1991). The hybrid zone with the highest levels of disturbance (Xochipala) was the one with the highest number of hybrids and introgressive individuals, and *B. nitida* pure individuals were not able to be genetically identified. Disturbances produced by human activities such as logging, deforestation, fires, and agriculture may enhance the establishment of hybrids, as they modify reproductive barriers (Arnold et al. 1990; Klier et al. 1991). In this sense, the change in land use by human activities can promote the interaction of populations of species previously isolated (Tovar-Sánchez and Oyama 2004). Disturbance areas can facilitate hybrid lineages to colonize these new habitats (i.e., intermediate, extreme, or novel relative to that of either parent) owing to the mosaic of phenotypic traits present (parent-like, intermediate, and transgressive).

This study suggests the need to reconsider appropriate conservation strategies for *B. nitida* (species subject to protection NOM-059-SEMARNAT-2001; SEMARNAT 2002), because in the Xochipala sympatric zone *B. nitida* pure individuals were not able to be genetically identified. In Xochipala, a genetic continuum was documented between *B. dulcis* and hybrid plants. We considered that it is important to develop appropriate strategies of conservation in the other three sympatric zones (Xocomanatlan, Santiago Nopala, and San Martín Atexcal), because putative parental species (native species

in Mexico) have some degree of genetic cohesiveness. Also, unidirectional hybridization towards one parental species (*B. nitida*) produces a continuum of hybrid genotypes with one parental species; therefore, it is probable that the existence of hybrids poses a threat to the remaining pure populations of *B. nitida*.

Morphological variation in the sympatric zones often generates confusion as to taxonomic identity. In particular, our study in Xochipala indicates that correct determination of genetic hybrids using leaf morphology is poor. Because there are more introgressed forms than there are morphologically pure individuals of *B. nitida*, it will not be possible to remove hybrids and backcrosses towards *B. dulcis* from Xochipala to preserve morphologically pure *B. dulcis* individuals. Thus, it may be preferable to adjust our conservation focus in this sympatric zone and to consider the value of this population in terms of the opportunity it presents for conserving genetic diversity of a native species. Also, hybrid zones are centers of plant speciation and biodiversity across diverse trophic levels (Whitham et al. 1999; Bangert et al. 2005; Tovar-Sánchez and Oyama 2006a, 2006b). Therefore, they are particularly important for preserving our biotic heritage.

Our study suggests that sympatric zones of *B. dulcis* and *B. nitida* show population declines of *B. nitida* caused by disturbance and unidirectional introgression towards *B. nitida*, favoring the introduction of genes of *B. dulcis*; possible consequences are the loss of genetic diversity and the loss of locally adapted populations (Rieseberg 1991; Ellstrand and Ellam 1993). An increased number of fertile hybrids in relation to the number of *B. nitida* individuals are the key to the assimilation of the rare species (Levin et al. 1996). We assumed that hybrid fitness and the likelihood of backcrossing is associated with hybrid abundance.

Also, predictions suggest that global climatic change in the coming decades will favor the mesic regions in Mexico becoming more xeric (Villers-Ruiz and Trejo-Vázquez 2000), promoting the invasion of *B. dulcis* individuals in these new habitats, which facilitates the breakdown of reproductive barriers and the hybridization phenomenon.

Acknowledgements

The authors thank Hermilo Quero, Judith Reyes, Mauricio Mora, Paulette Arellano, Armando Zepeda, Alfredo López, Guadalupe Rangel Altamirano, Maribel Paniagua, Omar Maya, and Leonardo Beltrán for technical and field assistance. This research was supported by grants from CONACYT- Mexico (61275) and PROMEP/103.5/07/2674 to E.T.S. This research was also supported by a scholarship from CONACYT-SEP Mexico (215976/207096) and PROMEP-UAEM (103.5/07/1844) to R.R.R. We also thank Posgrado en Ciencias Biológicas (UNAM).

References

- Abbott, R.J., James, J.K., Milne, R.I., and Gillies, A.C.M. 2003. Plant introductions, hybridization, and gene flow. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* **358**(1434): 1123–1132. doi:10.1098/rstb.2003.1289. PMID:12831478.
- Aguilar, J.G. 1996. Manejo de recursos naturales de la selva baja caducifolia, en particular *Brahea dulcis*, en la región de Chilapa, Guerrero. Informe final del proyecto C105, CONABIO, México D.F., México. [In Spanish.]
- Allendorf, F.W., Leary, R.F., Spruell, P., and Wenburg, J.K. 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends Ecol. Evol.* **16**(11): 613–622. doi:10.1016/S0169-5347(01)02290-X.
- Anderson, E. 1949. *Introgressive hybridization*. John Wiley, New York.
- Arnold, M.L. 1992. Natural hybridization as an evolutionary process. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **23**(1): 237–261. doi:10.1146/annurev.es.23.110192.001321.
- Arnold, M.L. 1997. *Natural hybridization and evolution*. Oxford University Press, New York.
- Arnold, M.L., Hamrick, J.L., and Bennett, B.D. 1990. Allozyme variation in Louisiana Irises: a test for introgression and hybrid speciation. *Heredity*, **65**(3): 297–306. doi:10.1038/hdy.1990.99.
- Balick, M.J., Pinheiro, C.U.B., and Anderson, A.B. 1987. Hybridization in the babassu palm complex: I. *Orbignya phalerata* × *O. eichleri*. *Am. J. Bot.* **74**(7): 1013–1032. doi:10.2307/2443941.
- Bangert, R.K., Turek, R.J., Martinsen, G.D., Wimp, G.M., Bailey, J.K., and Whitham, T.G. 2005. Benefits of conservation of plant genetic diversity to arthropod diversity. *Conserv. Biol.* **19**(2): 379–390. doi:10.1111/j.1523-1739.2005.00450.x.
- Barton, N.H., and Hewitt, G.M. 1985. Analysis of hybrid zones. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **16**(1): 113–148. doi:10.1146/annurev.es.16.110185.000553.
- Borchsenius, F. 1999. Morphological variation in *Geonoma cuneata* (Palmae) in western Ecuador. *Mem. N. Y. Bot. Gard.* **83**: 131–139.
- Brown, K.E. 1976. Ecological studies of the Cabbage Palm, *Sabal palmetto*. *Principes*, **20**: 3–10.
- Bruschi, P., Vendramin, G.G., Bussotti, F., and Grossoni, P. 2000. Morphological and molecular differentiation between *Quercus petraea* (Matt.) Liebl., and *Quercus pubescens* Willd. (Fagaceae) in northern and central Italy. *Ann. Bot. (Lond.)*, **85**(3): 325–333. doi:10.1006/anbo.1999.1046.
- Carney, S.E., Gardner, K.A., and Rieseberg, L.H. 2000. Evolutionary changes over the fifty-year history of a hybrid population of sunflowers (*Helianthus*). *Evolution*, **54**(2): 462–474. PMID:10937223.
- Dehgan, B. 1998. *Landscape plants for subtropical climates*. University Press of Florida, Gainesville, Fla.
- Ellstrand, N.C., and Ellam, D.R. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **24**(1): 217–242. doi:10.1146/annurev.es.24.110193.001245.
- Ellstrand, N.C., Whitkus, R., and Rieseberg, L.H. 1996. Distribution of spontaneous plant hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**(10): 5090–5093. doi:10.1073/pnas.93.10.5090. PMID:11607681.
- Ellstrand, N.C., Prentice, H.C., and Hancock, J.F. 1999. Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **30**(1): 539–563. doi:10.1146/annurev.ecolsys.30.1.539.
- Fernandez-Manjarres, J.F., Gerard, P.R., Dufour, J., Raquin, C., and Frascaria-Lacoste, N. 2006. Differential patterns of morphological and molecular hybridization between *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl (Oleaceae) in eastern and western France. *Mol. Ecol.* **15**(11): 245–257. doi:10.1111/j.1365-294X.2006.02975.x. PMID:16968268.
- Fritz, R.S., Moulia, C., and Newcombe, G. 1999. Resistance of hybrid plants and animals to herbivores, pathogens and parasites. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **30**(1): 565–591. doi:10.1146/annurev.ecolsys.30.1.565.
- Hardig, T.M., Brunsfeld, S.J., Fritz, R.S., Morgan, M., and Orians, C.M. 2000. Morphological and molecular evidence for hybridization and introgression in a willow (*Salix*) hybrid zone. *Mol. Ecol.* **9**(1): 9–24. doi:10.1046/j.1365-294X.2000.00757.x. PMID:10652072.

- Henderson, A. 1984. Observations on pollination of *Cryosophila albida* (Palmae). *Principes*, **28**: 120–126.
- Henderson, A., Galeano, G., and Bernal, R. 1995. Field guide to the palms of the Americas. Princeton University Press, Princeton, N.J.
- Howard, D.J., Preszler, R.W., Williams, J., Fenchel, S., and Boecklen, W.J. 1997. How discrete are oak species? insights from a hybrid zone between *Quercus grisea* and *Q. gambelli*. *Evolution*, **51**(3): 747–755. doi:10.2307/2411151.
- Jensen, R.J., Hokanson, S.C., Isebrands, J.G., and Hancock, J.F. 1993. Morphometric variation in oaks of the Apostle Islands in Wisconsin: evidence of hybridization between *Quercus rubra* and *Q. ellipsoidalis* (Fagaceae). *Am. J. Bot.* **80**(11): 1358–1366. doi:10.2307/2445721.
- Jones, L.D. 1995. Palms throughout the World. Smithsonian Institution Press, Washington, D.C.
- Kleinschmit, J.R.G., Bacilieri, R., Kremer, A., and Roloff, A. 1995. Comparison of morphological and genetic traits of penduculate oak (*Quercus robur* (L.)) and sessile oak (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.). *Silvae Genet.* **44**: 5–6.
- Klier, K., Leoschke, M.J., and Wendel, J.F. 1991. Hybridization and introgression in white and yellow lady's slipper orchids (*Cypripedium candidum* and *C. pubescens*). *J. Hered.* **82**: 305–319.
- Lau, C.P.Y., Ramsden, L., and Saunders, R.M.K. 2005. Hybrid origin of "*Bauhinia blakeana*" (Leguminosae: Caesalpinioideae), inferred using morphological, reproductive, and molecular data. *Am. J. Bot.* **92**(3): 525–533. doi:10.3732/ajb.92.3.525. PMID:21652431.
- Levin, D.A. 2000. The origin, expansion, and demise of plant species. Oxford University Press, New York.
- Levin, D.A., Francisco-Ortega, J., and Jansen, R.K. 1996. Hybridization and the extinction of rare plant species. *Conserv. Biol.* **10**(1): 10–16. doi:10.1046/j.1523-1739.1996.10010010.x.
- Mallet, J. 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends Ecol. Evol.* **20**(5): 229–237. doi:10.1016/j.tree.2005.02.010. PMID:16701374.
- Miller, M.P. 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: a windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by the author, Northern Arizona University, Flagstaff, Arizona.
- Moore, H.E., and Uhl, N.W. 1982. The major trends of evolution in palms. *Bot. Rev.* **48**(1): 1–69. doi:10.1007/BF02860535.
- Oliva-Tejera, F., Caujape-Castells, J., Navarro-Deniz, J., Reyes-Betancort, A., Scholz, S., Baccarani-Rosas, M., and Cabrera-García, N. 2006. Patterns of genetic divergence of three Canarian endemic *Lotus* (Fabaceae): implications for the conservation of the endangered *L. kunkelii*. *Am. J. Bot.* **93**(8): 1116–1124. doi:10.3732/ajb.93.8.1116. PMID:21642177.
- Orians, C.M. 2000. The effects of hybridization in plants on secondary chemistry: implications for the ecology and evolution of plant–herbivore interactions. *Am. J. Bot.* **87**(12): 1749–1756. doi:10.2307/2656824. PMID:11118409.
- Perry, W.L., Lodge, D.M., and Feder, J.L. 2002. Importance of hybridization between indigenous and nonindigenous freshwater species: an overlooked threat to North American biodiversity. *Syst. Biol.* **51**(2): 255–275. doi:10.1080/10635150252899761. PMID:12028732.
- Pintaud, J.Ch. 2008. An overview of the taxonomy of *Attalea* (Arecaceae). *Rev. Peru. Biol.* **1**: 55–63.
- Quero, H. 1989. Flora Genérica de Arecaceas de México. Ph.D. thesis, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México. [In Spanish.]
- Quero, H., and Yáñez, E. 2000. El complejo *Brahea–Erythraea* (Palmae: Coryphideae). Proyecto CONABIO L216. Informe final. <http://www.conabio.gob.mx/institucion/cgi-bin/datos.cgi?Le-tras=L&Numero=216> [accessed 20 October 2010].
- Rieseberg, L.H. 1991. Hybridization in rare plants: insights from case studies in *Cercocarpus* and *Helianthus*. In *Genetics and conservation of rare plants*. Edited by D.A. Falk and K.E. Holsinger. Oxford University Press, New York. pp. 171–181.
- Rieseberg, L.H., Archer, M.A., and Wayne, R.K. 1999. Transgressive segregation, adaptation, and speciation. *Heredity*, **83**(4): 363–372. doi:10.1038/sj.hdy.6886170. PMID:10583537.
- Rieseberg, L.H., and Ellstrand, N.C. 1993. What can molecular and morphological markers tell us about plant hybridization? *Crit. Rev. Plant Sci.* **12**: 213–241.
- Rieseberg, L.H., and Wendel, J.F. 1993. Introgressive and its consequences in plants. In *Hybrid zones and the evolutionary process*. Edited by R.G. Harrison. University Press, Oxford. pp. 70–109.
- Rieseberg, L.H., and Willis, J. 2007. Plant speciation. *Science*, **317** (5840): 910–914. doi:10.1126/science.1137729. PMID:17702935.
- Romero-Morales, M.A. 2004. Factores que controlan la germinación en semillas de palma dulce, *Brahea dulcis* (H. B. K.) Mart. B.Sc. thesis, Universidad Autónoma de Chapingo, México.
- Schwarzbach, A.E., Donovan, L.A., and Rieseberg, L.H. 2001. Transgressive character expression in a hybrid sunflower species. *Am. J. Bot.* **88**(2): 270–277. doi:10.2307/2657018. PMID:1122249.
- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001. Especies nativas de México de flora y fauna silvestres — categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo. Diario Oficial (segunda sección). [In Spanish.]
- Soltis, P.S., and Gitzendanner, M.A. 1999. Molecular systematics and the conservation of rare species. *Conserv. Biol.* **13**(3): 471–483. doi:10.1046/j.1523-1739.1999.97286.x.
- Statsoft. 1998. STATISTICA for Windows. Manual version 6.0. Statsoft, Tulsa, Okla., USA.
- Stebbins, G.L. 1959. The role of hybridization in evolution. *Proc. Am. Philos. Soc.* **103**: 231–251.
- Strauss, S.Y. 1994. Levels of herbivory and parasitism in host hybrid zones. *Trends Ecol. Evol.* **9**(6): 209–214. doi:10.1016/0169-5347(94)90245-3. PMID:21236824.
- Tovar-Sánchez, E., and Oyama, K. 2004. Natural hybridization and hybrid zones between *Quercus crassifolia* and *Quercus crassipes* (Fagaceae) in Mexico: morphological and molecular evidence. *Am. J. Bot.* **91**(9): 1352–1363. doi:10.3732/ajb.91.9.1352. PMID:21652368.
- Tovar-Sánchez, E., and Oyama, K. 2006a. Community structure of canopy arthropods associated to *Quercus crassifolia* × *Quercus crassipes* complex. *Oikos*, **112**(2): 370–381. doi:10.1111/j.0030-1299.2006.14029.x.
- Tovar-Sánchez, E., and Oyama, K. 2006b. Effect of hybridization of the *Quercus crassifolia* × *Quercus crassipes* complex on the community structure of endophagous insects. *Oecologia (Berl.)*, **147**(4): 702–713. doi:10.1007/s00442-005-0328-5.
- Uhl, N.W., and Dransfield, J. 1987. *Genera Palmarum*. Allen Press, Lawrence, Kans.
- Villers-Ruiz, L., and Trejo-Vázquez, I. 2000. El cambio climático y la vegetación en México. In *Una visión hacia el siglo XXI. El cambio climático en México*. Edited by C. Gay García. México Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, US Country Studies Program. pp. 239–254. [In Spanish.]
- Welsh, J., and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* **18**(24): 7213–7218. doi:10.1093/nar/18.24.7213. PMID:2259619.
- Whitham, T.G., Martinsen, G.D., Keim, P., Floate, K.D., Dungey, H.S., and Potts, B.M. 1999. Plant hybrid zones affect biodiversity: tools

- for a genetic-based understanding of community structure. *Ecology*, **80**(2): 416–428. doi:10.1890/0012-9658(1999)080[0416:PHZABT]2.0.CO;2.
- Wilcox, M., Wilcox, E.B., Raulerson, Ch.W., Wass, I.L., and Pfahler, P.L. 1990. Practical method for hybridization in the *Syagrus* alliance. *Proc. Fla. Hort. Soc.* **103**: 385–386.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.L., Rafalski, J.A., and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**(22): 6531–6535. doi:10.1093/nar/18.22.6531. PMID:1979162.
- Wilson, P. 1992. On inferring hybridity from morphological intermediacy. *Taxon*, **41**(1): 11–23. doi:10.2307/1222481.
- Zar, J.H. 2010. *Biostatistical analysis*. 4th ed. Prentice Hall, Englewood Cliffs, N.J.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Forest Ecology and Management

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foreco

Management and its relation to hybridization, clonality and genetic structure of the Mexican palm *Brahea dulcis*

Rolando Ramírez-Rodríguez^{a,c}, Patricia Mussali-Galante^c, Hermilo Quero^b, Efraín Tovar-Sánchez^{a,*}

^aCentro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC), Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad No. 1001, Col. Chamilpa, C.P. 62209 Cuernavaca Morelos, Mexico

^bJardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-614, 04510 México, Mexico

^cPosgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 3000, C.P. 04360 Coyoacán, Distrito Federal, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 May 2012

Received in revised form 31 July 2012

Accepted 31 July 2012

Keywords:

Palm

Clonal propagation

Hybridization

Genetic variation

Traditional management

ABSTRACT

Rural communities commonly manage native species promoting changes in the diversity of natural biota. In Mexico, the palm *Brahea dulcis* is a resource traditionally managed by the rural community Nahuas of Huitziltepec, Eduardo Neri, Guerrero. This palm is used for traditional crafts. The continuous cutting of leaves promotes a physiognomic change in palm populations, high intensity cutting promotes shorter plants, while low intensity cutting promotes somewhat taller plants, but still shorter than unmanaged palms. In this study, we evaluated how different management regimes (harvesting leaves) of this palm by the rural community of Nahuas are related to hybridization, clonal and genetic structure using Random Amplification Polymorphic DNA (RAPD). The study was carried out at six sites with different management regimes (two sites per regime: high and low intensity cutting, and unmanaged palms). Plant density was highest under high-intensity cutting and lowest with no cutting. Autocorrelation analyses at the ramet level showed an aggregated distribution of related genotypes at short distances and a random spatial distribution at larger distances. Also, at the genet level the autocorrelation analyses showed a random distribution. Clonal diversity was high in both management regimes (high-intensity: $D = 0.96$, $G/N = 0.60$; low intensity: $D = 0.98$, $G/N = 0.77$) in comparison with unmanaged palm populations ($D = 0.99$, $G/N = 0.88$). Expected heterozygosity increased with cutting intensity (high-intensity (0.37) > low-intensity (0.25) > unmanaged (0.14)). While genetic differentiation among populations showed an inverse pattern: unmanaged ($\Phi = 0.26$) > low intensity ($\Phi = 0.19$) > high intensity ($\Phi = 0.13$). The greatest differentiation was observed for cutting regime ($\Phi_{st|covariates} = 0.4802$), followed by population ($\Phi_{st|covariates} = 0.2453$) and geographic location ($\Phi_{st|covariates} = 0.1378$). We observed hybridization between *B. dulcis* and *Brahea nitida* and a unidirectional pattern of gene flow towards *B. dulcis*, only in managed populations. Traditional management of *B. dulcis* is based on empirical Nahuatl knowledge which promotes high levels of clonal and genetic diversity, and sporadic hybridization, probably due to successful sexual reproduction, that allows gene flow among populations.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Species management in natural vegetation by indigenous people has been extensively documented (Casas et al., 2006; Martínez-Castillo et al., 2006; Casas and Parra, 2007; Martínez-Ballesté et al., 2008). Indigenous people are the inhabitants and handlers of the areas with the highest biodiversity on Earth (Brush and Stabinsky, 1996; Toledo, 2001), and they commonly manage the local environment in a way that maintains or changes the diversity of

natural biota (Haverkort and Millar, 1994; Brush, 2004; Casas et al., 2006).

The Arecaceae family contains many keystone species in most tropical regions of the world from an ecological (Balslev, 2011; Montúfar et al., 2011) and socio-economic perspective (Macía et al., 2011; Brokamp et al., 2011). Palms are one of the most important non-timber forest products and many of their species are used and marketed in Neotropical regions (Balick, 1988; McKean, 2003; Kahn and Arana, 2008). Most importantly, palms are abundant, comprising up to 72% of the canopy cover locally (Montúfar et al., 2011) and they are also relatively diverse with 65 genera and 730 species in the Americas (Dransfield et al., 2008).

In Mexico, this family contains 100 species included in 20 genera (Quero and Yáñez, 2000). Also, palms have great cultural importance, since their management has been maintained for over

* Corresponding author. Tel./fax: +52 777 3 29 70 19.

E-mail addresses: rolando@uaem.mx (R. Ramírez-Rodríguez), pmussali@yahoo.com.mx (P. Mussali-Galante), quero@servidor.unam.mx (H. Quero), efrain_tovar@uaem.mx (E. Tovar-Sánchez).

3000 years (Rzedowski, 1983; Ugent, 2000; Caballero et al., 2001; Martínez et al., 2002), particularly by different ethnic groups (i.e., Mayas, Mixtecos, Nahuas, Otomíes, Tarahumaras and Zapotecos). Therefore, understanding the rural community technology and ecosystem management can contribute to development of conservation strategies.

Particularly, the genus *Brahea* contains between 10 (Dransfield et al., 2008) and 13 species (Quero and Yáñez, 2000). *Brahea dulcis* (Kunth) Mart. has a wide variety of uses, highlighting its value for handicrafts, household utensils, and religious items (Pavón et al., 2006). Particularly, in the state of Guerrero, palm leaves have been traditionally harvested by the rural community Nahuas of Huitziltepec, in the municipality of Eduardo Neri (Illsley et al., 2001). These traditional management regimes have promoted the formation of two types of palm groves among palm populations: (a) Palms where young leaves and bracts are constantly extracted (high-intensity cutting); inhibiting trunk development; resulting in shorter individuals and smaller leaves. In these palm stands, the constant leaf extraction promotes an increase in foliage production. Slash and burn is a systematic activity in these palm stands. These palms are characterized by asexual reproduction and have a great number of ramets (Illsley et al., 2001; Blancas, 2001; Pavón et al., 2006). (b) Palms where mature leaves are mainly used for roofing. In these palm stands, leaf extraction is less intense and promotes more of an arboreal growth form. Slash and burn is a sporadic practice (burning is once a year) in these palm stands. This type of management regime promotes sexual reproduction (Blancas, 2001; Illsley et al., 2001).

For the establishment of management zones of *B. dulcis* the slash and burn is a common practice (Aguilar, 1998; Blancas, 2001; Illsley et al., 2001; Pavón et al., 2006) and it has reduced the extent of neighboring wild palm populations (Blancas, 2001; Illsley et al., 2001). These management regimes are an important mechanism of seedling establishment within stands of established adults. It has also been suggested that this disturbance regime favors hybridization (Ellstrand et al., 1996); particularly, individuals from the *B. dulcis* × *Brahea nitida* complex (Ramírez-Rodríguez et al., 2011) may be formed under these circumstances.

Although seed production may be common in clonal species, seedling recruitment is unusual (Eriksson, 1989). Therefore, clonal species would have reduced plant dispersal (Mandujano-Sánchez, 2007), a fact that may generate a decrease in genetic variability of these populations (Eckert and Barrett, 1993; Kim and Chung, 1995; Sydes and Peakall, 1998; Holsinger, 2000). However, various studies have shown that genetic diversity is frequently high within populations that are predominantly clonal (Ellstrand and Roose, 1987; Hamrick and Godt, 1989; McLellan et al., 1997; Alfonso-Corrado et al., 2004). Probably because frequent seedling recruitment of new genotypes within patches that promotes high genotypic diversity. Furthermore, relative proportions of sexual vs. asexual progeny produced and recruited may directly affect the genotypic diversity within natural populations and among species due to variations in ecological and/or genetic factors that promote one or other reproductive mechanism (Eckert, 2002). The demographic balance between sexual, clonal and hybrid recruitment is likely to have important consequences for the diversity and genetic structure of plant populations (Ellstrand and Roose, 1987; Eckert and Barrett, 1993).

Considering the high clonality and hybridization percentages between plant species, it is expected that some hybrid individuals rely on clonality for their establishment and eventual backcrossing with their putative parental species, because mechanisms of asexual reproduction permit the establishment of highly heterozygous hybrid phenotypes (Grant, 1981).

In the present study, we hypothesize that differences in palm leaf harvesting regimes will affect the hybridization, degree of clo-

nal propagation, plant stature, and genetic structure and diversity of *B. dulcis*.

2. Materials and methods

2.1. Study species

Brahea dulcis has solitary erect stems up to 8 m in height and 20 cm in diameter. It has a crown made of 10–15 leaves. The petioles are 50–70 cm long and 1.5–2.5 cm wide. The margins are armed with teeth of 2–4 mm long (Quero, 1989; Castillo, 1993). The blade is palmate and green on top and pale on the underside, divided by 50–80 segments of 40–50 cm long. The inflorescence is a cluster that exceeds the length of the leaves and branches from the first third of the rachis. Clonal growth and flowering can occur at any time of the year (Quero and Yáñez, 2000). In general, palms are pollinated by animals such as beetles, bees, flies, ants, and bats (Barfod et al., 2011). We observed the presence of insects belonging to the orders Coleoptera, Diptera and Hymenoptera on *B. dulcis* flowers. These last orders are pollinators on *Licuala* genus (Barfod et al., 2003) that belongs like *Brahea*, to the Coryphideae subfamily (Barfod et al., 2011). This species grows in tropical deciduous forests and oak forests. It is a species favored by disturbance which plays an important role in protecting against soil erosion (Blancas, 2001). Individuals with many prostrate shoots in colonies have been observed at sites with disturbance, but in conservation areas they grow erect and arboreal (Blancas, 2001). It is mainly found in calcareous soils at altitudes of 600–2500 m, but generally at elevations over 800 m a.s.l. (Rzedowski, 1983). It has a wide geographical distribution and can be found from northern Mexico to Guatemala (Quero, 1994). When *B. dulcis* is distributed in sympatry with *B. nitida*, hybrid individuals have been detected showing an unidirectional introgression towards *B. nitida* (Ramírez-Rodríguez et al., 2011).

2.2. Study sites and sample collection

Huitziltepec is located at the municipality of Eduardo Neri (17°45'N–99°29'W), Guerrero state, Mexico, at an altitude of 1,320 m (INEGI, 1994). Settlers from Huitziltepec have been performing traditional management palm practices of the palm *B. dulcis* since precolonial times and their management intensified during the Spanish colonial period (Mastache et al., 1982; Illsley et al., 2001). At this site, we chose four populations of *B. dulcis*, two sites per management regime: (a) low-intensity cutting palms and (b) high-intensity cutting palms. Additionally, two unmanaged populations of *B. dulcis* were selected at Chilpancingo and Xochipala, Guerrero state (Fig. 1). This site was chosen because there are no records or history of human management of *B. dulcis*. To minimize geological historic and environmental site effects, localities have the following common traits: same geological history (they belong to the physiographic subprovince “Cuenca del Balsas-Mezcala” within floristic provinces of Sierra Madre del Sur), weather (hot-dry), altitude (between 1305 and 1470 m), and vegetation type (tropical dry forest).

In order to analyze the genetic structure of this species, in each locality we sampled 30 individuals of each population every 50 m along a 1.5 km transect. Also, from each individual a segment from the blade without any apparent damage (e.g. endophagous insects, bacteria, fungus contamination, etc.) was sampled. To estimate the spatial clonal structure of *B. dulcis* we chose three sites with different management regimes (high intensity cutting, low intensity cutting, and unmanaged palms). We marked plots of 10 m × 50 m at each site. All ramets within the plot were vouchered, mapped and their exact locations were recorded by measuring the distances

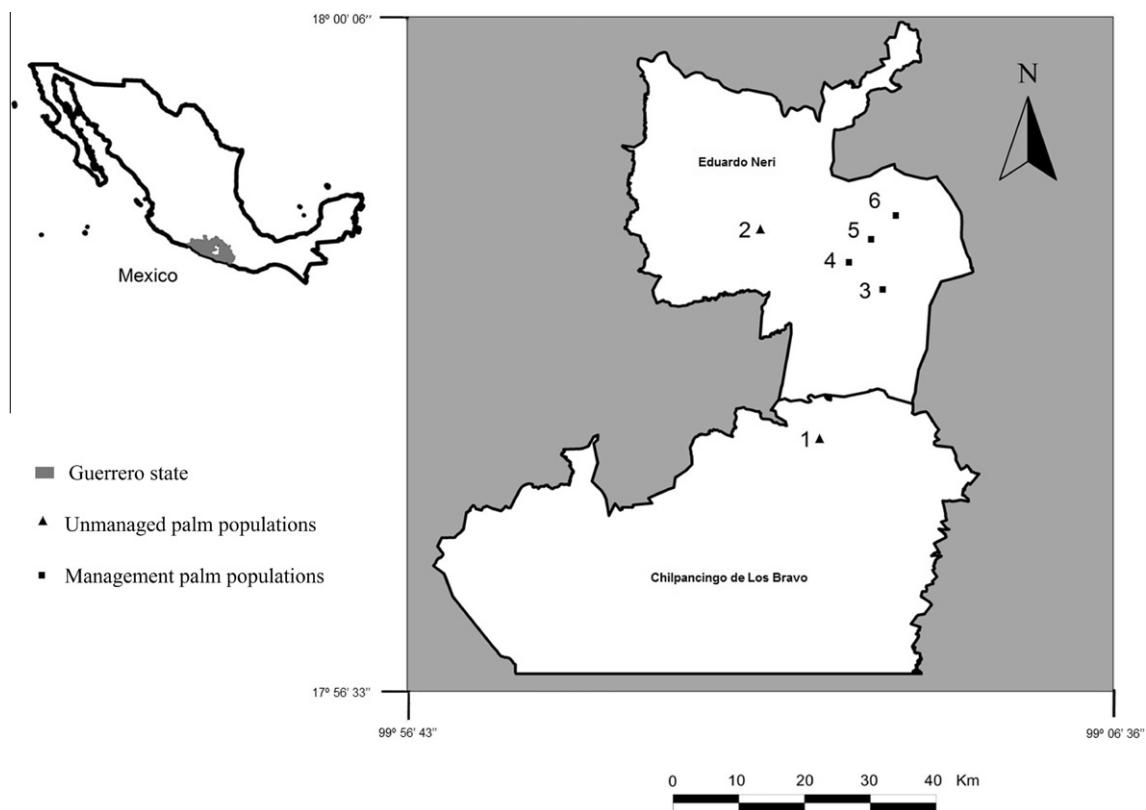


Fig. 1. Map of sampled populations of *Brahea dulcis* at Guerrero state, Mexico. 1 and 2 = unmanaged palm, 3 and 4 = low intensity cutting palms, 5 and 6 = high intensity cutting palms.

to the plot margins. In order to determine the spatial distribution and the extension of each clone we recorded the position of each individual chosen and measured the distance between them.

Tissue samples were collected during August of 2007 and were stored on liquid nitrogen and transported to the laboratory. Subsequently, tissue samples were in an ultracold freezer (-80°C) prior to DNA extraction.

2.3. Molecular data

Total DNA was extracted using a DNAeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, California, USA). The DNA concentration of each sample was obtained by fluorometric analysis (Eppendorf, Biophotometer, Hamburg, Germany), and the DNA quality was estimated by comparing the intensity of bands with known standards of lambda DNA on an agarose gel at 0.8%. Finally, we diluted all DNA samples to a final concentration of 10 ng/mL. Amplification reactions were carried out in a 25-mL mix containing 10 ng template DNA, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl; pH 9, 0.1% Triton x-100, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM each dNTP, 0.2 mM of a single 10-mer primer, and 1 unit *Taq* polymerase (Gibco/Invitrogen, San Diego, California, USA). The thermal cycling program was run on an AG Eppendorf Mastercycler (Eppendorf, Hamburg, Germany) thermal cycler. The program consisted of 45 cycles, each at 94°C for 1 min, annealing at 36°C for 1 min, and extension at 72°C for 2 min. A final extension at 72°C for 15 min was included. DNA fragments were separated by electrophoresis on 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide, and developed on a UV table. The molecular mass of the DNA fragments was estimated with a 1-kilo base (kb) DNA ladder.

A genetic analysis was performed using RAPD (Welsh and McClelland 1990; Williams et al., 1990), and the polymerase chain

reaction (PCR). Forty 10-base pair (bp) primers of random sequence (Kits A, B, C, D, R, S, T; Operon Technologies, Alameda, California, USA) were tested for reproducible amplification patterns using DNA test samples from six different populations of *B. dulcis*. Five informative and reproducible primers (A02, A03, B01, C08, and C09) were chosen and only strong polymorphic bands were used for data analysis. All RAPDs bands were scored as present (1) or absent (0) to construct the data matrix. Lastly, 180 individuals were tested using four primers (A01, A02, A04, and B04) (Ramírez-Rodríguez et al., 2011), to determine hybridization between *B. dulcis* and *B. nitida* (six diagnostic markers and two species-specific markers). Diagnostic markers are those that are present in all individuals in one species and absent in a second species, while species-specific markers are those unique to one species but not necessarily present in all individuals within the species (Howard et al., 1997).

2.4. Data analysis

2.4.1. Genetic variation

In order to determine the genetic structure of unmanaged and managed populations of *B. dulcis*, a total of 37 loci derived from five primers were evaluated. The following estimates of variation were obtained using Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA) software v.1.3 (Miller, 1997): percentage polymorphic loci (P), and the expected heterozygosity (H_e). These analyses were carried out with samples of 30 individuals of each population.

We performed a Kruskal–Wallis analysis of variance in order to detect if there was an effect of the management regimes (high-intensity, low-intensity, unmanaged) on genetic diversity (H_e). Thereafter, a multiple comparison test (Tukey) was used to determine the significant differences among regimes; particularly, we

analyzed if the unmanaged populations differed significantly with each management regime (Zar, 2010).

2.4.2. Genetic structure

The level of genetic differentiation among population was obtained with the estimator Φ , using the Analysis of Molecular Variance (AMOVA) (Excoffier et al., 1992). Also, AMOVA was used to describe how the genetic variability was partitioned within and among populations. This analysis determined the pair-wise genetic distances among populations, as well as the significance levels of these distances. All the molecular variance analyses were performed with WINAMOVA v.1.55 (Excoffier, 1993). WINAMOVA generates Φ_{st} , a parameter analogous to Wright F_{ST} , and thus facilitates comparison of results with those from other studies. Under the assumptions of Wright's island model, migrate estimate (Nm) can be estimated from an AMOVA Φ statistic as:

$$Nm = \frac{\left(\frac{1}{\Phi_{st}} - 1\right)}{4\alpha}$$

where $\alpha = (n/n - 1)^2$, n is the total number of populations, and Φ is the average value of genetic differentiation over loci (Crow and Aoku, 1984).

Heterozygosity (H_T , H_S) was obtained based on modifications by Lynch and Milligan (1994) because of the overestimation that RAPD markers present for these parameters.

Based on the data of genetic distance and identity Nei (1978) we constructed a dendrogram for all populations using the algorithm Unweighted Pair-Group Method (UPGMA, Sneath and Sokal, 1973).

Bootstrap analysis was employed to test the solidness of the dendrogram using 1000 random reassignments, for this analysis the software POPGENE v.32 was used.

Also, a Stepwise Analysis of Molecular Variance (StAMOVA) was used to take into consideration the effects of the covariates latitude and longitude, level of different management regimes, and population on genetic differentiation ($\Phi_{st|covariates}$) (Dyer et al., 2004; Dye, 2009). All StAMOVA analyses were conducted in GENETIC-STUDIO (Dye, 2009).

2.4.3. Clonal diversity

We determined the genetic identity of the sampled individuals along with their size and spatial clonal structure in three sites with different management regimes (high-intensity, low-intensity and unmanaged palms). Clonal diversity was estimated according to the following parameters: (a) proportion of distinguishable genotypes was measured as G/N , where G is the number of genets and N is the total number of individuals sampled (Ellstrand and Roose, 1987), (b) Simpson's diversity index (D) for finite sample size (modified by Pielou, 1969), was calculated as:

$$D = 1 - \sum \frac{n_i(n_i - 1)}{n(n - 1)}$$

where n_i is the number of clones with genotype i , and n is the sample size and $0 < D < 1$, when clones have the same or a unique genotype, respectively.

We carried out a spatial autocorrelation analysis based on similarity/dissimilarity of RAPD banding patterns using Tanimotós distance index (D_G) (Deichsel and Trampisch, 1985), at the ramet and genet levels. At the ramet level, all individuals sampled were included in the analysis, while at the genet level we included all the genets in the autocorrelation analysis. To test for significant deviations from a random spatial distribution of the mean D_G value, a Monte Carlo permutation procedure at 99% confidence intervals was calculated. Each permutation consisted of a random redistribution of each RAPD profile over spatial coordinates of the sampled individuals. We plotted the spatial coefficients at 10

distance classes to produce a correlogram, using the software SGS v.1.0 (Degen et al., 2001).

2.4.4. Hybridization

The maximum likelihood (ML) hybrid index score from RAPD analysis was calculated using Hardig-Hybrid software (Hardig et al., 2000). This index is useful to identify intermediate individuals, showing backcrosses as well as the structures of hybrid swarms.

Also, to evaluate the relationship between different management regimes and hybridization, data on the frequency of F1 hybrids and backcrosses were classified in contingency tables and differences among management regimes were tested with a chi-square test.

2.4.5. Population structure

ANCOVA analyses including geographic location as a covariate were performed to evaluate the effect of the different management regimes on the height of adult plants, ramet density, and the number of ramets per genotype of *B. dulcis*. Thereafter, a multiple comparison test (Tukey) was used to determine the significant differences among regimes, particularly we analyzed if the unmanaged populations differed significantly from each managed population (Zar, 2010).

3. Results

3.1. Height of adult palms

In general, ANCOVA test showed a significantly effect of the management regimes ($F_{2,177} = 22.612$, $P < 0.001$) on the height of adult plants, but geographic location did not have a significant effect ($F_{2,177} = 2.043$, $P > 0.05$) on the height of adult plants. A multiple comparison Tukey test ($P < 0.05$) showed that these values (Mean \pm S.E.) were significantly different among management regimes: unmanaged (7.53 ± 0.25) > low-intensity (6.27 ± 0.18) > high-intensity (1.41 ± 0.15).

3.2. Genetic diversity

Of the 57 bands analyzed, 37 (65%) were polymorphic. Expected heterozygosity was as follows: high-intensity ($H_e = 0.37$) > low-intensity ($H_e = 0.25$) > unmanaged ($H_e = 0.14$) (Table 1). A Kruskal-Wallis analysis of variance showed significant differences in H_e estimates among management regimes ($H = 17.62$, $P < 0.001$). A multiple comparison Tukey test showed that these indices were significantly different from each other.

The Analysis of Molecular Variance (AMOVA) showed that most of the variation of the genetic diversity was found within populations. Genetic differentiation among populations (Φ) was as follows: unmanaged ($\Phi = 0.26$) > low-intensity ($\Phi = 0.19$) > high-intensity ($\Phi = 0.13$). A significant proportion of the genetic diversity ($P < 0.0001$) was due to differences among populations. The number of migrants per generation (Nm) showed an inverse pattern: unmanaged (1.42) > low-intensity (2.01) > high-intensity (2.54).

A cluster analysis using genetic data showed grouped stands within each management regime (Fig. 2). The cluster consisted of two groups; the first group was formed by unmanaged and low intensity cutting palm populations. Particularly, unmanaged populations were genetically more similar between them and subsequently with low intensity cutting palm populations. The second group consisted of high-intensity cutting palm populations.

The StAMOVA analysis showed a significant latitude \times longitude interaction when the level of different management regimes

Table 1
Parameters of genetic diversity for 37 loci of six populations of *Brahea dulcis* with different management regimes.

Management regimes	Population	N	He	%P	Nm	Φ
Unmanaged palm	1	30	0.12 ± 0.09	44.8	1.42	0.26
	2	30	0.16 ± 0.08	47.3		
Mean (±SD)			0.14 ± 0.07	46.0 ± 1.8		
Arborescent palm	1	30	0.23 ± 0.11	49.2		
	2	30	0.27 ± 0.14	55.9		
Mean (±SD)			0.25 ± 0.12	52.5 ± 4.7		
Tillering palm	1	30	0.38 ± 0.15	66.1	2.01	0.19
	2	30	0.36 ± 0.13	56.0		
Mean (±SD)			0.37 ± 0.12	61.0 ± 7.1		

Note: N = number of individuals sampled per population, He = expected heterozygosity, %P = percentage of polymorphic loci, Nm = migrate number, Φ = genetic differentiation, and S.D. = standard deviation.

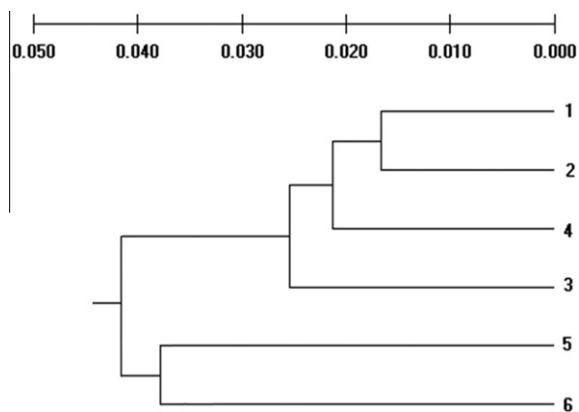


Fig. 2. Phenogram of similarity based on RAPD data in six populations of *Brahea dulcis* at Guerrero state, Mexico. 1 and 2 = unmanaged palm, 3 and 4 = low intensity cutting palms, 5 and 6 = high intensity cutting palms.

and populations were analyzed. Different management regimes showed the greatest amount of differentiation ($\Phi_{st|covariates} = 0.4802$), followed by population ($\Phi_{st|covariates} = 0.2453$) and geographic location ($\Phi_{st|covariates} = 0.1378$).

3.3. Spatial clonal structure

The spatial distribution of clones of *B. dulcis* shows that ramets grow close to each other. The maximum distance between pairs of ramets with the same genotype was of 14 m. In general, ANCOVA test showed a significant effect of management regimes ($F_{2,13} = 5.607, P < 0.05$) on genet density (ind./ha), however geographic location did not have a significant effect ($F_{2,13} = 1.336, P > 0.05$). A multiple comparison Tukey test ($P < 0.05$) showed that these mean densities (ind./ha ± SD) were significantly different among regimes: high-intensity (1619.80 ± 440.71) > low-intensity (1010.83 ± 233.77) > unmanaged (277.17 ± 77.04).

On the other hand, ANCOVA test showed a significant effect of management regimes ($F_{2,13} = 4.406, P < 0.05$) on ramet density (ind./ha), however geographic location did not have a significant effect ($F_{2,13} = 2.024, P > 0.05$). A multiple comparison Tukey test ($P < 0.05$) showed that the mean densities (ind./ha ± SD) were different among them: high-intensity (23360.0 ± 5977.66) > low-intensity (11020.5 ± 1787.85) = unmanaged (6578 ± 2630.20).

Finally, ANCOVA test did not detect a significant effect of the management regimes ($F_{2,13} = 0.933, P > 0.05$) and of the geographic location ($F_{2,13} = 1.082, P > 0.05$) on the number of ramets per genotype (Mean ± SD): high-intensity (15.63 ± 4.58) = low-intensity (15.13 ± 2.42) = unmanaged (11.20 ± 5.59).

Correlograms of *B. dulcis* calculated at various distance classes with 99% confidence intervals are given in Fig. 3. At the ramet level (a = unmanaged palm stand, b = low-intensity cutting palm stand, and c = high-intensity cutting palm stand) a significant and positive autocorrelation at short distances was observed (<11 m), showing an aggregated spatial distribution. On the contrary, at larger distances a negative autocorrelation was observed, which means that ramets had a random spatial distribution. Also, at the genet level (c = unmanaged palm stand, d = low-intensity cutting palm stand, and e = high-intensity cutting palm stand) the autocorrelation analyses showed a random distribution.

3.4. Clonal diversity

At a large scale clonal diversity was high for *B. dulcis* in all management regimes ($G/N = 1; D = 1$); all individuals were genetically different. However, at a small scale, some individuals were of identical genotype, therefore, clonal diversity was lower (unmanaged: $G/N = 0.88, D = 0.99$; low-intensity: $G/N = 0.77, D = 0.98$, and high-intensity: $G/N = 0.60, D = 0.96$). Therefore, populations among management regimes consisted of 12% (unmanaged), 23% (low-intensity) and 40% (high-intensity) equal genotypes.

3.5. Hybridization

In general, the Hardig Hybrid index showed that in unmanaged populations the hybridization process between *B. dulcis* and *B. nitida* was not observed. On the other hand, probable individual F1 hybrids between *B. dulcis* and *B. nitida* (index = 0.437–0.562) in low ($n = 1$) and high intensity cutting management regimes ($n = 1$) were observed. Also, in high intensity cutting populations three individuals were considered probable backcrosses towards *B. dulcis* (index = 0.250–0.312) which contained 16 ramets. In general, the relative frequency of hybrids and backcrosses was different among management regimes ($X^2 = 7.22, d.f. = 2, P < 0.05$).

4. Discussion

4.1. Effects of different management regimes on population structure

The extraction of leaves from *B. dulcis* had a significant effect on plant physiognomy. Sites with continuous cutting of leaves from *B. dulcis* (high-intensity) had the shortest plants and were the most abundant, followed by low intensity cutting palms and finally unmanaged palms. These results are in accordance with observations in defoliated populations of this same species in Guerrero (Illsley et al., 2001) and Hidalgo (Pavón et al., 2006) states, Mexico. The observation of height reduction in *B. dulcis* is a recurrent phenomenon in other managed palm species, such as *Livistona rotundifolia* (O'Brien and Kinnaird, 1996), *Sabal* sp. (Caballero et al., 2001), *Chamaedorea radicalis* (Endress et al., 2004), and *Thrinax*

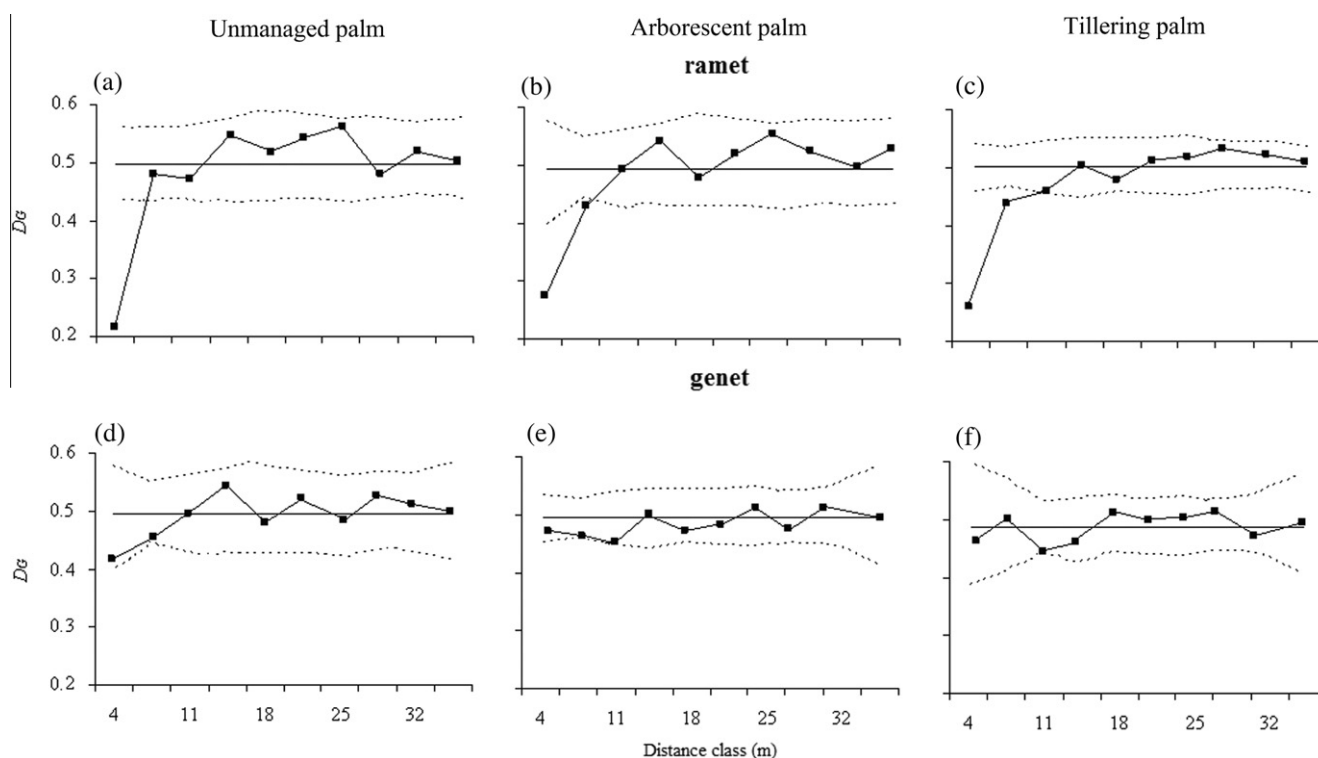


Fig. 3. Correlograms plotting the Tanimoto distance (D_G) for all *Brahea dulcis* individuals as a function of distance (in meters) at unmanaged palm: (a) ramet level, and (d) genet level; Low intensity cutting palms: (b) ramet level, and (e) genet level; and High intensity cutting palms: (c) ramet level, and (f) genet level. Closed squares are the observed D_G values estimated using 5000 permutations. Solid lines represent the expected values and the dashed lines represent the upper and lower 99% confidence intervals.

radiata (Calvo-Irabién et al., 2009). Furthermore, Pavón et al. (2006) reported that leaf extraction of *B. dulcis* promotes leaf production. Hence, leaf harvesting in this family promotes palm height reduction along with an increase in leaf production as a result of the management by different ethnic groups.

Our results showed a significant effect of the management regime on plant density. These findings are in agreement with Pavón et al. (2006) and Illsley et al. (2001) in *B. dulcis* palms from Guerrero and Hidalgo states, Mexico. We suggest that the increased density of *B. dulcis* is the result of slash and burn routines made by the rural community in the management sites, a practice that opens patches and reduces the competition of *B. dulcis* with other individuals, promoting an increase in the recruitment of individuals through sexual or asexual mechanisms.

Geographic location of the sampled populations did not have a significant effect on palm height, genet and ramet density. These results suggest that the sampling methodology of the study sites diminished the effects of confounding factors such as ecological variables. The variables that the sampled populations shared were: geological history, climate, altitude, vegetation type, and soil type.

4.2. Spatial clonal structure

In general, independently of the management regime of *B. dulcis*, the ramets sharing the same genotype were spatially aggregated, while only a few genets were spread over larger distances. The spatial distribution of *B. dulcis* is similar to other clonal palms like *Geonoma congesta* (Chazdon, 1992), *G. deversa* (Zuidema and Werger, 2000) and *Reinhardtia gracilis* (Mendoza and Franco, 1998) where ramets of these species grow relatively close to their parental plant.

Clonality has a strong influence on the spatial clonal structure of *B. dulcis* at distances smaller than <14 m. The short distances among ramets within genets and the autocorrelation analysis point to an aggregated pattern of distribution. In contrast, at larger distances, *B. dulcis* showed a random spatial distribution. It is likely that at limited distances the ramets can spread and the availability of suitable habitat patches can influence the spatial patterns of this species. Burke et al. (2000) suggest that ramets tend to aggregate in suitable patches regardless of whether or not they are produced by the same genet. Clearly, clonal spread may facilitate resource uptake in patchy environments (Wijesinghe and Hutchings, 1997). The random distribution of genetic variation found at larger distances in this species supports this idea.

At the genet level there is a random genetic structure among individuals of *B. dulcis* genotypes, in this species genotypes are randomly distributed throughout the area. Numerous studies with perennial species have shown a random distribution (Montalvo et al., 1997; Streiff et al., 1998; Chung and Chung, 1999; Chung et al., 2002; Alfonso-Corrado et al., 2004). Palm species are self-incompatible and pollinated by beetles, bees, flies, and bats (Barfod et al., 2011), thus, flowers likely receive plenty amount of pollen from other genets. This might explain the random genetic structure found in populations of *B. dulcis*.

Although seeds are produced in great quantities, vegetative propagation seems to be the main mode of reproduction (Richards, 1986). Nonetheless, the presence of genetic relatedness among nearby genets and the moderate levels of genet diversity (G/N : 0.60–0.88) suggest recurrent recruitment from seed within *B. dulcis* stands. Given the very dense shoots and rapid clonal propagation of seedlings, it is, however, extremely difficult to observe and quantify seedling recruitment within *B. dulcis* populations.

4.3. Effect of different management regimes on genetic structure and diversity of *B. dulcis*

Our findings revealed a significant effect of the management regime on the genetic diversity (H_e) levels of *B. dulcis*, being significantly lower in unmanaged palm groves followed by low-intensity and finally by high-intensity cutting palms. These results are in agreement with Casas et al. (2006) in *Stenocereus stellatus* populations, H_e : Unmanaged < managed < cultivated, and with Martínez-Castillo et al. (2006) in *Phaseolus lunatus* populations. These last results contrast with the results found in populations of *Polaskia chichi*pe (Lucio, 2005; Otero-Arnaiz et al., 2005; Ruíz-Durán, 2006) and *Escontria chiotilla* (Tinoco et al., 2005), where wild or unmanaged populations hold the highest genetic diversity levels.

The genetic diversity gradient found in *B. dulcis* palms under different management regimes (unmanaged < low-intensity < high-intensity) is in accordance to the results obtained for genet and ramet density and abundance of F1 hybrids between *B. dulcis* and *B. nitida*, and probable backcrosses towards *B. dulcis*. For these reasons, we suggest that an increase in the number of genotypes and of clonal diversity in sites under different management regimes favors an increase of genetic diversity levels, as a result of:

- (1) Anthropogenic disturbances at management sites (e.g. burning, timbering) that favor the recruitment of genets, of hybrid individuals and of backcrosses. Human disturbance of natural habitats can foster opportunities for hybridization and suitable habitats for the survival of hybrids. For example, anthropogenic disturbance breaks the ecological barriers between *B. dulcis* and *B. nitida* (Ramírez-Rodríguez et al., 2011), and phenological barriers (coflowering) between *Banksia hookeriana* and *B. prionotes* stimulating hybridization (Lamont et al., 2003). Moreover, Martínez-Castillo et al. (2004) found that weedy plants (*Phaseolus lunatus*) could be hybrid forms generated by gene flow events between domesticated and wild populations.
- (2) Palm management (leaf defoliation) stimulates clonal growth. Velasco, 1994; Illsley et al. (2001) and Pavón et al. (2006) documented that traditional management of the *B. dulcis* populations is limited to the constant cutting of leaves, promoting an increase of ramet density.
- (3) Frequent seedling recruitment of new genotypes within patches that promotes high genotypic diversity. Evidence of high clonal diversity suggests that sexual recruitment is a very important mechanism of regeneration in managed populations of *B. dulcis*. Computer simulations of *Ranunculus repens* population suggest that seedling recruitment and the maintenance of clonal diversity can be maintained by a small and constant rate of new seedling recruitment into established populations (Watkinson and Powell, 1993). Therefore, traditional management of *B. dulcis* promotes a frequent seedling recruitment of different genotypes when favorable conditions occur, a process that is known as “narrow windows of opportunity” (Eriksson and Fröborg, 1996).
- (4) The genetic material introduced by introgressive hybridization exceeds that which is produced directly by mutation (Anderson, 1949). For example, the increase of genetic diversity of a population, as a result of introgressive hybridization has been reported for *Pinus montezumae* × *P. pseudostrobus* (Delgado and Piñero, 2002), *Quercus crassipes* × *Q. crassifolia* (Tovar-Sánchez et al., 2008), and *Populus alba* × *P. tremula* (Castiglione et al., 2010).

It has been documented that *B. dulcis* populations under different management regimes, where controlled burning are a common

and constant practice, vegetative growth is promoted along with genet establishment (Casas et al., 1994; Velasco, 1994; Illsley et al., 2001). Therefore, if one or few seedlings establish successfully, then new genotypes are introduced into a population and this will increase significantly the genotypic diversity (Pappert et al., 2000).

High levels of variation in manipulated populations could be due in part to the occurrence of high levels of gene flow between all populations, which is favored by the intervention of beetles, bees, flies, and bats in pollination (Barfod et al., 2011), and coyotes, fox, bats, and humans in seed dispersal (Romero-Morales, 2004). High diversity of *B. dulcis* in managed stands is apparently also caused by the common slash and burn practices among stands, which involves a continual introduction and replacement of plants (Illsley et al., 2001). Therefore, genetic diversity of *B. dulcis* may be maintained and even enhanced by traditional management practices.

Although the level of genetic differentiation among populations of *B. dulcis* (unmanaged, $\Phi = 0.26$; low-intensity, $\Phi = 0.19$; high-intensity, $\Phi = 0.13$), was similar than the average reported by Petit et al. (2005) for 77 species of angiosperms (mean 0.184). In general, we found that *B. dulcis* stands under management regimes, presented significant levels of genetic variation within populations in comparison to unmanaged stands, while substantial differentiation was observed among populations. Overall, the available evidence indicates that *B. dulcis* combines sexual recruitment and clonal propagation as mechanisms of regeneration.

Different management regimes showed the greatest amount of differentiation. For example, high-intensity cutting palm groves registered the highest genetic diversity where 87% of its genetic differentiation was present within its populations. These results may be explained by the fact that the individuals that comprise these populations are a mosaic of genets, like: *B. dulcis* pure, F1 hybrids between *B. dulcis* and *B. nitida*, probable backcrosses towards *B. dulcis*. Also, these palm stands registered significantly higher genet and ramet densities than low-intensity cutting and unmanaged palm stands. These observations show that the systematic management of high-intensity cutting palms promotes a continuous recruitment of seedlings of different genetic origin “narrow windows of opportunity” (Eriksson and Fröborg, 1996), and that the loss of genetic diversity in low-intensity cutting and unmanaged palm stands is related to a reduced intensity of the management practices.

On the other hand, the observed geographic structure could be explained by different factors, including the habitat fragmentation by anthropic activity acting as barriers for *B. dulcis* dispersion, as shown by the discontinuous distribution of this palm. Also, seed dispersal in *B. dulcis* is facilitated by coyotes, foxes, birds and humans (Aguilar, 1996; Romero-Morales, 2004), and foraging of pollinators, such as: coleoptera, diptera and hymenoptera (Barfod et al., 2003), could explain the lack of spatial structure at the within-population scale.

4.4. Implications of traditional management of *B. dulcis* on their genetic resources

The traditional *in situ* management of *B. dulcis* by the rural community Nahuas of Huitziltepec is maintaining significant reservoirs of genetic diversity of *B. dulcis*. This study suggest that *B. dulcis* managed populations are being favored by their management, given that these practices promote the establishment of genets with different origin which in turn, increases its genetic diversity levels (e.g., *B. dulcis*, F1 between *B. dulcis* and *B. nitida*, probable backcrosses towards *B. dulcis*). Therefore, maintenance of biodiversity is influenced by human cultural processes (Bellon and Brush, 1994; Bellon, 1996) and cultural survival has increasingly been

considered a keystone for conservation of biological diversity (Gadgil et al., 1993). Moreover, we observed that human manipulation and transformation of environments that results in the establishment of *B. dulcis* low and high intensity cutting palm groves causes a negative effect on biological diversity at either community or population levels. The presence of the management palm groves suggests that as palm manipulation increases, palm stands density also increases until species that comprise the community are nearly eliminated from the site. This last scenario, results from extensive grazing and forest fires, both factors make difficult other species regeneration, favoring *B. dulcis* expansion (Illsley et al., 2001). However, an increased density of palm stands does not necessarily imply more material for indigenous use. Palm stands with the greatest densities, are generally settled in the most deteriorated sites, presenting the shortest blade palmates, most of which are inadequate for the elaboration of handicrafts.

Consequently, it has been suggested that these sites may be used in ecological restoration programs, because of the important roles that palm species play, such as protecting against soil erosion, favoring the formation of organic matter and creating adequate microclimates for the establishment of other plant species.

Acknowledgements

The authors thank Mauricio Mora Jarvio, Alfredo López Caamal, Guadalupe Rangel Altamirano, Maribel Paniagua, and Noelia Vázquez for technical and field assistance. This research was supported by Grants from CONACYT – Mexico (61725) and PROMEP/103.5/07/2674 to E.T.S., also this research was supported by scholarship from CONACYT-SEP Mexico (215976/207096) and PROMEP-UAEM (103.5/07/1844) to Ramírez-Rodríguez. We also thank to the Posgrado en Ciencias Biológicas (UNAM).

References

- Aguilar, J.G., 1996. Manejo de recursos naturales de la selva baja caducifolia, en particular *Brahea dulcis*, en la región de Chilapa, Guerrero. Informe final del proyecto C105, CONABIO, Mexico.
- Aguilar, J.G., 1998. Manejo campesino de recursos naturales de la Selva Baja Caducifolia, en particular *Brahea dulcis*, en la región de Chilapa Guerrero: Segunda fase. Grupo de Estudios Ambientales A.C. Informe final SNIB-CONABIO proyecto J095. México.
- Alfonso-Corradó, C., Esteban-Jiménez, R., Clark-Tapia, R., Piñero, D., Campos, J., Mendoza, A., 2004. Clonal and genetic structure of two Mexican oaks: *Quercus eduardii* and *Quercus potosina* (Fagaceae). *Evol. Ecol.* 18, 585–599.
- Anderson, E., 1949. Introgressive Hybridization. John Wiley & Sons, New York.
- Balick, M.J., 1988. The Palm-Tree of Life: Biology, Utilization and Conservation. *Advances in Economic Botany* 6. The New York Botanical Garden.
- Balslev, H., 2011. Palm harvest impacts in North-Western South America. *Bot. Rev.* 77, 370–380.
- Barfod, A.S., Burholt, T., Borchsenius, F., 2003. Contrasting pollination modes in three species of *Licuala* (Arecaceae: Coryphoideae). *Teloepa* 10, 207–223.
- Barfod, A., Hagen, M., Borchsenius, F., 2011. Twenty-five years of progress in understanding pollination mechanisms in palms (Arecaceae). *Ann. Bot.* 108, 1503–1516.
- Bellon, M.R., Brush, S.B., 1994. Keepers of maize in Chiapas, Mexico. *Econ. Bot.* 48, 196–209.
- Bellon, M.R., 1996. The dynamics of crop infraspecific diversity: a conceptual framework at the farmer level. *Econ. Bot.* 50, 26–39.
- Blancas, V.J.J., 2001. Estudio etnobotánico del "soyatl" o palma (*Brahea dulcis* (HBK) Martius) en la comunidad náhuatl de Huitziltepec, Eduardo Neri, Guerrero. BSc Thesis, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México DF.
- Brokamp, G., Valderrama, N., Mittelbach, M., Grandez, R., Barfod, A.S., Weigend, M., 2011. Trade in palm products in North-Western South America. *Bot. Rev.* 77, 571–606.
- Brush, S.B., Stabinsky, D., 1996. Valuing Local Knowledge, Indigenous People and Intellectual Property Rights. Island Press, Washington, DC.
- Brush, S.B., 2004. Farmers' Bounty, Locating Crop Diversity in the Contemporary World. Yale University Press, New Haven and London.
- Burke, J.M., Bulger, M.R., Wesselingh, R.A., Arnold, M.L., 2000. Frequency and spatial patterning of clonal reproduction in Louisiana Iris hybrid populations. *Evolution* 54, 137–144.
- Caballero, J., Martínez, A., Gama, V., 2001. El uso y manejo tradicional de la palma de guano en el área maya de Yucatán. *Biodiversitas* 39, 1–16.
- Calvo-Irabien, L.M., Zapata, M.T., Iriarte-Vivar, S., 2009. Effects of leaf harvest on *Thrinax radiata*, a threatened palm species: implications for management and conservation. *JFMS* 21, 34–44.
- Casas, A., Cruse, J., Morales, E., Otero-Arnaiz, A., Valiente-Banuet, A., 2006. Maintenance of phenotypic and genotypic diversity of *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) by indigenous peoples in Central Mexico. *Biodivers. Conserv.* 15, 879–898.
- Casas, A., Parra, F., 2007. Agrobiodiversidad, parientes silvestres y cultura. *LEISA* 23, 5–8.
- Casas, A., Viveros, J.L., Caballero, J., 1994. Etnobotánica Mixteca: sociedad, recursos naturales y subsistencia en la Montaña de Guerrero. Consejo Nacional Para la Cultura y las Artes/Instituto Nacional Indigenista, México D.F.
- Castillo, G.C., 1993. Contribución al conocimiento sobre *Brahea dulcis* (H.B.K.) Mart., en la región Mixteca de Cárdenas, Oaxaca. BSc Thesis. Universidad Autónoma de Chapingo, Chapingo, Estado de México.
- Castiglione, S., Cicatelli, A., Lupi, R., Patrignani, G., Fossati, T., Brundu, G., Sabatti, M., Van Loo, M., Lexer, C., 2010. Genetic structure and introgression in riparian populations of *Populus alba* L. *Plants Biosyst.* 144, 656–668.
- Chazdon, R.L., 1992. Patterns of growth and reproduction of *Genoma congesta*, a clonal understory palm. *Biotropica* 24, 43–51.
- Chung, M.G., Chung, M.Y., 1999. Spatial genetic structure of clonal and sexual reproduction in a population of *Abeliophyllum distichum* (Oleaceae), an endangered monotypic genus. *Genes Genet. Syst.* 74, 9–14.
- Chung, M.Y., Nason, J., Chung, M.G., Kim, K.J., Park, C.W., Sun, B.Y., Pak, J.H., 2002. Landscape-level spatial genetic structure in *Quercus acutissima* (Fagaceae). *Am. J. Bot.* 89, 1229–1236.
- Crow, J.F., Aoku, K., 1984. Group selection for a polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6073–6077.
- Degen, B., Petit, R., Kremer, A., 2001. SGS Spatial Genetic Software: a computer program for analysis of spatial genetic and phenotypic structures of individuals and populations. *J. Hered.* 92, 447–448.
- Delgado, P., Piñero, D., 2002. Sistemática filogeográfica y sus aplicaciones a la evolución y conservación de los bosques de coníferas en México: el caso de *Pinus montezumae* y *P. pseudostrobus*. *Acta Univ. (Guanajuato)* 12, 3–19.
- Deichsel, G., Trampisch, H.J., 1985. Clusteranalyse und diskriminanzanalyse. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Dransfield, J., Uhl, N., Asmussen, C., Baker, W., Harley, M., Lewis, C., 2008. *Genera Palmarum*. Kew publishing, Royal Botanic Garden, United Kingdom.
- Dyer, R.J., Westfall, R.D., Sork, V.L., Smouse, P.E., 2004. Two-generation analysis of pollen flow across a landscape V: a stepwise approach for extracting factors contributing to pollen structure. *Heredity* 92, 204–211.
- Dye, R.J., 2009. Genetic studio: a suite of programs for the spatial analysis of genetic marker data. *Mol. Ecol. Res.* 9, 110–113.
- Eckert, C.G., 2002. The loss of sex in clonal plants. *Evol. Ecol.* 15, 501–520.
- Eckert, C.G., Barrett, S.C.H., 1993. Clonal reproduction and patterns of genotypic diversity in *Decodon verticillatus* (Lythraceae). *Am. J. Bot.* 80, 1175–1182.
- Ellstrand, N.C., Roose, M.L., 1987. Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. *Am. J. Bot.* 74, 123–131.
- Ellstrand, N.C., Whitkus, R., Rieseberg, L.H., 1996. Distribution of spontaneous plant hybrids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5090–5093.
- Endress, B., Gorchov, D., Peterson, M., Serrano, E., 2004. Harvest of the palm *Chamaedorea radicalis*, its effects on leaf production, and implications for sustainable management. *Conserv. Biol.* 18, 822–830.
- Eriksson, O., 1989. Seedling dynamics and life histories in clonal plants. *Oikos* 55, 231–238.
- Eriksson, O., Fröberg, H., 1996. "Windows of opportunity" for recruitment in long-lived clonal plants: experimental studies of seedling establishment in *Vaccinium* shrubs. *Can. J. Bot.* 74, 1369–1374.
- Excoffier, L., 1993. AMOVA 1.5 Analysis of molecular variance. Computer program supplied by the author. Geneva, Switzerland.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131, 479–491.
- Gadgil, M., Berkes, F., Folke, C., 1993. Indigenous knowledge for biodiversity conservation. *Ambio* 22, 151–156.
- Grant, V., 1981. *Plant Speciation*. Columbia University Press, New York.
- Hamrick, J.L., Godt, M.J.W., 1989. Allozyme diversity in plant species. In: Brown, A.H.D., Clegg, M.T., Kahler, A.L., Weir, B.S. (Eds.), *Plant Population Genetics, Breeding and Germplasm Resources*. Sinauer, Sunderland, MA, pp. 43–63.
- Hardig, T.M., Brunsfeld, S.J., Fritz, R.S., Morgan, M., Orians, C.M., 2000. Morphological and molecular evidence for hybridization and introgression in a willow (*Salix*) hybrid zone. *Mol. Ecol.* 9, 9–24.
- Haverkort, B., Millar, D., 1994. Constructing diversity: the active role of rural people in maintaining and enhancing biodiversity. *Etnoecológica* 2, 51–64.
- Holsinger, K.E., 2000. Reproductive systems and evolution in vascular plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 7037–7042.
- Howard, D.J., Prezler, R.W., Williams, J., Fenchel, S., Boecklen, J., 1997. How discrete are oak species? Insights from a hybrid zone between *Quercus grisea* and *Quercus gambelii*. *Evolution* 51, 747–755.
- Illsley, C., Aguilar, J., Acosta, J., García, J., Gómez, T., 2001. Contribuciones al conocimiento y manejo campesino de los palmares de *Brahea dulcis* (HBK) Mart., en la región de Chilapa, Guerrero. In: Rendón, B., Rebollos, S., Caballero, J., Martínez, M.A. (Eds.), *Plantas, cultura y sociedad*. Estudio sobre la relación entre humanos y plantas en los albores del siglo 21. Universidad Autónoma Metropolitana, México DF, pp. 259–287.

- INEGI, 1994. X Censo General de Población y Vivienda de México. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, México.
- Kahn, F., Arana, C., 2008. Las palmeras en el marco de la investigación para el desarrollo en América del Sur. *Rev. Per. Biol.* 15, 5–6.
- Kim, S.T., Chung, M.G., 1995. Genetic and clonal structure in Korean populations *Clystegia japonica* (Convolvulaceae). *Bot. Bull. Acad. Sin.* 36, 135–141.
- Lamont, B.B., Enright, N.J., Krauss, S.L., Miller, B.P., 2003. Anthropogenic disturbance promotes hybridization between *Banksia* species by altering their biology. *J. Evol. Biol.* 16, 551–557.
- Lucio, J., 2005. Patrones de diversidad genética y proceso de domesticación de *Polaskia chichipe* (Cactaceae) en el Valle de Tehuacán, Puebla. BSc Thesis Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.
- Lynch, M., Milligan, B.G., 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Mol. Ecol.* 3, 91–99.
- Macía, M.J., Armesilla, P.J., Cámara-Leret, R., Paniagua-Zambrana, N., Villalba, S., Balslev, H., Pardo-de-Santayana, M., 2011. Palm uses in Northwestern South America: A quantitative review. *Bot. Rev.* 77, 462–570.
- Mandujano-Sánchez, M.C., 2007. La clonalidad y sus efectos en la biología de poblaciones. In: Eguarte, L.E., Souza, V., Aguirre, X. (Eds.), *Ecología Molecular*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, CONABIO, México, DF, pp. 215–250.
- Martínez-Ballesté, A., Martorell, C., Caballero, J., 2008. The effect of Maya traditional harvesting on the leaf production, and demographic parameters of *Sabal* palm in the Yucatán Peninsula, Mexico. *Forest Ecol. Manag.* 256, 1320–1324.
- Martínez, B.A., Caballero, J., Gama, V., Flores, S., Martorell, C., 2002. Sustainability of the traditional management of Xa'an palms by the lowland Maya of Yucatan, México. In: Stepp, J., Wyndham, F.S., Zarger, R.K. (Eds.), *Ethnobiology and Biocultural Diversity*. International Society of Ethnobiology, Georgia, pp. 381–388.
- Martínez-Castillo, J., Zizumbo-Villarreal, D., Perales-Rivera, H., Colunga-García-Marín, P., 2004. Intraspecific diversity and morpho-phenological variation in *Phaseolus lunatus* L. from the Yucatan Peninsula, Mexico. *Econ. Bot.* 58, 354–380.
- Martínez-Castillo, J., Zizumbo-Villarreal, D., Gepts, P., Delgado-Valerio, P., Colunga-García-Marín, P., 2006. Structure and genetic diversity of wild populations of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) from the Yucatan peninsula, Mexico. *Crop. Sci.* 46, 1071–1080.
- Mastache, F., Alba, G., Morett, E.N., 1982. El trabajo de la palma en la región de la Montaña, Guerrero. Universidad Autónoma de Guerrero. Cuadernos de Ciencias Sociales 4. Chilpancingo, Guerrero, México.
- McKean, S.G., 2003. Toward sustainable use of palm leaves by a rural community in Kwazulu-Natal, South Africa. *Econ. Bot.* 57, 65–72.
- McLellan, A.J., Pratt, D., Kaltz, O., Schmid, B., 1997. Structure and analysis of phenotypic and genetic variation in clonal plants. In: Kroon, H., van Groenendael, J. (Eds.), *The Ecology and Evolution of Clonal Plants*. The Backhuys Publishers, Leiden, pp. 185–210.
- Mendoza, A., Franco, M., 1998. Sexual reproduction and clonal growth in *Reinhardtia gracilis* (Palmae), an understory tropical palm. *Am. J. Bot.* 85, 521–527.
- Miller, M.P., 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: a windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer Software Distributed by the Author. Northern Arizona University.
- Montalvo, A.M., Conard, S.G., Conkle, M.T., Hodgskiss, P.D., 1997. Population structure, genetic diversity and clone formation in *Quercus chrysolepis* (Fagaceae). *Am. J. Bot.* 84, 1553–1564.
- Montúfar, R., Anthelme, F., Pintaud, J.C., Balslev, H., 2011. Disturbance and resilience in tropical American palm populations and communities. *Bot. Rev.* 77, 426–461.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89, 583–590.
- O'Brien, T.G., Kinnaird, M.F., 1996. Birds and mammals of the Bukit Barisan Selatan National Park, Sumatra, Indonesia. *Oryx* 30, 207–217.
- Otero-Arnaiz, A., Casas, A., Hamrick, J.L., Cruz, J., 2005. Direct and indirect estimates of gene flow among wild and managed populations of *Polaskia chichipe*, an endemic columnar cactus in central México. *Mol. Ecol.* 14, 3313–3322.
- Pappert, R.A., Hamrick, J.L., Donovan, L.A., 2000. Genetic variation in *Pueraria lobata* (Fabaceae), an introduced, clonal, invasive plant of the Southeastern United States. *Am. J. Bot.* 87, 1240–1245.
- Pavón, N.P., Escobar, R., Ortiz-Pulido, R., 2006. Extracción de hojas de la palma *Brahea dulcis* en una comunidad otomí en Hidalgo, México: efecto sobre algunos parámetros poblacionales. *Interciencia* 31, 57–61.
- Petit, R.J., Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Salvini, D., Vendramin, G.G., 2005. Comparative organisation of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Mol. Ecol.* 14, 689–711.
- Pielou, E.C., 1969. *An Introduction to Mathematical Ecology*. Wiley, New York.
- Quero, H., Yáñez, E., 2000. El complejo *Brahea-Erythraea* (Palmae: Coryphidaeae). Proyecto CONABIO L216. Informe final. <<http://www.conabio.gob.mx/institucion/proyectos/resultados/InfL216>>.
- Quero, H., 1989. Flora genérica de Arecaceas de México. PhD Thesis, Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF.
- Quero, H., 1994. Arecaceae C.H. Shultz. Fascículo 7. Flora de Tehuacán-Cuicatlán. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Ramírez-Rodríguez, R., Tovar-Sánchez, E., Jiménez-Ramírez, J., Vega-Flores, K., Rodríguez, V., 2011. Introgressive hybridization between *Brahea dulcis* and *Brahea nitida* (Arecaceae) en México: evidence from morphological and PCR-RAPD patterns. *Botany* 89, 545–557.
- Richards, A.J., 1986. *Plant Breeding Systems*. George Allen & Unwin, London.
- Romero-Morales, M.A., 2004. Factores que controlan la germinación de semillas de palma dulce *Brahea dulcis* (H.B.K.) Mart. BSc Thesis, Universidad Autónoma de Chapingo, México.
- Ruiz-Durán, M. E., 2006. Patrones de diversidad genética y proceso de domesticación de *Polaskia chende* (Cactaceae) en el Valle de Tehuacán, Puebla. BSc Thesis, Facultad de Biología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán, México.
- Rzedowski, J., 1983. *Vegetación de México*. Limusa, México.
- Sneath, I.H.A., Sokal, R.R., 1973. *Numerical Taxonomy*. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Streiff, R., Labbe, T., Bacilieri, R., Steinkellner, H., Glössl, J., 1998. Within population genetic structure in *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. assessed with isozymes and microsatellites. *Mol. Ecol.* 7, 317–328.
- Sydes, M., Peakall, R., 1998. Extensive clonality in the endangered shrub *Haloragadendron lucasii* (Haloragaceae) revealed by allozymes and RAPDs. *Mol. Ecol.* 7, 87–93.
- Tinoco, A., Casas, A., Luna, R., Oyama, K., 2005. Population genetics of *Escontria chiotilla* in wild and silvicultural managed populations in the Tehuacán Valley, Central México. *Genet. Resour. Crop. Evol.* 52, 525–538.
- Toledo, V.M., 2001. Indigenous Peoples, Biodiversity and Enciclopedia of Biodiversity, vol. 3. Academic Press, pp. 451–463.
- Tovar-Sánchez, E., Mussali-Galante, P., Esteban-Jiménez, R., Piñero, D., Arias, D.M., Dorado, O., Oyama, K., 2008. Chloroplast DNA polymorphism reveals geographic structure and introgression in the *Quercus crassipes* × *Quercus crassifolia* hybrid complex in Mexico. *Can. J. Bot.* 86, 228–239.
- Ugent, D., 2000. Medicine, myths and magic: the folk healers of a Mexican market. *Econom. Bot.* 54, 27–438.
- Velasco, G.J., 1994. La artesanía de la palma en la Mixteca Oaxaqueña. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral regional. Instituto Politécnico Nacional, Unidad Oaxaca, México.
- Watkinson, A.R., Powell, J.C., 1993. Seedling recruitment and the maintenance of clonal diversity in plant populations – a computer simulation of *Ranunculus repens*. *J. Ecol.* 81, 707–717.
- Welsh, J., McClelland, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18, 7213–7218.
- Wijesinghe, D.K., Hutchings, M.J., 1997. The effects of spatial scale of environmental heterogeneity on the growth of a clonal plant: an experimental study with *Glechoma hederacea*. *J. Ecol.* 85, 17–28.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.L., Rafalski, J.A., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531–6535.
- Zar, J.H., 2010. *Biostatistical Analysis*, 4th ed. Prentice Hall, New Jersey.
- Zuidema, P.A., Werger, M.J.A., 2000. Impact of artificial defoliation on ramet and genet demography in a Neotropical understory palm. In: Zuidema, P.A. (Ed.), *Demography Exploited Tree Species in the Bolivian Amazon*. PROMAB, Riberalta, pp. 109–131.