



## **Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

Dirección General de Estudios de Posgrado

Facultad de Ciencias Biológicas

Unidad de Posgrado

# **Diversificación de *Astrocaryum*, sección *Huicungo* en la Amazonia Occidental: Factores climáticos y adaptaciones anatómicas asociadas**

## **TESIS**

Para optar el Grado Académico de Magíster en Biología

Molecular

## **AUTOR**

Victor Alberto JIMÉNEZ VÁSQUEZ

## **ASESOR**

Dra. Rina Lastenia RAMÍREZ MESÍAS

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## **Referencia bibliográfica**

---

Jiménez, V. (2018). *Diversificación de Astrocaryum, sección Huicungo en la Amazonia Occidental: Factores climáticos y adaptaciones anatómicas asociadas.* [Tesis de maestría, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Unidad de Posgrado]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

---



## FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Exped. Nº 169-UPG-FCB-2018

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO ACADÉMICO  
DE MAGÍSTER EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

Siendo las 16:05 horas del día 19. 9. 2018 en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas, el Jurado Examinador presidido por:

Dra.	Betty Gaby Millán Salazar	e integrado por
Mg.	Asunción Alipio Cano Echevarría	(Miembro)
Mg.	Mery Luz Suni Ninataype	(Miembro)
Dr.	César Augusto Aguilar Puntriano	(Miembro)
Dra.	Rina Lastenia Ramírez Mesías	(Asesora)

Se reunió para la sustentación oral y pública de la Tesis para optar al Grado Académico de Magíster en Biología Molecular, que solicitara el Bachiller Don **VICTOR ALBERTO JIMÉNEZ VÁSQUEZ**.

Después de darse lectura al Expediente Nº 169-UPG-FCB-18, en el que consta haberse cumplido con todas las disposiciones reglamentarias, los señores miembros del Jurado, recepcionaron la exposición de la Tesis Titulada:

**“Diversificación de *Astrocaryum*, sección *Huicungo* en la Amazonia Occidental: Factores climáticos y adaptaciones anatómicas asociadas”**, y formuladas las preguntas, éstas fueron absueltas por el graduando.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

VICEDECANATO DE INVESTIGACION Y POSGRADO

UNIDAD DE POSGRADO

Acto seguido el Jurado procedió a la votación la que dio como resultado el calificativo de: ..... *Excelente con la nota de 19* .....

A continuación la Presidente del Jurado Examinador recomienda que la Facultad proponga que la Universidad le otorgue el grado académico de Magíster en ..... *Biología Molecular* ..... al Bachiller ..... *Víctor Alberto Jiménez Vásquez* .....

Siendo las ..... *19:45* ..... se levantó la Sesión, recibiendo el graduando las felicitaciones de los señores miembros del Jurado y público asistente.

Se extiende la presente Acta en Lima, a los 19 días del mes de setiembre del año 2018.

*Gaby*  
.....  
**Dra. Betty Gaby Millán Salazar**  
Profesora Principal a D.E.  
PRESIDENTE

*Rina*  
.....  
**Dra. Rina Lastenia Ramírez Mesías**  
Profesora Principal a D.E.  
ASESORA

*Asunción*  
.....  
**Mg. Asunción A. Cano Echevarría**  
Profesor Principal a D. E.  
MIEMBRO

*Mery Luz*  
.....  
**Mg. Mery Luz Suni Ninataype**  
Profesora Principal a T. C.  
MIEMBRO

*César Augusto Aguilar Puntriano*  
.....  
**Dr. César Augusto Aguilar Puntriano**  
Profesor Auxiliar a T.P.  
MIEMBRO

*“Yo soy el buen pastor. El buen pastor da su vida por las ovejas. El asalariado, que no es pastor ni dueño de las ovejas, cuando ve venir al lobo, escapa abandonando las ovejas, y el lobo las arrebata y dispersa. Como es asalariado no le importan las ovejas. Yo soy el buen pastor: conozco a mis ovejas y ellas me conocen a mí, como el Padre me conoce y yo conozco al Padre; y doy la vida por las ovejas. Tengo otras ovejas que no pertenecen a este corral; a ésas tengo que guiarlas para que escuchen mi voz y se forme un solo rebaño con un solo pastor”.*

*(Juan 10, 11-18)*

## **Agradecimientos**

Mi eterno agradecimiento al gestor de esta maravillosa idea, al Dr. Jean-Christophe Pintaud, estudioso a tiempo completo de las palmeras neotropicales, asesor inicial, guía y amigo en mis estudios de posgrado quien hace ya más de dos años nos dejó un legado de perseverancia, dedicación y amor por la investigación de la Biodiversidad. Este trabajo está dedicado a ti, amigo. A la Dra. Rina Ramírez Mesías, quien me hizo partícipe de sus investigaciones y supo conducirme por este fascinante mundo del estudio de la biodiversidad molecular, ya hace 8 años cuando aún era un estudiante de pregrado; mi asesora de tesis de pregrado y actual asesora de maestría, muchas gracias por seguir creyendo en mí en momentos difíciles. A los principales investigadores de las palmeras del género *Astrocaryum*, Dra. Betty Millán Salazar, actual decana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, y Dr. Francis Kahn, investigador del Instituto francés para la investigación y el desarrollo (IRD) sin cuyos datos hubiera sido imposible el desarrollo de gran parte de esta tesis. A la Dra. Julissa Roncal de la Memorial University of Newfoundland, de Canadá, quien no solo me recibió en aquella lejana tierra con la mayor confianza, sino que me brindó todo su apoyo para acceder a la beca ELAP del gobierno canadiense; mi más sincero agradecimiento tanto a ella como a su maravilloso grupo de investigación junto al cual viví una de las más inolvidables experiencias, en lo cotidiano del mundo académico y por supuesto fuera de él. A mi familia, mis padres María Julia, Alberto y hermanos Jesús y Verónica, que constituyen siempre el principal apoyo en mi desarrollo y con los cuales comparto todos mis logros; este es un paso más en nuestra historia de trabajo en equipo.

A mis compañeros del laboratorio de sistemática molecular y filogeografía de la facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, David Morales, María Solís, Paola Aguirre y Jaime Morín, con quienes compartí tan buenos momentos durante los primeros meses de desarrollo de este trabajo, y a quienes he visto también desarrollarse en lo académico, en la investigación, y en lo personal.

## Resumen

La Sección *Huicungo* del género *Astrocaryum* es un grupo de 15 especies de palmeras Neotropicales, que habita la región Amazónica Occidental, de las cuales se conocen 4 especies endémicas de las 12 reportadas en el Perú. Las aparentes barreras hidrográficas y geomorfológicas presentes en su distribución parecen no constituir, según concluyen estudios filogenéticos realizados, barreras para su diversificación genética. A partir de este hecho, el presente estudio evalúa la importancia del clima y condiciones edafológicas en la diversificación de la sección *Huicungo* del género *Astrocaryum*, a través de reconstrucciones filogenéticas basadas en 5 marcadores moleculares nucleares y 6 cloroplastidiales, modelamiento de distribuciones potenciales y reconstrucciones de caracteres anatómicos y morfológicos ancestrales; con especial énfasis en dos clados correspondientes con las regiones norte y sur de su distribución. Nuestros resultados soportan la idea de que la diversificación de la sección *Huicungo* del género *Astrocaryum* se corresponde con la especialización ecológica en las dos regiones características de su distribución, una asociada a la cuenca amazónica (NAFB) y la otra asociada a las vertientes orientales de la cordillera andina (CAF), esto estaría soportado por los siguientes hallazgos: 1) en los análisis filogenéticos realizados mediante máxima verosimilitud e inferencia bayesiana se distinguen los dos clados asociados a CAF y NAFB, 2) las distribuciones conocidas, contrastadas mediante un análisis de componentes principales (ACP), y análisis de distribuciones potenciales, estimadas en MAXENT, encuentran escasa intersección y se muestran como áreas con características climáticas independientes definidas por la diferentes regímenes de precipitación, principalmente 3) características anatómicas foliares ancestrales contrastantes en ambos clados como el grosor de la pared celular externa de la hipodermis (mayor en CAF, menor en NAFB) así como el tamaño de las mismas en la cara adaxial (pequeñas en CAF, del mismo tamaño en NAFB), además de la presencia de aerénquima (presente en NAFB sin *A. murumuru*, ausente en CAF).

## Summary

Huicungo is a section of genus *Astrocaryum*, a group of 15 Neotropical palm species inhabiting Western Amazonia. Peruvian Huicungos are represented by only 4 endemic species out of 12 recorded. According to the last phylogenetic study on the group, hydrologic and geomorphological distribution boundaries does not constitute barriers to their genetic diversification. Based on phylogenetic reconstructions with 5 nuclear and 6 chloroplastid markers, potential distribution modeling and ancestral anatomical and morphological character reconstructions we aimed to evaluate the importance of climate and edaphic variables in the diversification process of *Astrocaryum* section Huicungo, with special emphasis in two clades corresponding with northern and southern regions of its distribution range. Our results suggests diversification of *Astrocaryum* section Huicungo through ecological specialization in both distribution areas, one related to Amazonian basin (NAFB) and the second related to eastern Andean slopes (CAF), this idea is supported by the following observations: 1) phylogenetic reconstructions based on maximum likelihood and bayesian analysis approaches recovers both NAFB and CAF clades, 2) independent known and potential distributions for both clades through principal component analysis (PCA) and MAXENT approaches associated with different rain regimes, 3) opposite ancestral leaf anatomical characteristics in both clades like thickness of outer hypodermal cell wall (thin in NAFB and thick in CAF), adaxial hypodermal cell size (same size in NAFB and smaller in NAFB) and finally presence of aeripherous parenchyma (present in NAFB and absent in CAF without considering *A. murumuru*).

## Índice General

1. Introducción .....	1
1.1. Diversificación en especies sudamericanas .....	1
1.2. El género <i>Astrocaryum</i> . Sistemática, ecología y biogeografía.....	2
1.3. Relevancia económica de <i>Astrocaryum</i> .....	4
1.4. Marcadores moleculares.....	6
1.5. Métodos de reconstrucción filogenética.....	7
1.6. Análisis de componentes principales.....	8
1.7. Modelamiento de nicho o de distribución potencial.....	9
2. Antecedentes .....	10
2.1. La sección Huicungo.....	10
2.2. Origen de la biodiversidad Amazónica.....	17
2.2.1. Pan – Amazonia .....	17
2.2.2. Influencia de los Andes .....	17
2.3. La Amazonía occidental .....	18
3. Hipótesis .....	19
4. Objetivo .....	19
4.1. Objetivo General .....	19
4.2. Objetivos específicos .....	19
5. Materiales y Métodos .....	20
5.1. Muestras, extracción de ADN y amplificaciones génicas .....	20
5.2. Obtención de secuencias nucleotídicas y alineamiento de secuencias .....	21

5.3.	Reconstrucción Filogenética por “evidencia total” .....	22
5.4.	Obtención de árboles de especies .....	23
5.5.	Divergencia del nicho ecológico .....	24
5.6.	Análisis de componentes principales (ACP) y estimación de distribuciones potenciales .....	24
5.7.	Estimación de Caracteres Ancestrales .....	25
5.8.	Análisis filogenético con caracteres morfológicos y anatómicos	26
6.	Resultados .....	27
6.1.	Árbol filogenético de “evidencia total” .....	27
6.2.	Árboles de especies .....	29
6.3.	Divergencia de Nicho Ecológico .....	31
6.4.	Estimación de caracteres ancestrales anatómicos y morfológicos .....	37
6.5.	Filogenia de máxima parsimonia a partir de caracteres anatómicos y morfológicos .....	41
7.	Discusión .....	43
7.1.	Análisis Filogenético .....	43
7.2.	Diferenciación de Nicho .....	44
7.3.	Análisis de máxima parsimonia con caracteres anatómicos y morfológicos y reconstrucción de estados ancestrales .....	46
8.	Conclusiones .....	48
9.	Recomendaciones .....	48
10.	Referencias Bibliográficas .....	49
11.	Anexo .....	60

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de la Sección <i>Huicungo</i> en comparación con los resultados del análisis filogenético realizado por Roncal <i>et al.</i> 2015. (*) Especie no incluida en este último estudio .....	15
<b>Tabla 2.</b> Sitios variables resultantes en un fragmento de la supermatriz. Las filas, representan parte de las secuencias empleadas por especies, mientras que se numeran las posiciones variables en las columnas. Nótense los guiones que representan los <i>gaps</i> de la supermatriz.....	22
<b>Tabla 3.</b> Lista de las 10 variables empleadas en la distribución potencial en MAXENT de los clados NAFB (Northern Amazonian Foreland Basin) y CAF (Central Andean Foothills). Se muestra la contribución relativa de cada variable para cada modelo estimada por Importancia de Permutación y Ganancia <i>Jackknife</i> para la muestra test .....	36
<b>Tabla 4.</b> Valores de máxima verosimilitud para cada uno de los tres caracteres anatómicos con los tres modelos de evolución de caracteres discretos .....	40
<b>Tabla 5.</b> Valores- <i>p</i> o significancias de los estadísticos G para las comparaciones entre los tres modelos de evolución de caracteres discretos.....	40

## Índice de Gráficos

<b>Figura 1.</b> Distribución de la sección <i>Huicungo</i> en función de las tres subsecciones reconocidas por Kahn & Millán (2013) .....	3
<b>Figura 2.</b> Distribución de la sección <i>Huicungo</i> en función de los dos clados identificados por Roncal <i>et al.</i> 2015 .....	11
<b>Figura 3.</b> Distribución de las especies de la sección <i>Huicungo</i> pertenecientes al clado NAFB identificado por Roncal <i>et al.</i> 2015 .....	12
<b>Figura 4.</b> Distribución de las especies de la sección <i>Huicungo</i> pertenecientes al clado CAF identificado por Roncal <i>et al.</i> 2015 .....	13
<b>Figura 5.</b> Espécimen de <i>Astrocaryum macrocalyx</i> colectado en la ciudad de Iquitos, Perú.....	14
<b>Figura 6.</b> Esquemas de secciones transversales de foliolo de dos especies de <i>Astrocaryum</i> , adaptados de Millán & Kahn 2010. Figura A, <i>A. carnosum</i> , figura B, <i>A. faranae</i> . Obsérvense los tamaños de las células hipodérmicas.....	16
<b>Figura 7.</b> Árbol filogenético de “evidencia total” estimado con la metodología de máxima verosimilitud y obtenido a partir de la concatenación de las seis regiones nucleares y cinco cloroplastidiales. La barra negra representa el número promedio de cambios por sitio.....	28
<b>Figura 8.</b> Árboles de especies obtenidos con la concatenación de las 6 regiones nucleares y 5 cloroplastidiales. A. Árbol obtenido con *BEAST, B. Árbol obtenido con NJst, C. Árbol obtenido con STAR. Los números sobre los nodos representan probabilidades posteriores en “A” y soportes bootstrap en “B” y “C” .....	29
<b>Figura 9.</b> Proyección de las dos primeras componentes del análisis de componentes principales (PC 1 vs PC2) realizados con datos bioclimáticos, de	

topografía y tipos de suelos en cada punto de ocurrencia para los dos clados identificados en el análisis filogenético.....	31
<b>Figura 10.</b> Modelo de distribución potencial del clado NAFB estimado en MAXENT v3.3.3. Escala: Probabilidad de ocurrencia de especímenes.....	32
<b>Figura 11.</b> Modelo de distribución potencial del clado CAF estimado en MAXENT v3.3.3. Escala: Probabilidad de ocurrencia de especímenes.....	33
<b>Figura 12.</b> Gráficos de cajas para las 3 variables más informativas según los modelamientos de distribuciones potenciales, para los clados NAFB y CAF. A. Altitud en metros sobre el nivel del mar. B. Estacionalidad de la precipitación expresada en milímetros. C. Precipitación en el trimestre más cálido, expresado en milímetros.....	34
<b>Figura 13.</b> Reconstrucción de estados ancestrales para la pared celular externa en la hipodermis de la cara abaxial. Se indican sobre cada nodo las probabilidades de ambos estados, y se resalta con números las probabilidades para el ancestro del clado NAFB y CAF. El asterisco indica el estado esperado en condiciones de precipitación baja .....	37
<b>Figura 14.</b> Reconstrucción de estados ancestrales para la ubicación del Aerénquima. Se indican sobre cada nodo las probabilidades del estado ancestral, y se resalta con números las probabilidades para el ancestro del clado NAFB y CAF. Para el clado CAF, se excluye la especie <i>A. murumuru</i> y se resalta solo el ancestro del nodo conformado por <i>A. huicungo</i> , <i>A. carnosum</i> , <i>A. perangustum</i> , <i>A. gratum</i> , <i>A. faranae</i> y <i>A. ulei</i> . El asterisco indica el estado esperado en condiciones de precipitación baja .....	38
<b>Figura 15.</b> Reconstrucción de estados ancestrales para el tamaño de las células hipodérmicas. Se indican sobre cada nodo las probabilidades del estado ancestral, y se resalta con números las probabilidades para el ancestro del clado NAFB y CAF. El asterisco indica el estado esperado en condiciones de precipitación baja .....	39

**Figura 16.** Árbol consenso al 50% de los 23 árboles igualmente más parsimoniosos hallados con la información anatómica y morfológica. La barra inferior representa la escala del número de pasos. Los números sobre cada nodo representan soportes bootstrap .....42

## **1. Introducción**

### **1.1. Diversificación en especies sudamericanas**

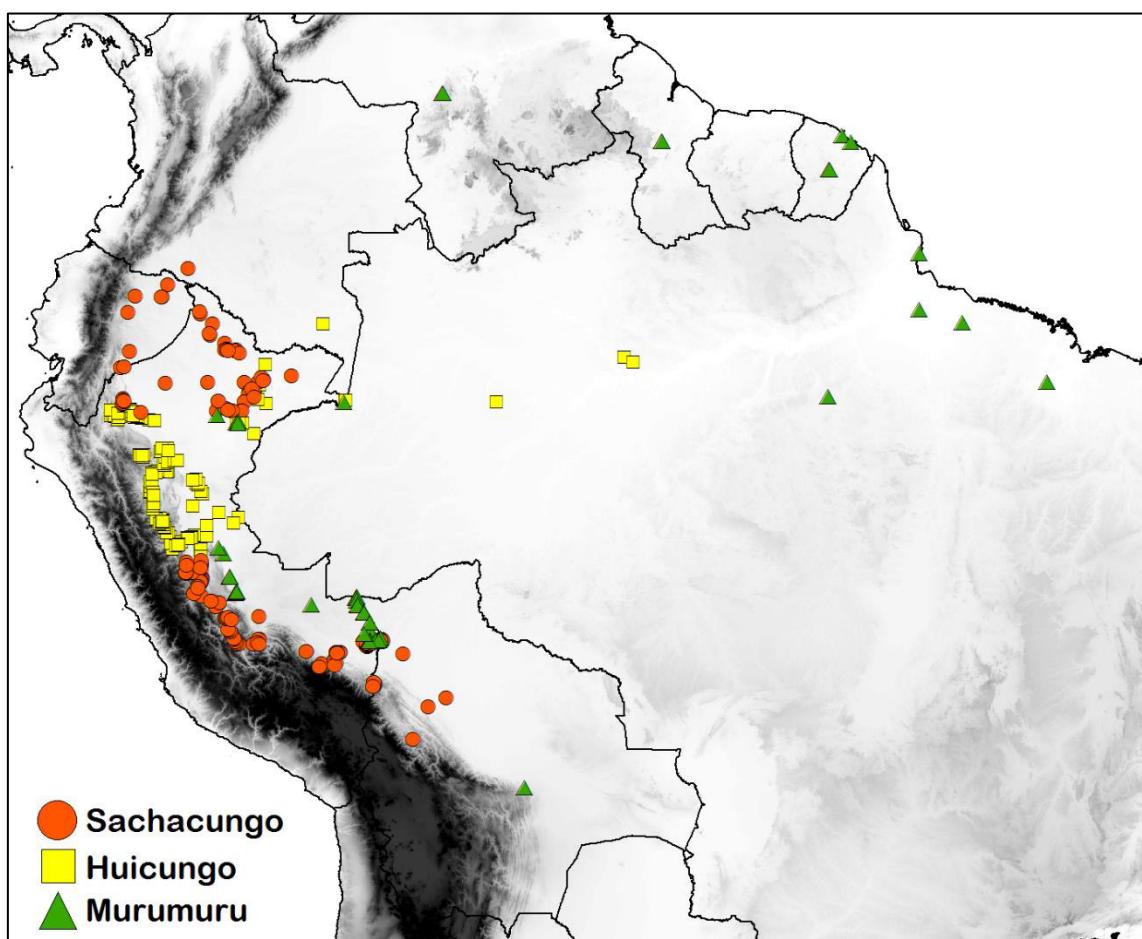
Estudios filogeográficos realizados en especies sudamericanas han establecido que los patrones de disyunción se encuentran relacionados con el clima tanto presente como pasado, tipos de suelos, barreras geográficas como ríos y montañas. El más claro ejemplo de este caso lo constituye el proceso de formación de la cordillera de los andes: la orogénesis andina, que ha promovido la diversificación de diversos linajes bajo la forma de diferenciación de nicho a través de gradientes de temperatura y elevación. La heterogeneidad edáfica ha sido también atribuida como una fuente de especiación en plantas de la cuenca del Amazonas, como muestra de ello se encuentra el estudio filogenético realizado en la tribu *Protiaeae* de la familia *Burseraceae*, en la que se evidenció la asociación entre tipos de suelos (arenoso, arcilloso, terrazas aluviales) y convergencia evolutiva como mecanismo de adaptación, esto es especialización edáfica (Fine *et al.* 2005). La segregación de especies es también promovida por discontinuidades climáticas, por ejemplo el bosque tropical estacionalmente seco (STDF, por sus siglas en inglés) restringe la dispersión de semillas entre maeso y Sudamérica en la especie *Ficus insipida* (Honorio Coronado *et al.* 2014). Por otro lado, en el lagarto *Anolis punctatus* muestra una estructura filogeográfica en poblaciones presentes de la amazonia occidental, central y el bosque atlántico (Prates *et al.* 2016). Las especies por tanto muestran patrones de distribución y adaptaciones en respuesta de las características del medio en el que se han desarrollado y evolucionado. Las palmeras (Arecaceae) se desarrollan en hábitats diversos en el Neotrópico, incluyendo bosques inundados y no inundados, bosques montanos y sabanas, y alcanzan su mayor diversidad en la Amazonia Occidental (Kahn & de Granville 1992; Dransfield *et al.* 2008), tal como fue reportado en un estudio realizado por Kahn & de Granville (1992) para la diversidad de palmeras en el valle del río Ucayali en donde alcanza uno de los niveles más altos, con 7000 individuos de 29 especies en una superficie de 0.79 hectáreas. Las palmeras son componentes importantes en la estructura de los bosques, proveen hábitat y alimento para animales (Kahn & de Granville 1992).

## 1.2. El género *Astrocaryum*. Sistemática, ecología y biogeografía

El género *Astrocaryum* (Arecaceae: Arecoideae: Cocoseae: Bactridinae) está presente en los ecosistemas tropicales de Sudamérica, muy comunes en la cuenca del río Amazonas, y en los bosques Atlánticos y Pacíficos de Centro América. Las 40 especies que lo conforman presentan muchas formas de vida, desde palmeras altas hasta pequeños individuos acaulescentes (de tallos poco desarrollados) y todas se caracterizan por la presencia de espinas (Kahn 2008).

Las especies de este género habitan pantanos, riveras, así como suelos secos, arcillosos, arenosos, también se encuentran en sabanas y ecosistemas secos. Muchas especies habitan los valles Orientales de los Andes, ambientes influenciados por la Amazonia y generalmente no crecen a más de 1000 metros (a excepción de *A. faranae* que alcanza los 1650m). Kahn (2008) clasifica el género *Astrocaryum* en 3 subgéneros, a saber, *Astrocaryum*, *Mumbaca* y *Monogynanthus*. El primero se caracteriza por 1) sus frutos con epicarpo amarillo-naranja, 2) el perianto en forma de copa y 3) espinas en el pecíolo. El segundo subgénero se caracteriza por 1) la apertura del epicarpo al madurar el fruto, 2) sus flores pistiladas protegidas por espinas densas y cubiertas en un raquis negro. El tercer subgénero, se caracteriza por 1) sus frutos con epicarpo protegido por un indumento y 2) usualmente con solo una flor pistilada en la base de la raquilla. La sección *Huicungo* pertenece al subgénero *Monogynanthus* y está conformada por 15 especies, 12 de las cuales forman parte de la flora nacional incluyendo 4 especies endémicas (Millán 2006), particularmente estas últimas presentan una distribución parapátrica, y asociadas a barreras hidrográficas, ecológicas y geológicas (Kahn *et al.* 2011), es decir, las poblaciones de una especie no se intersectan con las poblaciones de otra, sino que mantienen un patrón discreto. Así pues, a excepción de *A. macrocalyx* y *A. urostachys* que tienen un área muy limitada (Vargas & Pintaud 2008), en casi todos los casos existen barreras geomorfológicas, ecológicas e hidrográficas que aislan las especies de este género. Los ríos Ucayali y Amazonas actúan como barreras geográficas entre *A. javarensis* y *A. macrocalyx*, el río Madre de Dios por otro lado, aisla a *Astrocaryum gratum* de *A. ulei*. Afloramientos rocosos como el arco de Iquitos separan a *A. macrocalyx*

de *A. urostachys* mientras que la Cordillera Vilcabamba es la barrera natural entre *A. gratum* y *A. perangustatum*. Puntos geográficos con diferencias de vegetación y drenaje determinan también las distribuciones entre *Astrocaryum javarens* y *A. chonta*, asimismo entre *Astrocaryum carnosum* y *A. faranae*. De acuerdo con Kahn (2008) esta sección se clasifica en tres subsecciones definidas por características de la flor pistilada, a saber: *Murumuru*, cuyo cáliz es glabro, más pequeño que la corola y ligeramente tridentado; *Huicungo*, con cáliz espinoso y *Sachacungo*, cuyo cáliz es glabro o con espinas y más largo que la corola. La distribución de acuerdo con estas categorías se esquematiza en la Figura 1.



**Figura 1.** Distribución de la sección *Huicungo* en función de las tres subsecciones reconocidas por Kahn & Millán (2013).

La sinapomorfía de la sección *Huicungo* corresponde a una raquilla (o ramas de las inflorescencias) glabra, es decir con una pilosidad muy menuda, en la región proximal, la cual presenta setas o pelos en las otras secciones del

subgénero *Monogynanthus* (Kahn 2008; Kahn & Millán 2013). La identificación de las especies de la sección *Huicungo* requiere de la combinación de caracteres morfológicos de la flor pistilada y del fruto (Kahn & Millán 2013). Se ha propuesto también el empleo de caracteres anatómicos de la lámina, la vena media, el peciolo y la vaina (Millán & Kahn 2010), por ejemplo los estomas presentan características compatibles con la clasificación infragenérica de *Astrocaryum*, mientras que la posición de las células terminales subsidiarias caracteriza a las diferentes subsecciones. El conocimiento de la evolución de los caracteres anatómicos en estos vegetales puede ofrecer indicios de las condiciones (climáticas, tipo de habitat) bajo las cuales se han diferenciado estas especies. Tal es el caso de *A. jauari*, que presenta un aerénquima desarrollado para el transporte de gas desde las hojas hasta la raíz; mecanismo empleado en condiciones de hipoxia en temporadas de inundaciones en los bosques de aguas blancas y negras (Schluter *et al.* 1993).

### 1.3. Relevancia económica de *Astrocaryum*

La importancia económica de estos vegetales como fuente de construcción, fibra, alimento, medicinal y ornamental se evidencia rápidamente al observar las comunidades rurales (Sosnowska & Balslev 2009). En el Neotrópico las palmeras están representadas por 788 especies en 67 géneros correspondientes a cuatro de las cinco subfamilias reconocidas (Baker *et al.* 2009). *Astrocaryum* G. Mey es uno de los seis géneros de la subtribu Bactridinae en la tribu Cocosae y comprende 40 especies (Kahn 2008) distribuidas desde América Central hasta Brasil y Bolivia, generalmente por debajo de los 1000 m de altitud. Este género ha sido materia de estudio en campos como dinámica de poblaciones y dispersión (Cintra & Horna 1997; Galetti *et al.* 2006), biología reproductiva (Consiglio & Bourne 2001), conservación y etnobotánica (Coomes 2004). Muchas de las especies de *Astrocaryum* son empleadas por las comunidades nativas como fuente de aceite, fibra y alimento (Kahn, 2008). Un hecho muy generalizado de las palmeras corresponde a su completo aprovechamiento por las poblaciones locales y nativas, es decir, no hay parte de la planta que no tenga un uso práctico. Tal como se detalla a continuación, algunas de ellas tienen importancia etnobotánica y otras se comercializan en los poblados locales.

Los frutos de las especies de esta sección como *Astrocaryum acaule*, *A. gratum*, *A. gynacanthum*, *A. jauri*, *A. carnosum*, *A. murumuru*, *A. ulei* y *A. urostachys* (Fouqué 1975; Anderson 1978; Balick 1988; Boom 1988; Kahn & Millán 1992; Millán 1998; Balslev *et al.* 2008) son consumidos y son también empleados en la producción de aceite. Con respecto a ello se conoce de una aparente homogeneidad en la composición de diferentes especies de cerca de 20% de grasa presente en el mesocarpo, principalmente compuesta de ácidos palmítico y oleico, mientras que entre 20-35% en el endospermo mayormente de ácido laurico (Coradin & Lleras 1983; Pesce 1985; Pinheiro & Balick 1987; Lleras & Coradin 1988; Oboh & Oderinde 1988).

Con respecto a los frutos de algunas especies como *Astrocaryum aculeatum* y *A. vulgare*, fueron desarrollados proyectos de acopio (Lima *et al.* 1986) y colecciones de germoplasma (Lima & Costa 1991), se sabe que el mesocarpo es rico en provitamina A (Cruz *et al.* 1984; Cavalcante 1974), el mismo que produce una pulpa grasosa empleada en la elaboración del “bouillon d'awara”, una bebida muy tradicional en la Guyana Francesa consumida en la Pascua (Fouqué 1975; Kahn 1997). Por otro lado, los frutos de *A. aculeatum* son vendidos en mercados locales y calles de los pueblos de Manaos (Brasil), para la elaboración de jugos y helados, consumidos también en los desayunos (Kahn & Moussa, 1999). Schroth *et al.* (2004) estudiaron el manejo, uso extractivo y la domesticación *in-situ* de estas especies en una localidad pequeña de Rio Preto da Eva en Amazonia Central. Las hojas, por otro lado, son apreciadas por su calidad de fibra en *Astrocaryum jauri*, *A. aculeatum*, *A. vulgare* (Barbosa Rodrigues 1903). Las especies *A. standleyanum* y *A. chambira* son apreciadas a nivel comercial local y nacional en Ecuador, Colombia y Perú (Kahn 1988; Gomez *et al.* 1996).

Las hojas tiernas de las palmeras son empleadas en la elaboración de “palmito”. En *Astrocaryum jauri* se conoce de un uso intensivo en la región de brasilera de Barcelos (Kahn 1997). Se cree además que el palmito de muchas especies podría presentar actividad contra la hepatitis (Balslev *et al.* 2008). Las hojas, por otro lado, son aprovechadas en la elaboración de cestas y como coberturas de los techos de las viviendas como es en el caso de *Astrocaryum farinosum*; mientras que los tallos de *Astrocaryum jauri*, *A. aculeatum* y *A.*

*triandrum* son empleados como material de construcción (Mejía 1988, Balslev & Moraes 1989, Galeano-Garcés *et al.* 1988). Con respecto a las raíces de *Astrocaryum*, la especie *A. vulgare* es empleada por la tribu *Palikur* (Brasil) contra la furunculosis (Grenand *et al.* 2004). Por otro, se han reportado también los efectos anti hepatitis, anti-malaria y anti-fiebre amarilla del extracto de las raíces de *A. chambira* (Balslev *et al.* 2008). Por último, la savia de *A. ciliatum* está reportada por La Rotta *et al.* (1989) como empleada contra la mordeduras de serpientes. Habiendo expuesto las aplicaciones etnobotánicas y comerciales de *Astrocaryum*, se debe mencionar que el estudio de las relaciones evolutivas, la diversidad genética y el origen de este género podrían brindar pautas para futuros planes de aprovechamiento y mejoramiento. Por ejemplo, al identificar los centros de mayor diversidad genética, se puede establecer áreas de conservación *in-situ* o extraer material para germoplasma (conservación *ex-situ*).

#### **1.4. Marcadores moleculares**

Las secuencias de ADN constituyen en la actualidad una fuente importante de información evolutiva, y representan la digitalización de parte del material hereditario contenido en los genomas de muchas especies vivas e incluso extintas (Coleman & Vacquier 2002; Mayer & Soltis 1999). A diferencia de los caracteres morfológicos, las secuencias de ADN permiten obtener caracteres bajo la forma de nucleótidos (adenina, citosina, guanina y timina) que no dependen del criterio y/o experiencia del investigador para ser asignados, dado que son determinados por metodologías de análisis químicos de manera automática. Las secuencias de ADN son por tanto un tipo de marcadores moleculares (Sang 2002). Los vegetales presentan tres tipos de genomas, a saber: nuclear, cloroplastidial y mitocondrial, siendo el primero el de mayor tamaño (bordeando el orden de las megabases) y el que por tanto presenta la mayor cantidad de información; mientras que el segundo, conformado por una hebra circular (bordea el orden de las kilobases) presenta el segundo orden en cuanto al contenido de información evolutiva; en tanto, el tercero no presenta mayor información a nivel de secuencias, si no en cuanto al orden y presencia de los genes en su hebra circular (Wolfe, Li & Sharp 1987). Por este motivo, se han desarrollado numerosos marcadores moleculares para fines filogenéticos

en base a los genomas nucleares y cloroplastidiales. El desarrollo de un estudio filogenético a nivel de especies cercanas, en términos evolutivos, requiere del empleo de regiones suficientemente informativas a dicha escala (DeSalle, Giribet & Wheeler 2002; Hillis, Moritz & Mable 1996). Por tal motivo, se prefiere trabajar con secuencias correspondientes a espacios intergénicos o a intrones, es decir, regiones no codificantes (Álvarez & Wendel 2003). Dado que estas, y en concordancia con la teoría de evolución neutral, evolucionan por deriva genética independientemente de los procesos de selección natural a los que pudieron estar sujetas otras regiones del genoma.

### **1.5. Métodos de reconstrucción filogenética**

La Filogenia estudia los vínculos evolutivos entre los organismos, vivos y/o extintos, en sus diferentes escalas; para ello emplea información de tipo morfológico, anatómico, molecular, entre otros (Felsenstein 1988; Larson 1998). Dicha información es sometida a análisis computacionales complejos para generar hipótesis, más apropiadamente conocidas como hipótesis filogenéticas, que se expresan bajo la forma de un esquema en forma de árbol en la que se representan las relaciones entre ancestros y descendientes (Felsenstein 2004). Las metodologías desarrolladas para la reconstrucción filogenética pueden dividirse en métodos de distancias, cladístico y probabilísticos. Entre los métodos de distancia más conocidos se encuentran los de UPGMA (del inglés unweighted pair group method with arithmetic mean) y neighbor joining (NJ, en español “el vecino más cercano”), y se basan en la generación de hipótesis que expresan las menores distancias genéticas posibles entre las especies en estudio (Lemey, Salemi & Vandamme 2009; Felsenstein 1984). El método cladístico, también conocido como de máxima parsimonia (MP), descansa sobre la premisa de que la mejor hipótesis (o árbol) corresponde a aquella que requiere el menor número de pasos o cambios para expresar los vínculos evolutivos entre las especies de interés, se emplea en estudios morfológicos y moleculares (Goodman *et al.* 1974). Los métodos probabilísticos se basan en el muestreo aleatorio de un universo de topologías posibles y otros parámetros como las longitudes de las ramas del árbol, y emplean algoritmos complejos tanto para la búsqueda topológica como para los parámetros más apropiados en términos estadísticos, entre estos se

encuentran el método de máxima verosimilitud (MV) y de inferencia bayesiana (IB) (Guindon *et al.* 2010; Holder & Lewis 2003). Con el transcurrir de los años, y en paralelo al desarrollo de computadores cada vez más veloces, se han generado algoritmos más eficientes que han facilitado la ejecución de proyectos de investigación en filogenética que emplean gran cantidad de información, como aquella obtenida a través de metodologías moleculares (Avise 2004). Debido a que los métodos de distancia son, en principio, mucho más rápidos que los de cladística o los probabilísticos, constituyen un buen punto de inicio, principalmente cuando se trabaja con virus o bacterias y en ausencia de recombinación; mientras que la metodología cladística permite obtener resultados óptimos al emplear datos morfológicos, es decir estados de caracteres codificados a través de números, incluso con especies extintas; por otro lado, las metodologías probabilísticas (MV e IB) son las más empleadas en estudios basados en información molecular tanto a nivel génico como a nivel genómico o transcriptómico (Edwards 2009) .

### **1.6. Análisis de componentes principales**

Se conoce como análisis multivariado a la disciplina estadística que agrupa a metodologías de análisis de información que permiten trabajar de manera simultánea gran cantidad de variables. Dentro de estas podemos mencionar al análisis de componentes principales (ACP), el cual genera nuevas variables, o componentes, en función de la información inicial, constituyendo por tanto un método de reducción de variables (Jackson 1993). La finalidad de este análisis es evidenciar un patrón de segregación o agrupamiento de los datos, por ejemplo en categorías correspondientes a diferentes especies, hábitats, clados, entre otros. Esto se da mediante un cálculo conocido como “ortogonalización”, a través del cual la información se proyecta en un espacio multidimensional y se minimiza la distancia entre rectas ortogonales (componentes) y cada variable; esto permite identificar las variables más informativas en función del porcentaje de contribución de varianza para cada componente (Peres-Neto, Jackson & Somers 2003). De manera que cada componente extrae un porcentaje de la varianza total de los datos, y a su vez, cada variable contribuye con cada componente. Un análisis de componentes principales eficiente resulta en un máximo de tres componentes, que pueden ser

proyectadas en gráficas de dos o tres dimensiones para evidenciar el patrón de agrupamiento de los datos, asimismo permite identificar las variables más importantes en la discriminación de los mismos. Por esta razón, un ACP puede ser empleado en la identificación de patrones de distribución asociado a variables ambientales en diferentes especies (Novembre & Stephens 2008).

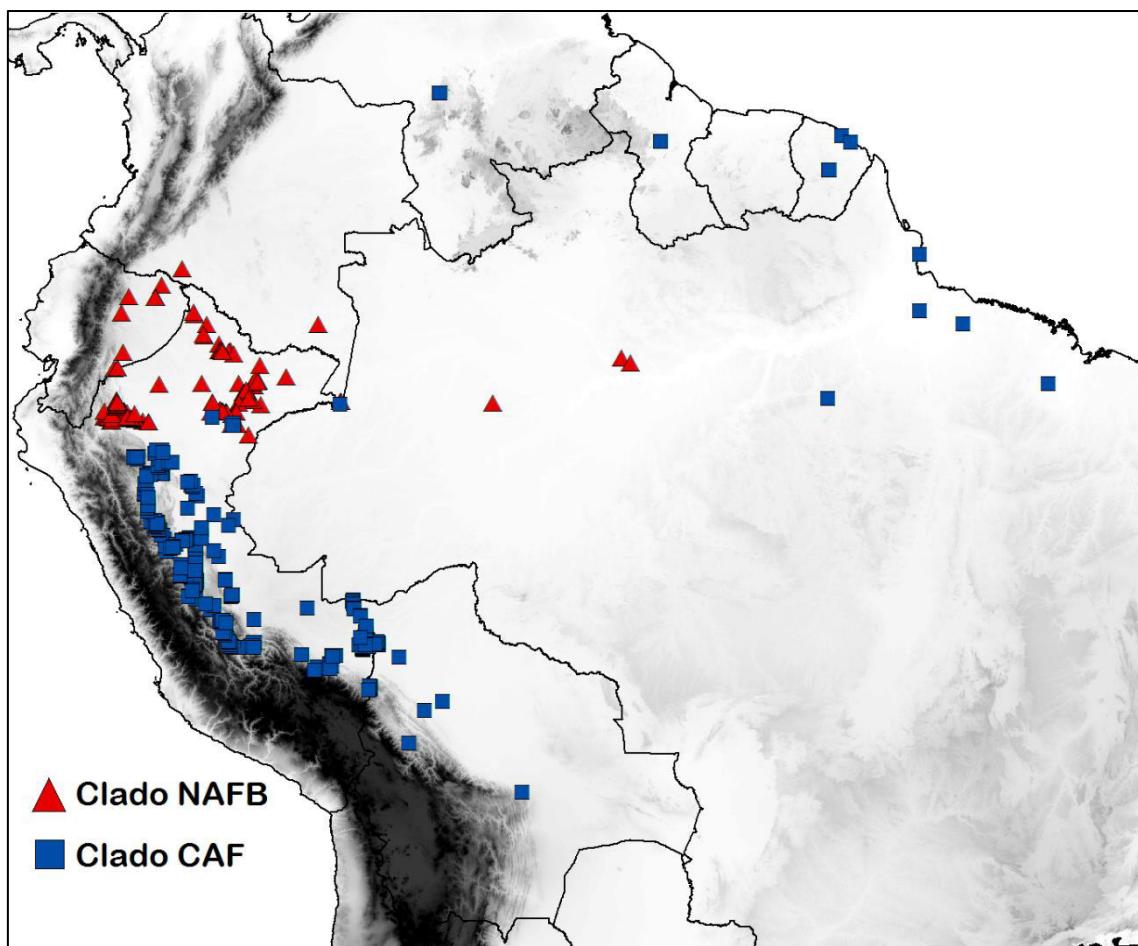
### **1.7. Modelamiento de nicho o de distribución potencial**

Un modelo de distribución potencial es la representación del área geográfica que puede ocupar una especie determinada y se obtiene al procesar simultáneamente información ambiental y coordenadas geográficas (Barve *et al.* 2011). Dicho procesamiento depende de algoritmos que pueden dividirse en estimaciones que consideran coordenadas de ocurrencia/ausencia (como ENFA, del inglés *Environmental Niche Factor Analysis* o GLM del inglés *Generalized Linear Model*) o solo ocurrencia (como MAXENT del inglés *Maximum Entropy*) (Soberón & Nakamura 2009; Hirzel *et al.* 2002; Guisan, Edwards & Hastie 2002). En ambos casos la información ambiental está conformada por capas de información geográfica, también conocidas como *shapefiles*, que en última instancia corresponden a imágenes cuyo cuadrante de resolución mínima (o pixel) contiene tanto información de coordenadas como el dato correspondiente a la variable ambiental que representan, por ejemplo: precipitación media anual, temperatura más baja en el trimestre más seco. Algoritmos como los implementados en el programa MAXENT permiten trabajar con datos de solo presencia, esto facilita el empleo de datos compilados durante distintos intervalos de tiempo como aquellos que, por lo general, se encuentran en las colecciones de museos (Phillips, Anderson & Schapire 2006). MAXENT está basado en inferencia bayesiana y está diseñado para reducir la distancia entre los valores que pueden tomar cada variable ambiental en el área de interés y el promedio estimado a partir de la información ofrecida por las coordenadas de muestreo u ocurrencias, esto se da mediante diferentes transformaciones matemáticas conocidas como *features*. El resultado es una gráfica que representa en escala de colores la probabilidad de ocurrencia de individuos de una especie de interés en un área determinada.

## **2. Antecedentes**

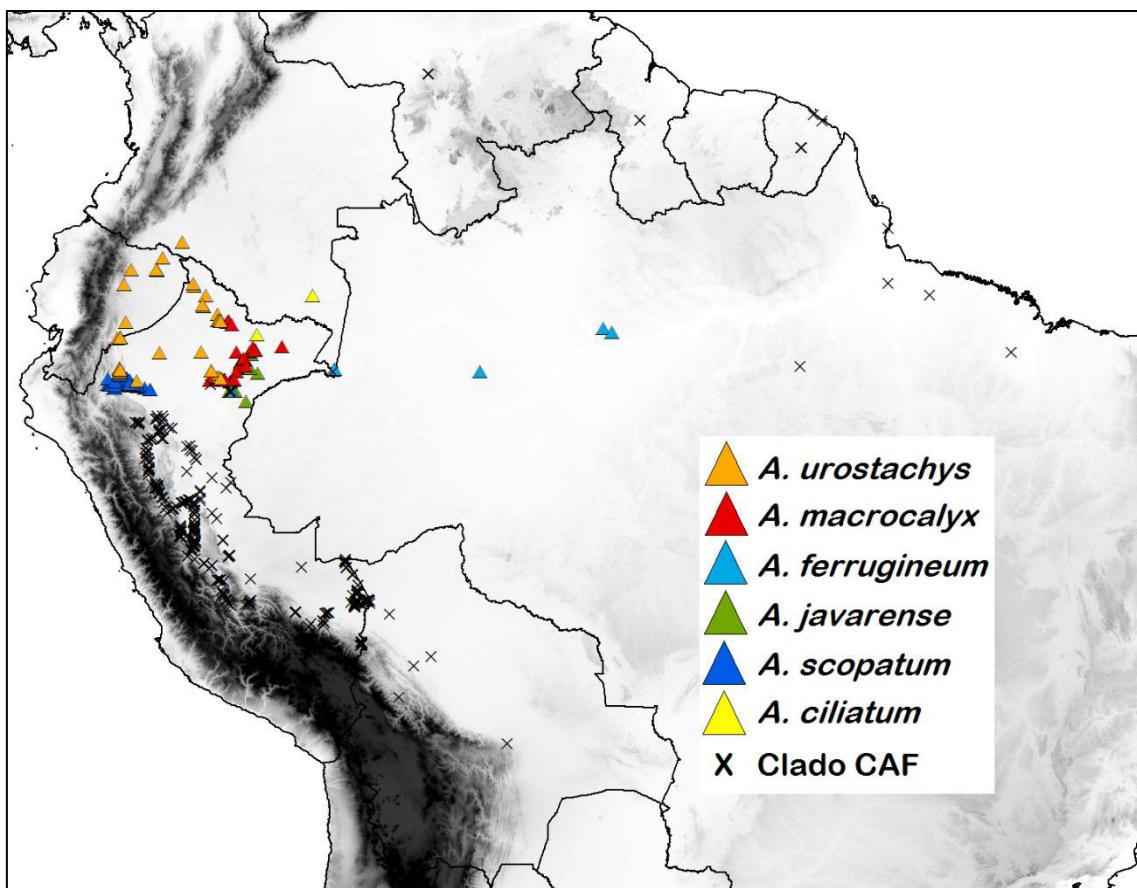
### **2.1. La sección *Huicungo***

El estudio filogenético / filogeográfico más completo en la sección *Huicungo* ha sido desarrollado por Roncal *et. al* (2015), e incluyó especies de las tres secciones (a excepción de *A. ciliatum*) y un grupo externo en el que se consideró al género hermano *Hexopetion*; este empleó cinco regiones cloroplastidiales (psbM–trnD rps16 intron, rps16–trnQ, trnD–trnT, trnG intron) y dos nucleares (WRKY-7 y PRK). La diversificación de la sección ha sido estimada en 6-8 millones de años (ma) (Roncal *et al.* 2013), hecho posterior al drenaje del sistema Pebas, un ambiente acuático que dominó la Amazonía occidental en un periodo comprendido entre 23 y 8 ma (Wesselingh & Salo 2006). El análisis de filogenia molecular y de filogeografía en el grupo reveló una disyunción a los 5°S entre las distribuciones de dos clados identificados y ubicados al norte de la cuenca amazónica (clado NAFB, del inglés *Northern Amazonian Foreland Basin*) y en el piedemonte andino (clado CAF, del inglés *Central Andean Foothills*), con edades de diversificación de 6.7 y 7.3 ma, respectivamente (Roncal *et al.* 2015). La Figura 2 muestra las distribuciones de estos dos clados.



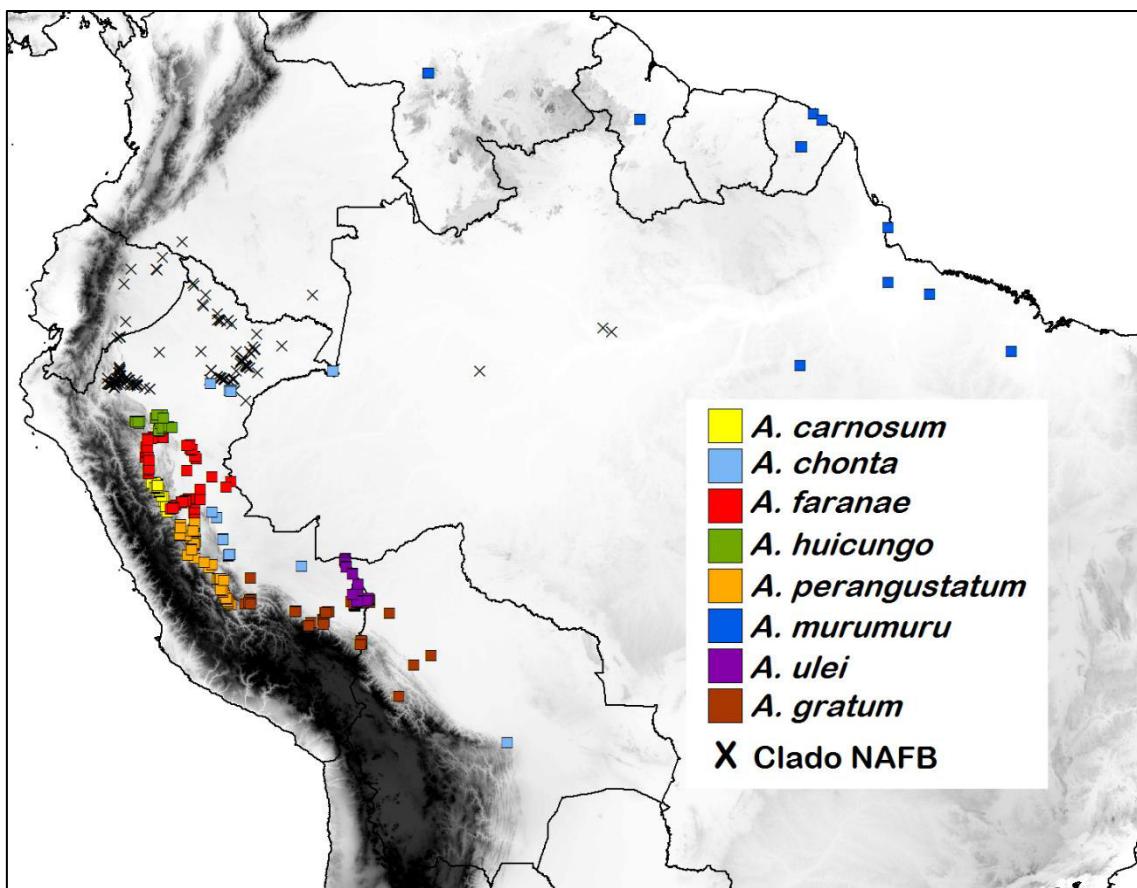
**Figura 2.** Distribución de la sección *Huicungo* en función de los dos clados identificados por Roncal *et al.* 2015.

El clado NAFB, asociado a la cuenca del Amazonas, está conformado por la especies *A. urostachys*, *A. macrocalyx*, *A. javarensis*, *A. scopatum*, *A. ferrugineum* y *A. ciliatum*, su distribución se esquematiza en la Figura 3.



**Figura 3.** Distribución de las especies de la sección *Huicungo* pertenecientes al clado NAFB identificado por Roncal *et al.* 2015.

El clado CAF está conformado por las especies *A. chonta*, *A. huicungo*, *A. faranae*, *A. carnosum*, *A. perangustatum*, *A. murumuru*, *A. ulei* y *A. gratum*. La distribución de este clado se esquematiza en la Figura 4.



**Figura 4.** Distribución de las especies de la sección *Huicungo* pertenecientes al clado CAF identificado por Roncal *et al.* 2015.

El mencionado estudio filogenético realizado por Roncal *et al.* (2015) contrasta con la actual clasificación del grupo en tres sub-secciones (Tabla1), asimismo ha propuesto dos zonas para explicar el origen de la sección, uno de ellos propone el Chocó y el otro, al escudo Guyanés, con posterior dispersión hacia dos áreas con actividades geológicas contrastantes: orogénesis en el arco de Fitzcarrald (FA) y subsidencia para el norte amazónico (consistente con el clado NAFB). Se ha hipotetizado que la emergencia del arco de Fitzcarrald, está asociada con la subducción de la cresta de Nazca, proceso estimado en 9-2 ma (Espurt *et al.* 2010; Gautheron *et al.* 2013). El arco de Fitzcarrald modificó el sistema de drenaje de la cuenca amazónica, contribuyendo con los procesos de sedimentación y ha afectado los patrones edáficos en la Amazonía occidental (Espurt *et al.* 2010). Tal como fue evaluado por Roncal *et al.* (2015), el arco de Fitzcarrald pudo haber contribuido con la diversificación de la sección *Huicungo*; sin embargo, la hipótesis de vicarianza empleada como una consecuencia geológica del origen de dicho arco, la cual postula que “especies

próximas en sus distribuciones y/o separadas por alguna barrera física asociada con el arco, deberían ser especies hermanas identificadas en un análisis filogenético”, no pudo ser corroborado hasta el momento, debido a la escasa información filogenética ofrecida por los marcadores moleculares empleados o a la reciente diversificación del grupo.

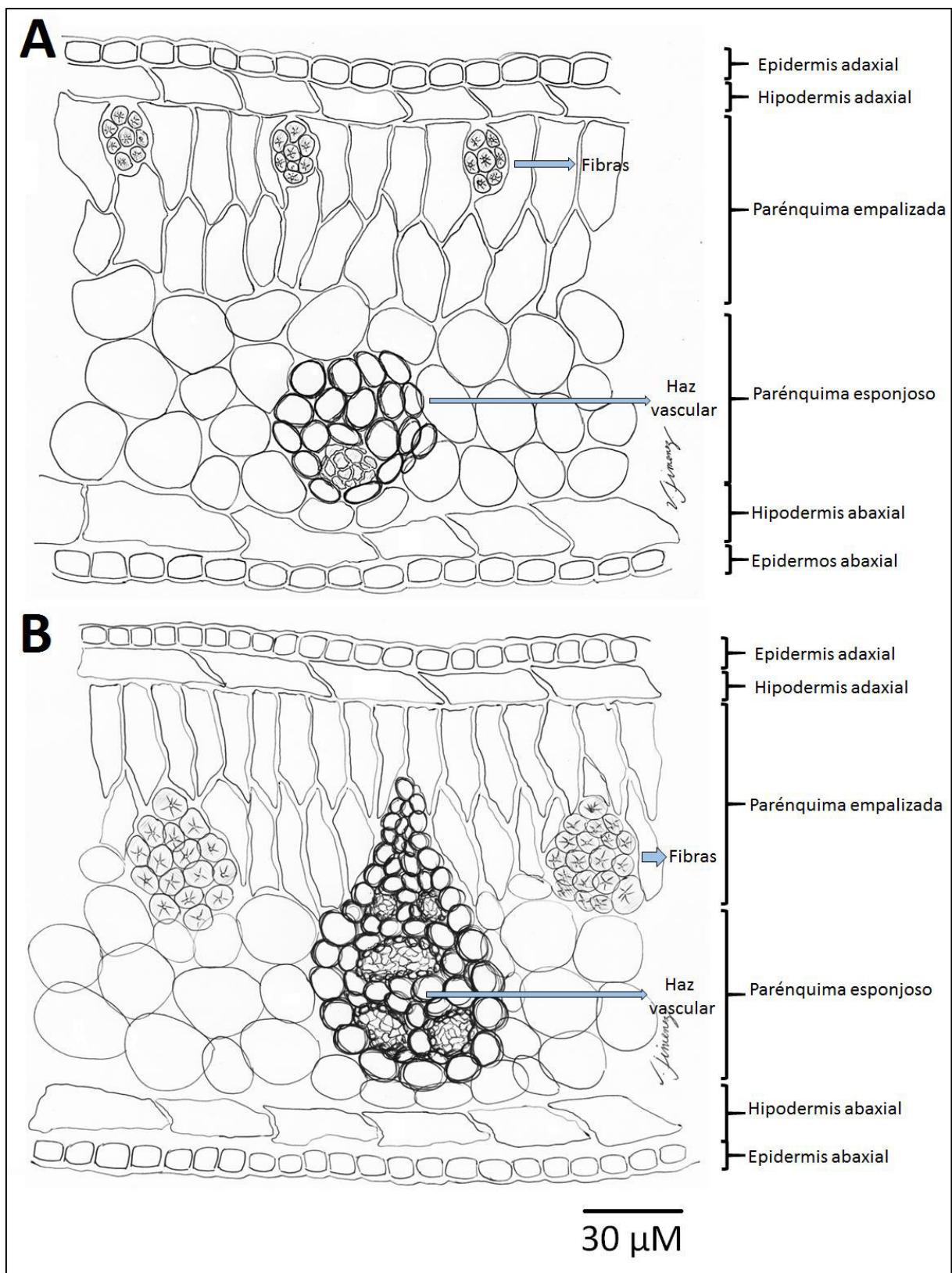


**Figura 5.** Espécimen de *Astrocaryum macrocalyx* colectado en la ciudad de Iquitos, Perú.

**Tabla 1.** Clasificación de la Sección *Huicungo* en comparación con los resultados del análisis filogenético realizado por Roncal *et al.* 2015. (\*) Especie no incluida en este último estudio.

Clado de acuerdo con Roncal <i>et al.</i> 2015	Subsección de acuerdo con Kahn & Millán 2013	Especie
CAF (Central Andean Foothills)	<i>Huicungo</i>	<i>A. carnosum</i>
	Murumuru	<i>A. chonta</i>
	<i>Huicungo</i>	<i>A. faranae</i>
	Sachacungo	<i>A. gratum</i>
	<i>Huicungo</i>	<i>A. huicungo</i>
	Murumuru	<i>A. murumuru</i>
	Sachacungo	<i>A. perangustatum</i>
	Murumuru	<i>A. ulei</i>
NAFB (Northern Amazonian Foreland Basin )	Sachacungo	<i>A. urostachys</i>
	Sachacungo	<i>A. macrocalyx</i>
	<i>Huicungo</i>	<i>A. ferrugineum</i>
	<i>Huicungo</i>	<i>A. javarensis</i>
	<i>Huicungo</i>	<i>A. scopatum</i>
	<i>Huicungo</i>	<i>A. ciliatum</i>
	Sachacungo	<i>A. cuatrecassanum</i> * <sup></sup>

Por otro lado, hasta el momento se han identificado características morfológicas y anatómicas que logran discriminar entre las especies del género, no obstante estas observaciones diagnósticas aún no se han compilado en un estudio filogenético integrativo. El estudio más reciente en evolución de la anatomía foliar en palmeras realizado por Horn *et al.* (2009), no incluyó al género *Astrocaryum*; sin embargo en ese mismo año fue publicada la tesis doctoral de Millán (2009), que se basa en el análisis de caracteres anatómico foliares y morfológicos de 23 especies de dicho género, en ella se obtuvieron los vínculos de las especies que conforman la sección *Huicungo*, aunque con bajos soportes estadísticos. Caracteres como la pared celular de la hipodermis, posición de los haces vasculares, presencia de fibras, entre otros, fueron empleados en el mismo (Figura 6A y 6B).



**Figura 6.** Esquemas de secciones transversales de foliolo de dos especies de *Astrocaryum*, adaptados de Millán & Kahn 2010. Figura A, *A. carnosum*, figura B, *A. faranae*. Obsérvense los tamaños de las células hipodérmicas.

La anatomía foliar podría dar indicios de las condiciones bajo las cuales evolucionó el grupo, como el clima o el tipo de hábitat, entre otros. Por ejemplo, en la especie *A. jauari* un aerénquima bien desarrollado transporta gas desde las ramas hasta las raíces, bajo condiciones de hipoxia en bosques inundados de aguas blancas y negras; tanto el haz como el envés de la hoja están cubiertos de cera y los estomas solo están ubicados en la cara abaxial, ambas características anatómicas son adaptaciones para los bosques inundados (Schluter *et al.* 1993).

Tal como se mencionó líneas arriba, la cantidad de información generada en la sección Huicungo del género *Astrocaryum* abarca aspectos de su distribución, taxonomía, anatomía foliar y filogenia molecular; sin embargo, hasta el momento estos datos no se han integrado en un único estudio que tenga por finalidad explicar la diversificación de esta sección en la amazonia occidental.

## **2.2. Origen de la biodiversidad Amazónica**

### **2.2.1 Pan – Amazonia**

Los registros fósiles indican que en el periodo conocido como el Paleógeno, comprendido entre los 65 y 23 millones de años precedentes a nuestra era, el territorio sobre el que yace la actual Amazonia, la Pan-Amazonia, poseía una diversidad similar a la actual conformada principalmente por mamíferos como roedores, marsupiales y xenartros (Campbell 2004). Asimismo se sabe que la dispersión de primates platirrinos continuó pese a la separación entre Sudamérica y África a través del Atlántico, al igual que la dispersión de especies vegetales de familias como Malpighiaceae, Fabaceae, Annonaceae y Rubiaceae (San Martín & Ronquist 2004). Tales descubrimientos restaron protagonismo a la “hipótesis de los refugios pleistocénicos” como la mejor explicación del origen de la biodiversidad amazónica (Nelson *et al.* 1990) dado que antes del Pleistoceno ya existía una gran diversidad biológica, a esto ha de sumarse la influencia de los Andes.

### **2.2.2. Influencia de los Andes**

La Cordillera de los Andes constituye la única gran cadena montañosa adyacente a una selva tropical en el mundo (Antonelli & Sanmartín 2011) y es probablemente uno de los factores que más ha influido en la biodiversidad

Amazónica durante los últimos 23 millones de años, periodo conocido como el Neógeno. Los Andes surgieron progresivamente desde hace 65 hasta 35 millones de años atrás a una tasa casi constante, pero su orogenia sufrió aceleraciones en el Mioceno temprano (hace 23 millones de años), Mioceno medio (12 millones de años), Plioceno temprano (hace 4.5 millones de años), culminando hace 3.5 millones de años, fecha que coincide con el cierre del Istmo de Panamá. Curiosamente, patrones de diversificación de flora y fauna se remontan bien a estas fechas de aceleramiento (Hoorn & Wesselingh 2010).

### **2.3. La Amazonía occidental**

La Amazonía occidental comprende el bosque húmedo tropical ubicado al este de las vertientes andinas por debajo de los 500 msnm y se extiende por los territorios amazónicos de Perú, Colombia, Ecuador, el noroeste de Bolivia, hasta los estados brasileños de Acre y Amazonas (Fig1 en Montufar & Pintaud 2006). El interés ecológico de la Amazonía occidental radica en su biodiversidad (Steege *et al.* 2006) e historia geológica, la cual es mucho más reciente y dinámica que en la Amazonía oriental (Rossetti *et al.* 2005). La Amazonía occidental está compuesta por numerosas unidades sedimentarias depositadas durante el Cenozoico tardío como consecuencia de la orogénesis andina, que a su vez provocó sucesivos eventos de subsidencia que generaron el drenaje de un sistema acuático (sistema Pebas) al final del Mioceno, y que dio origen al actual sistema fluvial amazónico con flujo hacia el Atlántico (Hoorn 1993; Hoorn *et al.* 1995; Vonhof *et al.* 1998; Rossetti *et al.* 2005). Además de ello, se sabe que la Amazonía occidental ha sufrido dos incursiones marinas breves, al menos en dos ocasiones, durante el Mioceno (Jaramillo *et al.* 2017). La Amazonía oriental, por otro lado, presenta sedimentos Paleozoicos y Precámbrios, y ha permanecido geológicamente estable desde finales del Cretáceo (Aleixo & de Fatima Rossetti 2007).

### **3. Hipótesis**

- Reconstrucciones filogenéticas basadas en mayor cantidad de información molecular en la sección *Huicungo* del género *Astrocaryum* permiten distinguir con soporte estadístico dos clados asociados a ambientes con características climáticas contrastantes.
- La divergencia de nicho ecológico fue un factor crucial en la diversificación de la sección *Huicungo* del género *Astrocaryum*.
- Caracteres morfológicos y anatómico-foliares permiten distinguir entre dos clados de la sección *Huicungo* del género *Astrocaryum* y responden a la divergencia de nicho ecológico.

### **4. Objetivo**

#### **4.1. Objetivo general**

Determinar la relevancia del ambiente como principal factor de la diversificación de la sección *Huicungo* del género *Astrocaryum*.

#### **4.2. Objetivos específicos**

- Obtener una hipótesis filogenética con resolución a nivel interespecífico en la sección *Huicungo* del género *Astrocaryum* mediante el empleo de marcadores nucleares y cloroplastidiales.
- Identificar las variables medioambientales diferenciales entre las distribuciones potenciales de los dos clados identificados en la sección *Huicungo* por estudios previos.
- Identificar los caracteres discriminativos entre los dos clados de *Astrocaryum* sección *Huicungo*.

## 5. Materiales y Métodos

### 5.1. Muestras, extracción de ADN y amplificaciones génicas

Para este estudio se contaron con secuencias nucleotídicas de la base de datos GenBank y correspondientes a los últimos estudios de Roncal *et al.* (2013, 2015) realizados en el grupo. Además, contamos con material biológico, foliolos almacenados en sílica gel. Se contó por tanto con información molecular (secuencias nucleotídicas) o material biológico de las siguientes 13 especies de la sección *Huicungo* del género *Astrocaryum*: *Astrocaryum huicungo*, *A. faranae*, *A. carnosum*, *A. murumuru*, *A. macrocalyx*, *A. urostachys*, *A. javarensis*, *A. chonta*, *A. ferrugineum*, *A. scopatum*, *A. ulei*, *A. gratum* y *A. perangustatum*. No contamos con muestras para las especies *A. cuatrecasanum* y *A. ciliatum*. Como grupo externo, empleamos secuencias nucleotídicas de las siguientes especies: *A. malybo*, *A. vulgare*, *A. chambira*, *A. gynacanthum* y *A. sciophilum*, así como dos especies del género hermano, *Hexopetion alatum* y *H. mexicanum*. Este grupo externo fue definido por las siguientes razones: 1) todas las especies cuentan con gran cantidad de secuencias nucleotídicas depositadas en GenBank, dichas secuencias fueron empleadas en estudios previos y 2) las especies de *Astrocaryum* representan a los 3 subgéneros definidos para el género (*Astrocaryum*, *Munbaca* y *Monogynanthus*).

El material biológico correspondiente a foliolos recibió el siguiente tratamiento: Los foliolos fueron pulverizados con nitrógeno líquido y siguieron el procedimiento de extracción de ADN con el kit de extracción DNeasy plant mini kit (QIAGEN, Valencia, USA). Se amplificaron por reacción en cadena de polimerasa (PCR) las regiones plastidiales psbM-trnD, en intrón rps16, rps16-trnQ, trnD-trnT, e intrón el trnG, para siete individuos; el marcador nuclear WRKY-7 para 14 individuos; el marcador nuclear PRK para cinco individuos; y el marcador nuclear AGAMOUS-1 para 44 individuos. Las amplificaciones se llevaron a cabo en microtubos con un volumen de reacción de 25 uL conformados por una mezcla de 1uL de buffer de Taq (Thermo Fisher Scientific), 0.2 mM de cada nucleótido tris-fosfatado (dNTP), 0.5 unidades de Taq Polimerasa (Thermo Fisher Scientific), 1.25mM de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) y un aproximado de 20 ng de DNA genómico. El ciclaje empleado

estuvo conformado por denaturación inicial a 94°C por 1 minuto y 35 ciclos conformados por denaturación a 94°C por 1 minuto, *annealing* a temperaturas variadas dependiendo del marcador, y extensión a 72°C por 1 minuto; estos ciclos fueron seguidos por una extensión final a 72°C por 10 minutos. Los productos de PCR fueron encargados a la compañía MACROGEN Inc. (Korea del Sur) para su purificación y secuenciamiento.

## **5.2. Obtención de secuencias nucleotídicas y alineamiento de secuencias**

La calidad de los cromatogramas obtenidos fue evaluada con la inspección y verificación de picos de lectura definidos correspondientes a cada nucleótido. Los cromatogramas *forward* y *reverse* ya editados, fueron cargados en el programa SeqTrace para la obtención de secuencias consenso para cada marcador. En este estudio se obtuvieron secuencias para las 5 regiones plastidiales y para 3 regiones nucleares WRKY-7, PRK, AG-1. Adicionalmente se emplearon secuencias nucleares correspondientes a otras regiones y obtenidas por Roncal *et al.* (2013), las cuales fueron el intron 23 de la subunidad II de la RNA polimerasa (RPB-2), fitocromo B (PhyB) y *conserved intron-scanning primer set #4* (CISP4). Las muestras empleadas, sus números de herbario y sus respectivos números de accesión GenBank (Benson *et al.* 2013) se detallan en el anexo 1. Las secuencias fueron alineadas en Muscle (Edgar 2004) y recibieron ajustes manuales en MEGA 6 (Tamura *et al.* 2013). Dado que el empleo de 11 regiones totales para los análisis filogenéticos, puede ser computacionalmente demandante, debido a la cantidad de parámetros que cada región presenta, hecho conocido como “sobreparametrización”, se procedió primero a concatenar las 5 regiones cloroplastidiales en una sola región que fue llamada “plastidial”, ésta luego fue concatenada con las 6 regiones nucleares restantes, operación realizada con el programa SequenceMatrix 1.7.8 (Vaidya *et al.* 2011). El alineamiento total o supermatriz consistió de 8130 nucleótidos para 78 individuos (56 individuos de la sección *Huicungo* y 22 del grupo externo). Esta supermatriz presentó 16% de ausencia de datos y fue generada en los formatos *fasta*, *phylip* y *nexus* para los análisis filogenéticos posteriores (Tabla 2). La supermatriz está depositada en la base de datos *TreeBase* con el código S21294.

**Tabla 2.** Sitios variables resultantes en un fragmento de la supermatriz. Las filas, representan parte de las secuencias empleadas por especies, mientras que se numeran las posiciones variables en las columnas. Nótense los guiones que representan los *gaps* de la supermatriz.

								1	5	6	6	8	8	8	8	8	8	8	8	8
		1	2	3	3	3	3	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	4	5	4	4	0	2	3	5	9	8	9	6	6	6	6	6	6	7	9	0
	9	1	3	0	6	5	5	1	5	4	4	2	3	6	7	8	1	1	1	7
<i>A. carnosum</i> JCP2000	-	-	-	-	-	-	-	T	G	C	A	A	A	T	T	G	C	T	A	
<i>A. chambira</i> JCP0808	G	T	T	C	T	C	C	T	A	C	A	A	A	T	T	T	G	C	T	A
<i>A. chonta</i> JCP2162	G	T	T	C	T	C	C	T	A	C	A	A	A	T	T	T	G	C	T	A
<i>A. ciliatum</i> JCP2430	-	-	T	C	-	-	-	T	A	C	A	A	A	T	T	T	G	C	T	A
<i>A. faranae</i> JCP1856	G	T	T	C	T	A	C	T	A	C	A	A	A	T	T	T	G	C	T	A
<i>A. faranae</i> JCP2408	G	T	T	C	-	-	-	T	A	C	A	A	A	T	T	T	G	C	T	A
<i>A. ferrugineum</i> JCP2175	G	T	T	C	-	-	-	T	A	C	A	A	A	T	T	T	G	C	T	T
<i>A. ferrugineum</i> JCP2431	G	T	T	C	T	C	C	T	A	C	A	A	A	T	T	T	G	C	T	T
<i>A. gratum</i> JCP2424	-	-	-	-	-	-	-	T	A	C	A	A	A	T	T	T	G	C	T	A
<i>A. gynacanthum</i> JCP2192	T	T	T	C	T	C	C	T	A	C	A	A	G	T	T	T	G	C	C	A
<i>A. huicungo</i> JCP2151	-	-	-	-	-	-	-	T	G	C	A	A	A	T	T	T	G	C	T	A
<i>A. javarensis</i> JCP2150	G	T	T	C	T	C	C	T	A	C	A	A	A	T	T	T	G	C	T	A
<i>A. macrocalyx</i> JCP1107	-	-	-	-	-	-	-	T	A	C	A	A	A	T	T	T	G	C	T	T
<i>A. malybo</i> JCP2095	G	T	T	C	T	C	C	T	A	C	A	A	A	A	A	A	A	-	-	-
<i>A. murumuru</i> JCP2158	G	T	T	C	T	A	C	T	A	T	T	A	A	T	T	T	G	C	T	A
<i>A. perangustatum</i> JCP1731	-	-	T	C	T	A	C	T	A	C	A	A	A	T	T	T	G	C	T	T
<i>A. sciophilum</i> JCP1519	G	T	T	A	T	C	C	T	A	C	A	A	A	T	T	T	G	C	T	A
<i>A. scopatum</i> JCP2403	-	-	-	-	-	-	-	T	A	C	A	A	A	T	T	T	G	C	T	T
<i>A. ulei</i> JCP1851	-	-	T	C	T	A	C	T	A	C	A	A	A	T	T	T	G	C	T	A
<i>A. urostachys</i> JCP2156	G	T	T	C	T	C	C	T	A	C	A	A	A	T	T	T	G	C	T	T
<i>A. vulgare</i> JCP2132	-	-	T	C	T	C	C	T	A	C	A	A	A	T	T	T	G	C	T	A
<i>Hexopetion alatum</i> JCP371	G	G	C	C	-	-	-	C	A	C	A	G	T	T	T	T	G	C	T	A
<i>Hexopetion mexicanum</i> JCP370	G	G	C	C	T	C	A	C	A	C	A	G	T	T	C	G	C	T	A	

### 5.3. Reconstrucción filogenética por “evidencia total”

Inicialmente se empleó el programa *PartitionFinder* (Lanfear *et al.* 2012) para hallar la mejor combinación de todas las secuencias (*partition scheme*) que evita la sobre-parametrización mencionada. *PartitionFinder* fragmenta un concatenado de secuencias en dos o más partes y las trata bajo el mismo modelo de sustitución, esto mediante un análisis estadístico de máxima verosimilitud. Una vez hallada la mejor partición, esta información fue de

utilidad para estimar el árbol de máxima verosimilitud en el programa RAxML v8.2.4 (Stamatakis 2006). Para esto se emplearon 100 corridas de verosimilitud bajo el modelo de sustitución GTR + G + I con el algoritmo “*lazy subtree rearrangement*” sobre 100 árboles iniciales de parsimonia. El soporte de los nodos fue evaluado con la metodología SH-aLRT (Shimodaira-Hasegawa-like implemenetation of the approximate likelihood-ratio test, Guindon *et al.* 2010), en lugar de la metodología clásica del *bootstrap* por las siguientes razones: es mucho más rápido, se basa en el alineamiento total en lugar de algunos sitios, y no es tan sensible ante circunstancias de baja señal filogenética (Pyron *et al.* 2011, 2013). El árbol obtenido corresponde a un árbol de genes de *evidencia total*.

#### 5.4. Obtención de árboles de especies

Se estimaron además árboles de especies por tres diferentes metodologías. Las primeras dos, llamadas NJst y STAR, se basan en la metodología de coalescencia sobre árboles de genes ya construidos, y estiman el soporte de los nodos mediante el empleo de árboles bootstrap. Ambas están implementadas de manera gratuita en el servidor STRAW (<http://bioinformatics.publichealth.uga.edu/SpeciesTreeAnalysis/index.php>). Se estimaron 1000 árboles bootstrap con cada región (plastidial, PhyB, AG-1, WRKY-7, PRK y CISP-4) en RAxML v8.2.4 (Stamatakis 2006) bajo el modelo GTR + G + I. Los 6000 árboles resultantes fueron comprimidos en un archivo zip y cargados en STRAW. La tercera metodología, se basa en la coalescencia por inferencia bayesiana sobre regiones génicas y está implementada como la aplicación \*BEAST (Heled & Drummond 2010) del programa BEAST v1.8.2. (Drummond & Rambaut 2007). La búsqueda bayesiana empleo un árbol relajado con una distribución logarítmica normal no correlacionada sobre un modelo de especiación *Yule process*. Fueron empleadas dos corridas conformadas por cadenas de Markov-Montecarlo con un total de 100 millones de generaciones cada una, muestreos de parámetros y árboles cada 1000 generaciones y un descarte o *burn-in* del 25% de datos iniciales. Estas dos corridas fueron fusionadas en LogCombiner v.1.8.2. La convergencia de la cadena resultante fue evaluada por la inspección de valores de tamaño de muestreo efectivo (*Effective Sampling Size*, ESS) mayores a 200 en Tracer v

1.8.2. Finalmente se obtuvo un árbol consenso o de máxima credibilidad de clado con el programa TreeAnnotator v1.8.2. Los tres árboles obtenidos con las metodologías mencionadas fueron editados en FigTree.

### **5.5. Divergencia del nicho ecológico**

Fueron compilados 507 registros de ocurrencia de las 15 especies de *Astrocaryum* sección *Huicungo* de diferentes fuentes como la publicación de Kahn *et al.* (2011), colectas de campo en Bolivia, Perú, Colombia, Ecuador y de la base de datos Trópicos (<http://tropicos.org/>). Se descargaron capas de información atmosférica de precipitación y temperatura de WorldClim a una resolución aproximada de 1km<sup>2</sup> (<http://www.worldclim.org/>), se descargaron capas de información de variables del suelo de la base de datos SoilGrids a una resolución aproximada de 1km<sup>2</sup> (<https://soilgrids.org/>) e información topográfica a una resolución de aproximadamente 250m (<http://srtm.csi.cgiar.org/>). Con esta información se contó entonces con 28 variables en total. La coordenadas geográficas de ocurrencias y las capas fueron cargadas en ArcGIS v10.4 para la elaboración de un mapa de distribución actual y para la generación de una tabla de datos. Para ello se consideraron las 15 especies de la sección como dos clados correspondientes al norte amazónico (NAFB, *North Amazonian Foreland Basin*) y al piedemonte andino (CAF, *Central Andean Foothills*). Se inspeccionó la correlación de las variables ambientales y se seleccionaron aquellas variables con un índice de correlación de Pearson menor o igual a 0.80. Posteriormente se realizó un análisis de componentes principales (ACP) con los datos normalizados con el cálculo de sus logaritmos naturales.

### **5.6. Análisis de componentes principales (ACP) y estimación de distribuciones potenciales**

El cálculo de las correlaciones y el ACP fueron realizados con el programa R. Para estimar las distribuciones potenciales de ambos clados se utilizó el programa MAXENT v3.3.3k (Phillips *et al.* 2006). Este programa emplea el algoritmo de máxima entropía para modelar la distribución posible de un clado mediante la generación de nuevas variables o *features* derivadas de las variables iniciales, y muestra al final imágenes en escala de colores para las

probabilidades de distribución (de 0 a 1). Muestra además la importancia de cada variable en cuanto a la predicción de dicha distribución. Para esta operación, las capas (no correlacionadas) medioambientales, edafológicas y topográfica, fueron redimensionadas a una misma escala de 1 km<sup>2</sup>, limitadas a la mitad superior de Sudamérica y transformadas a formato “ASC”. La estimación estuvo conformada por un promedio de 15 réplicas conformadas por 75% de información para la predicción (*training data*) y 25% para la prueba del modelo (*testing data*). Se emplearon además cinco clases de transformaciones para la generación de *features* (lineal, cuadrática, producto, binaria y limitante); cada réplica estuvo conformada por 500 iteraciones, 10 000 puntos de fondo (background), parámetros de regularización igual a uno y límite de convergencia de 0.00001. La importancia de cada variable en cada modelo fue evaluada con dos medidas, a saber: prueba de *jackknife* y prueba de permutación. La validez del modelo fue evaluada mediante la estimación del “área bajo la curva” (AUC, *area under the receiver operation characteristic curve*). Finalmente, estimamos el porcentaje de intersección entre ambas predicciones mediante los estadísticos distancia de Hellenger (I) y D de Schoener (D), ambas implementadas en el paquete ENMTools (Warren *et al.* 2008) del programa R.

## 5.7. Estimación de Caracteres Ancestrales

Se realizaron reconstrucciones de 35 caracteres anatómicos basados en estructuras de la hoja: vaina, pecíolo y nervadura central (Anexo 2). Estos fueron recodificados en base a 109 caracteres anatómicos descritos por Kahn & Millán (2013). Para esta reconstrucción solo se empleó el árbol de especies obtenido por inferencia bayesiana con el programa \*BEAST (Heled & Drummond 2010). Para las reconstrucciones de caracteres ancestrales se empleó la metodología de máxima verosimilitud implementada con el comando “ACE” en el paquete APE del programa R (Paradise *et al.* 2004). Para ello se emplearon los siguientes tres modelos de evolución de caracteres discretos: 1) ER, del inglés *equal rates*, que considera las mismas tasas de evolución entre los estados de carácter, 2) SYM, del inglés *symmetrical rates*, que considera diferentes tasas de cambio entre estados, pero la misma para las reversiones, y 3) ARD, del inglés *all rates different*, que considera que todos los estados de

caracteres presentan diferentes tasas entre estados y para diferentes direcciones, incluyendo reversiones. Todas las reconstrucciones de los caracteres se realizaron con los tres modelos y se aplicó la estadística G, la que está basada en una distribución de *chi-cuadrado*, para discernir entre todos ellos con niveles de significancia de  $p < 0.05$ . Los resultados de la reconstrucción consisten en gráficos de *pies* sobre cada nodo del árbol filogenético, que indican la probabilidad de cada carácter en dicho ancestro.

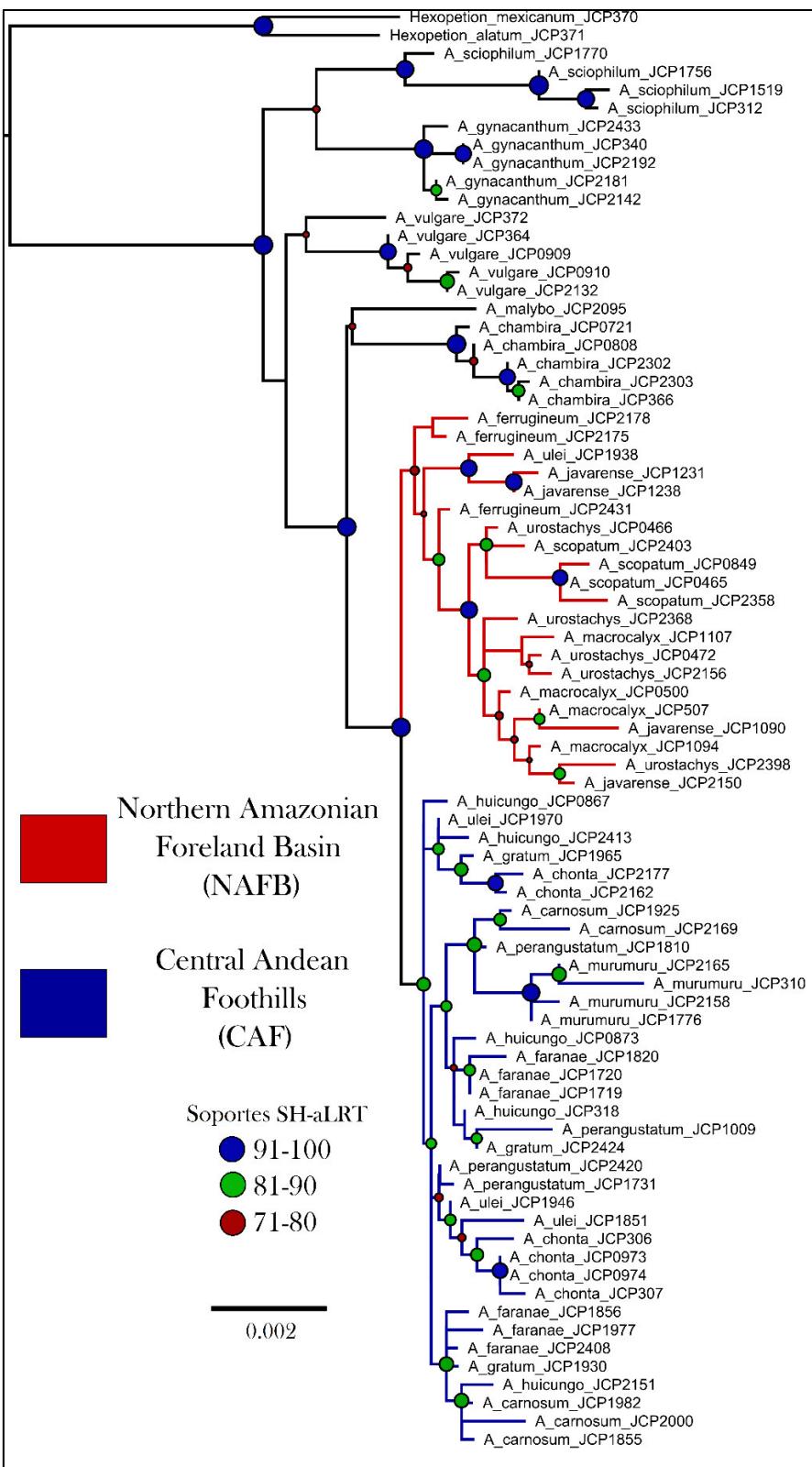
### **5.8. Análisis filogenético con caracteres morfológicos y anatómicos**

Para evaluar el potencial filogenético de caracteres morfológicos, fueron recodificados los 109 caracteres binarios basados en anatomía foliar de la lámina, la vena central, el pecíolo y la vaina y publicados por Kahn & Millán (2013). Recodificamos estos caracteres como “multiestado” y obtuvimos así 35 nuevos caracteres (Anexo 2), esto debido a que el estado “ausente” usualmente no refleja homología y por ello puede generar vínculos incorrectos de parentesco evolutivo al ser considerado en un análisis filogenético (Jenner 2002). Fueron también codificados 31 caracteres extraídos de Kahn & Millán (2013) basados en morfología del tronco, espinas, inflorescencias y flores. Generamos por tanto una matriz de caracteres anatómicos y morfológicos para 14 especies de la sección *Huicungo* y 12 especies del grupo externo (Anexo 3) con la que realizamos un análisis de máxima parsimonia en PAUP\* 4.0b10a (Swofford 2002). Para ello fueron empleadas 1000 búsquedas o réplicas con el algoritmo TBR (Tree-Bisection-Reconnection), retenidos 10 árboles por cada réplica y bajo optimización ACCTRAN (Accelerated Character Transformation). Posteriormente el algoritmo TBR fue aplicado también a todos los árboles retenidos. El soporte estadístico de los nodos fue ensayado con 1000 réplicas *bootstrap*.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Árbol filogenético de “evidencia total”

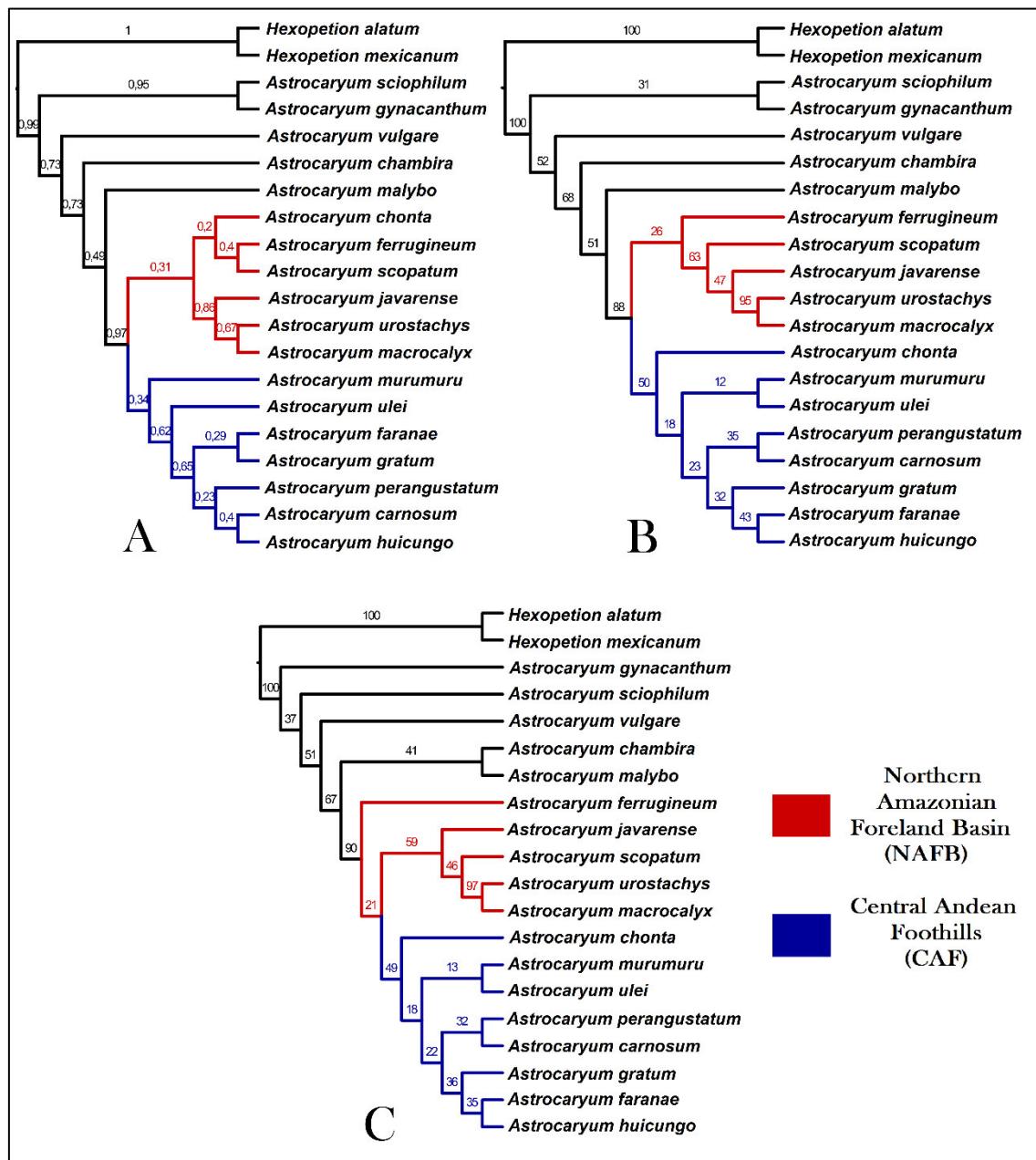
El análisis de particiones realizado en PartitionFinder mostró que la combinación más apropiada fue la siguiente: AG1 + CISP-4 + RPB2: PRK + WRKY-7: PhyB y las regiones plastidiales. Cada una de estas particiones se analizó con el modelo de GTR + I + G, de acuerdo con el criterio de información de Akaike. La topología o árbol resultante por la metodología de máxima verosimilitud en RAxML recuperó la sección *Huicungo* como un grupo monofilético (soporte SH-aLRT de 99). Todas las especies del grupo externo resultaron también como grupos monofiléticos. Los clados NAFB y CAF recibieron soportes SH-aLRT de 80 y 89, respectivamente. Sin embargo, las relaciones interespecíficas dentro de cada uno no están resueltas: se observa un patrón de reticulación, esto es, individuos de diferentes especies aparecen agrupados y con soportes SH-aLRT bajos. Solo la especie *A. murumuru* resultó ser monofilética con un soporte SH-aLRT de 97 (Figura 7).



**Figura 7.** Árbol filogenético de “evidencia total” estimado con la metodología de máxima verosimilitud y obtenido a partir de la concatenación de las seis regiones nucleares y cinco cloroplastidiales. La barra negra representa el número promedio de cambios por sitio.

## 6.2. Árboles de especies

Los árboles de especies obtenidos por las metodologías \*BEAST, NJst y STAR recuperaron la sección *Huicungo* con soportes de probabilidad posterior de 0.97, bootstrap de 81%, bootstrap de 90%, respectivamente (Figura 8).

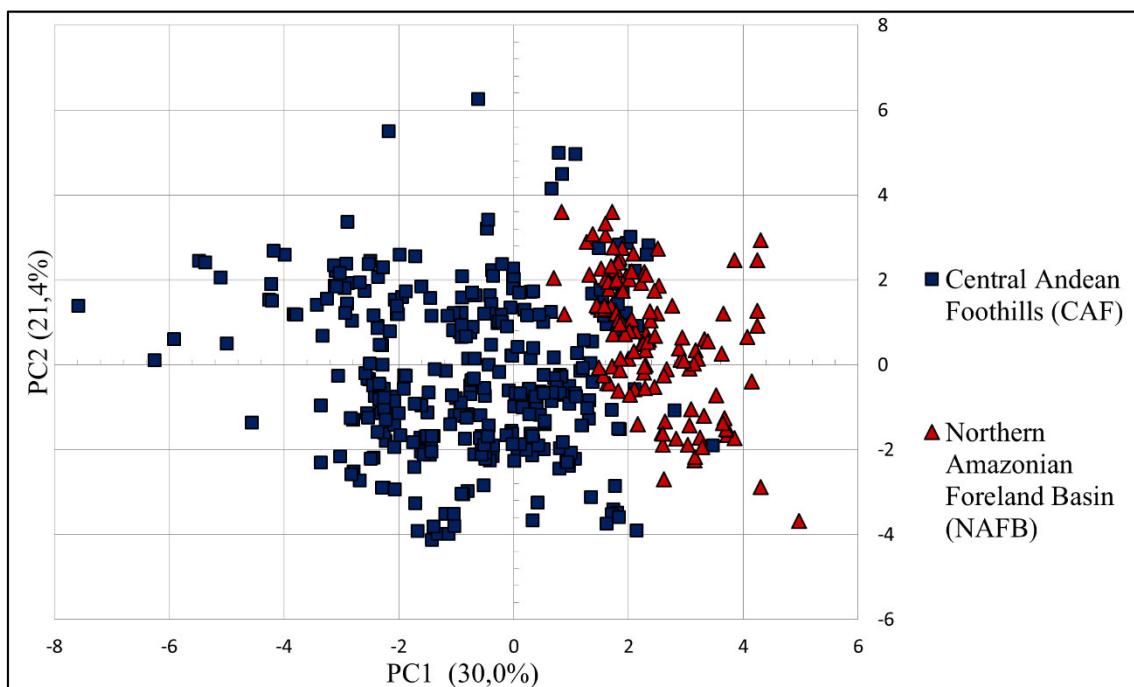


**Figura 8.** Árboles de especies obtenidos con la concatenación de las 6 regiones nucleares y 5 cloroplastidiales. A. Árbol obtenido con \*BEAST, B. Árbol obtenido con NJst, C. Árbol obtenido con STAR. Los números sobre los nodos representan probabilidades posteriores en “A” y soportes bootstrap en “B” y “C”.

Sin embargo, solo en los dos primeros se distinguen los clados NAFB y CAF con soportes de probabilidades posteriores de 0.31 / 0.34 y *bootstrap* de 26% / 50%, respectivamente. En el árbol obtenido con la metodología STAR, el clado NAFB resultó ser parafilético, dado que la especie *A. ferrugineum* fue basal a toda la sección *Huicungo*. Por otro lado, la especie *A. chonta* fue agrupada en el clado NAFB en el árbol \*BEAST (así como en el árbol de *evidencia total* de máxima verosimilitud obtenido con RAxML) y en el clado CAF en los árboles NJst y STAR. Mientras que, las especies *A. macrocalyx* y *A. urostachys* fueron las únicas reconocidas como hermanas con soportes moderados y altos en todas las metodologías (probabilidad posterior de 0.67, *bootstrap* de 95% y *bootstrap* de 97%, respectivamente). Los valores de *tamaño de muestreo efectivo* (ESS), observados en el programa TRACER para el análisis del árbol \*BEAST, resultaron mayores a 200 luego de la fusión de las dos corridas independientes realizadas, con ello aseguramos que nuestras cadenas de Markov-Montecarlo llegaron a una convergencia y que el árbol es apropiado e informativo en términos estadísticos.

### 6.3. Divergencia de nicho ecológico

Las dos primeras componentes del análisis de componentes principales (ACP) extrajeron 51.4% de la varianza total, y lograron distinguir entre los dos clados en estudio (NAFB y CAF) como se muestra en la Figura 9.



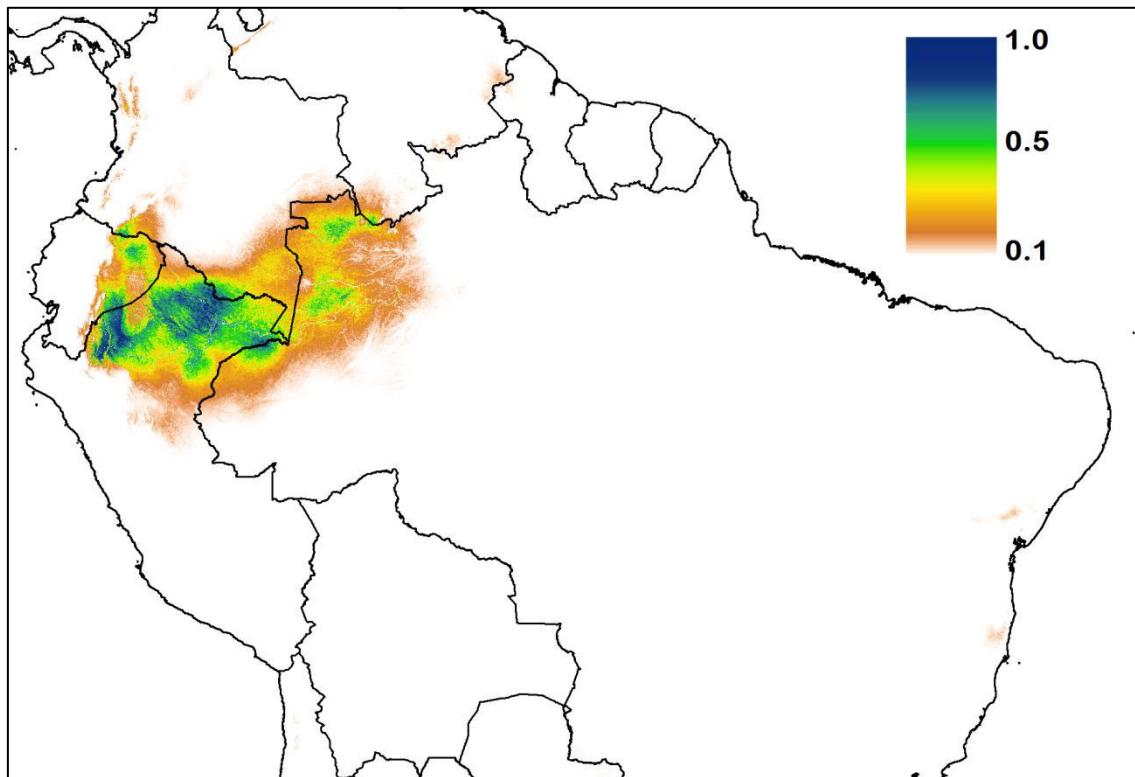
**Figura 9.** Proyección de las dos primeras componentes del análisis de componentes principales (PC 1 vs PC2) realizados con datos bioclimáticos, de topografía y tipos de suelos en cada punto de ocurrencia para los dos clados identificados en el análisis filogenético.

La primera componente estuvo vinculada con las variables siguientes: elevación y temperatura promedio del trimestre más seco (Bio9). Los individuos del clado NAFB crecen a una elevación promedio de 164 msnm ( $\pm 67.3$  msnm) y valores de Bio9 promedio de 25.8 °C ( $\pm 0.45$  °C); mientras que los individuos del clado CAF crecen a una elevación promedio de 457 m.s.n.m. ( $\pm 291$ ) y Bio9 de 23.8 °C ( $\pm 1.6$  °C).

La validación de los modelos de distribución obtenidos en MAXENT indicó que cada uno es estadísticamente significativo con respecto de modelos estimados al azar. Los valores de AUC obtenidos para los *test data* y *training data* fueron los siguientes: 0.977 y 0.981 para el clado NAFB, respectivamente; y 0.950 y 0.956 para el clado CAF, respectivamente. Los mapas de distribución

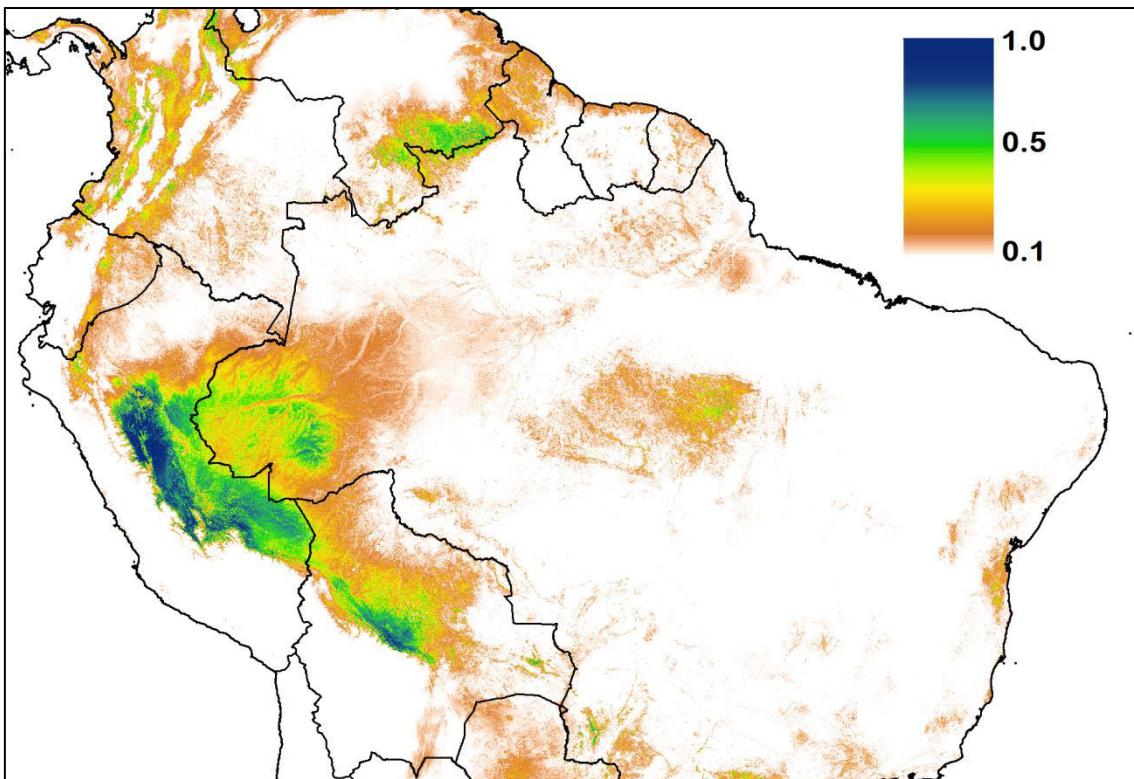
resultantes para cada clado muestran áreas independientes y con baja intersección aparente (Figuras 8 y 9).

El área de distribución potencial del clado NAFB se encuentra restringido a las cuencas norte de los ríos Marañón y Amazonas en el Perú, nordeste de Ecuador y en menor grado en Colombia y el oeste de Brasil (Figura 10).



**Figura 10.** Modelo de distribución potencial del clado NAFB estimado en MAXENT v3.3.3. Escala: Probabilidad de ocurrencia de especímenes.

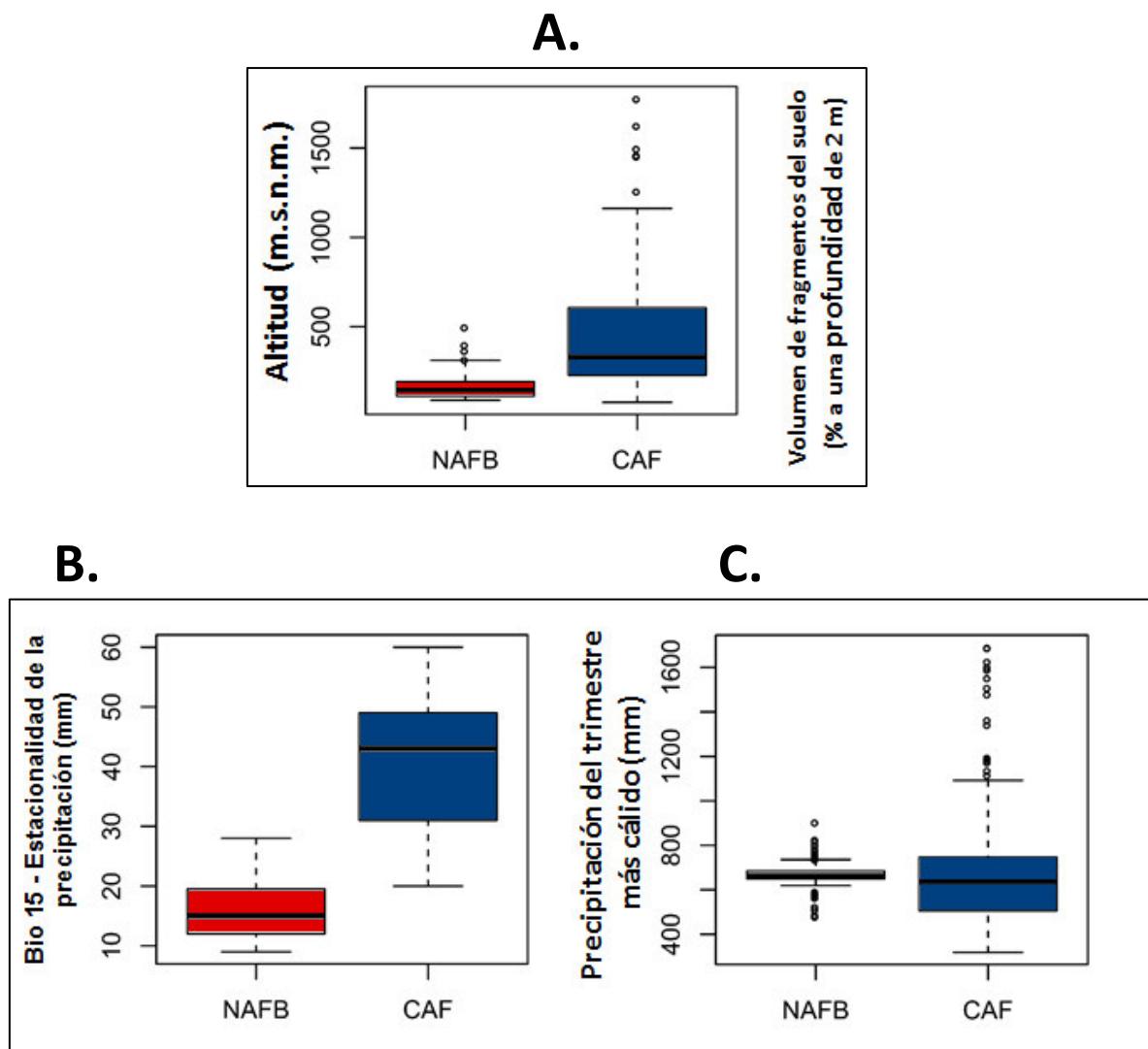
Por otro lado, el área de distribución potencial del clado CAF, ocupa las vertientes orientales de los Andes de Perú y Bolivia, y con menor incidencia en el oeste de Brasil (Figura 11). Se observan áreas con baja probabilidad en el resto de Brasil y la Guyana Francesa, probablemente debido al menor número de ocurrencias de especies de la sección, como *A. murumuru*, *A. ferrugineum* y *A. ulei*, con respecto a las otras especies.



**Figura 11.** Modelo de distribución potencial del clado CAF estimado en MAXENT v3.3.3. Escala: Probabilidad de ocurrencia de especímenes.

Las variables que ofrecieron mayor contribución a las predicciones correspondieron a la altitud y a las variables climáticas. Las altitudes promedio de los clados NAFB y CAF fueron estimadas en 163.92 msnm ( $\pm 67.24$  msnm) y 457.10 msnm ( $\pm 290.93$  msnm), respectivamente (Figura 12A). Dentro de aquellas variables bioclimáticas, dos de las más importantes fueron las siguientes: **variación estacional de la precipitación** (Bio15) y **precipitación del trimestre más cálido** (Bio18). De acuerdo con estas predicciones, las especies del clado NAFB crecen en ambientes con valores promedio para Bio15 de 16.02 mm ( $\pm 4.18$  mm), mientras que las del clado CAF crecen en ambientes con valores de promedio de Bio15 de 41.61 mm ( $\pm 9.87$  mm) (Figura 12B). La variable Bio18, por otro lado, no mostró diferencias significativas en cuanto a estas predicciones para ambos clados. Dado que la variable **precipitación del trimestre más seco** (Bio14) estuvo correlacionada con Bio15 para nuestros datos, se consideró de importancia mostrar las diferencias de los valores estimados para esta en los dos clados estudiados. El clado NAFB habita áreas de distribución potencial donde la variable Bio14 tiene

valores promedio de 164.55 mm de precipitación ( $\pm$  24.92 mm), mientras que las especies del clado CAF tiene valores promedio de 80.05 mm de precipitación ( $\pm$  38.82 mm) (Figura 12C). La intersección de ambas áreas de distribución potencial estimadas con los coeficientes de *distancia I de Hellenger* y *D de Schoener* resultaron en 0.2684 y 0.0739, respectivamente.



**Figura 12.** Gráficos de cajas para las 3 variables más informativas según los modelamientos de distribuciones potenciales, para los clados NAFB y CAF. A. Altitud en metros sobre el nivel del mar. B. Estacionalidad de la precipitación expresada en milímetros. C. Precipitación en el trimestre más cálido, expresado en milímetros.

La tabla 3 muestra de manera resumida la importancia de cada variable en la estimación de los modelos de distribución potencial para cada clado, en cada caso obsérvese la ganancia *Jackknife* para la muestra *test*.

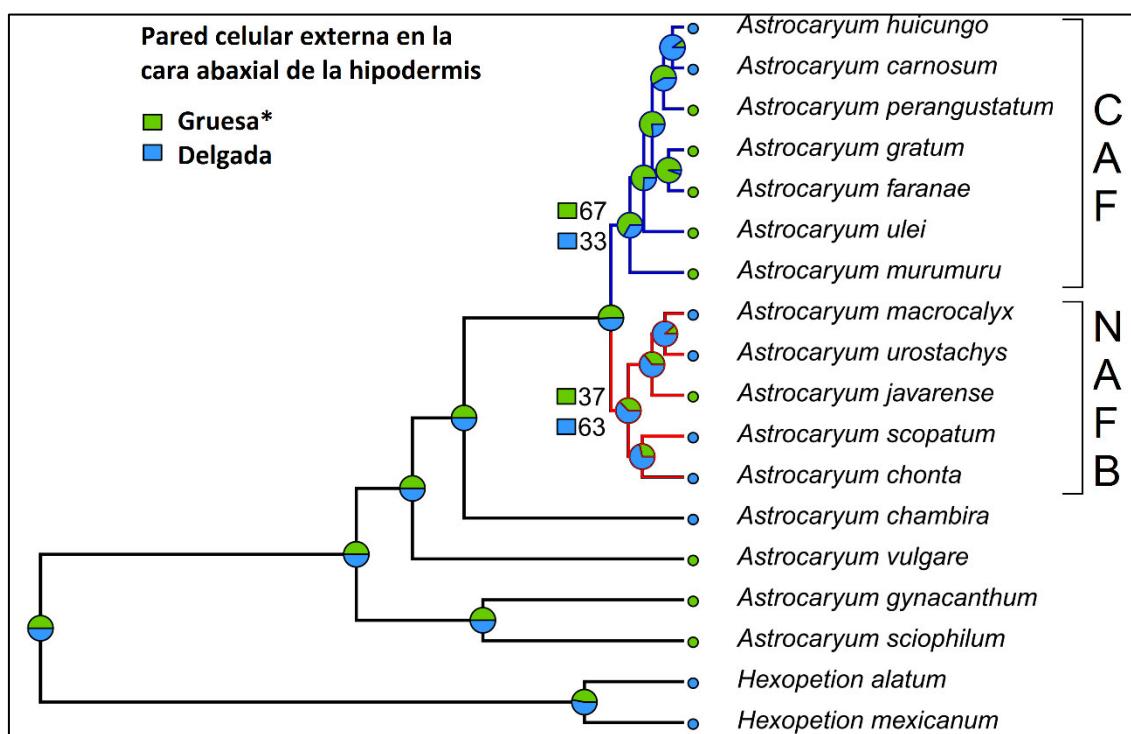
**Tabla 3.** Lista de las 10 variables empleadas en la distribución potencial en MAXENT de los clados NAFB (Northern Amazonian Foreland Basin) y CAF (Central Andean Foothills). Se muestra la contribución relativa de cada variable para cada modelo estimada por Importancia de Permutación y Ganancia *Jackknife* para la muestra *test*.

NAFB			CAF		
Variable	Importancia de permutación	Ganancia <i>Jackknife</i> para la muestra <i>test</i>	Variable	Importancia de permutación	Ganancia <i>Jackknife</i> para la muestra <i>test</i>
<b>Estacionalidad de la precipitación (bio15)</b>	84.3	<b>2.5</b>	<b>Estacionalidad de la precipitación (bio15)</b>	35.2	<b>0.81</b>
<b>Precipitación en el trimestre más cálido (bio18)</b>	1.4	<b>1.6</b>	<b>Precipitación en el trimestre más cálido (bio18)</b>	1.8	<b>0.7</b>
Rango diurno promedio (bio2)	3.1	1.25	Capacidad de intercambio catiónico del suelo	4.5	0.6
Contenido de carbón orgánico en el suelo	0.2	1	Porcentaje de arcilla	4.8	0.41
Elevación	<b>7.3</b>	0.6	Rango diurno promedio (bio2)	16.6	0.35
Densidad del suelo	0.1	0.45	Elevación	<b>13.8</b>	0.3
Capacidad de intercambio catiónico del suelo	0.3	0.45	Densidad del suelo	3.4	0.15
Porcentaje de limo	0.5	0.3	Porcentaje de limo	19.7	0.6
Volumen de fragmentos del suelo	2.7	0.15	Contenido de carbón orgánico en el suelo	0.1	0.1
Porcentaje de arcilla	0.2	0.1	Volumen de fragmentos del suelo	0.2	0.05

#### 6.4. Estimación de caracteres ancestrales anatómicos y morfológicos.

No evidenciamos una asociación entre algún carácter anatómico o morfológico con los clados en estudio, dado que casi todas las reconstrucciones ancestrales presentaron los mismos estados de caracteres para ambos clados. Sin embargo, dos de aquellos caracteres de anatomía foliar, vinculados a condiciones de precipitación baja, mostraron diferentes estados y fueron los siguientes:

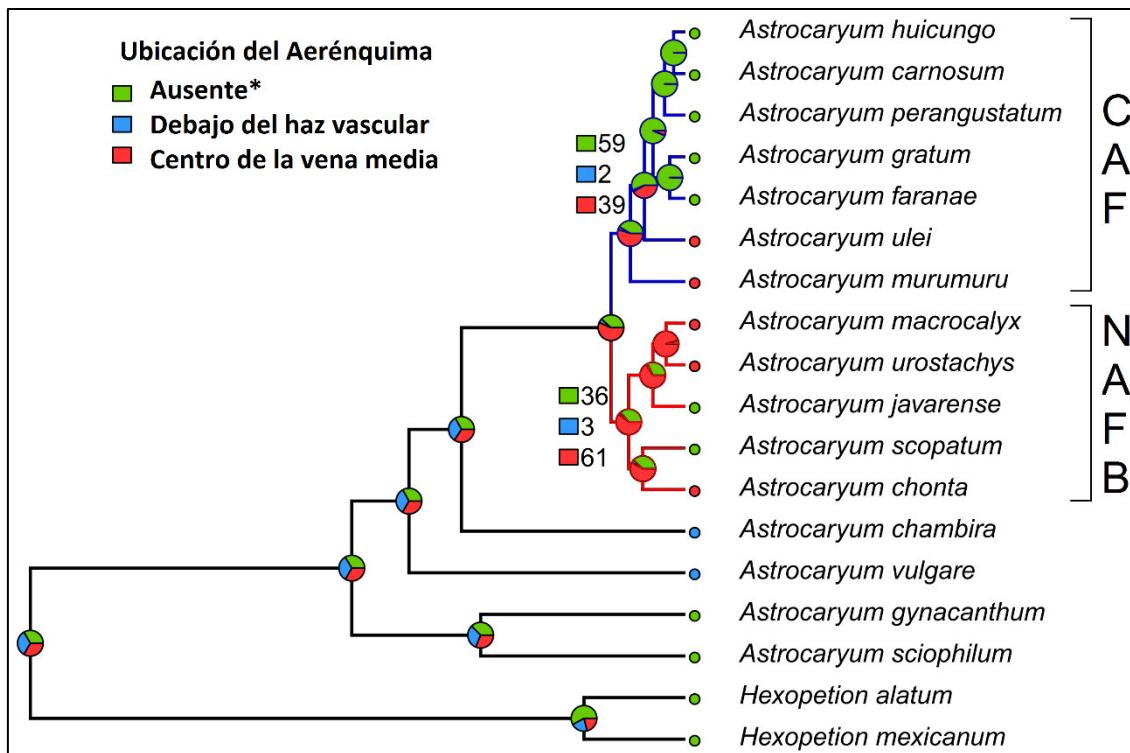
- La condición ancestral para la *pared celular externa en la hipodermis de la cara abaxial*, gruesa en el clado CAF y delgada en el clado NAFB, con probabilidades de 67% y 63%, respectivamente (Figura 13).



**Figura 13.** Reconstrucción de estados ancestrales para la pared celular externa en la hipodermis de la cara abaxial. Se indican sobre cada nodo las probabilidades de ambos estados, y se resalta con números las probabilidades para el ancestro del clado NAFB y CAF. El asterisco indica el estado esperado en condiciones de precipitación baja.

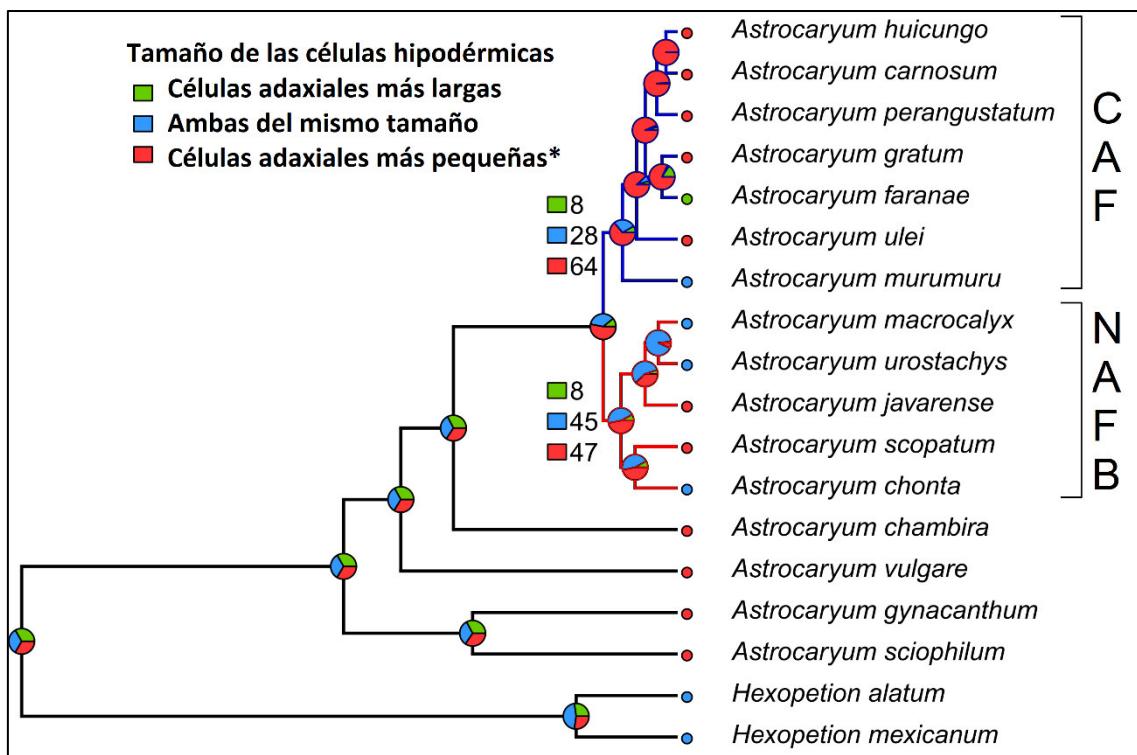
- El *aerénquima*, ausente en el ancestro de las especies distribuidas hacia el flanco oriental de los Andes, es decir en el clado CAF sin

considerar a *A. murumuru* (distribuido hacia el Atlántico), y presente en el centro de la vena media en el ancestro del clado NAFB, con probabilidades resultantes de 59% y 61%, respectivamente (Figura 14).



**Figura 14.** Reconstrucción de estados ancestrales para la ubicación del Aerénquima. Se indican sobre cada nodo las probabilidades del estado ancestral, y se resalta con números las probabilidades para el ancestro del clado NAFB y CAF. Para el clado CAF, se excluye la especie *A. murumuru* y se resalta solo el ancestro del nodo conformado por *A. huicungo*, *A. carnosum*, *A. perangustatum*, *A. gratum*, *A. faranae* y *A. ulei*. El asterisco indica el estado esperado en condiciones de precipitación baja.

Por otro lado, aunque el carácter *tamaño de las células hipodérmicas* no presentó un patrón diferencial evidente entre ambos clados, las células hipodérmicas adaxiales resultaron más pequeñas para el ancestro del clado CAF y con tendencias intermedias entre la equidad y un menor tamaño para el clado NAFB, con probabilidades de 64% y 45%-47%, respectivamente (Figura 15).



**Figura 15.** Reconstrucción de estados ancestrales para el tamaño de las células hipodérmicas. Se indican sobre cada nodo las probabilidades del estado ancestral, y se resalta con números las probabilidades para el ancestro del clado NAFB y CAF. El asterisco indica el estado esperado en condiciones de precipitación baja.

El modelo de evolución de caracteres empleado para estas tres reconstrucciones fue *Equal rates* (ER), dado que las estimaciones con los demás modelos (SYM y ARD) resultaron con valores  $p$  mayores a 0.05, es decir que no hubo diferencias significativas entre los tres modelos de evolución y por lo tanto se empleó el modelo más simple, ER (ver tablas 4 y 5).

**Tabla 4.** Valores de máxima verosimilitud para cada uno de los tres caracteres anatómicos con los tres modelos de evolución de caracteres discretos.

Carácter	Modelo ER	Modelo SYM	Modelo ARD
Tamaño de las células hipodérmicas	-17.28797	-15.66781	-12.69943
Pared celular externa de la hipodermis de la cara abaxial	-11.38527	-11.38527	-11.38378
Aerénquima	-15.92879	-13.6803	-12.61949

ER: Equal rates, SYM: Symmetrical rates, ARD: all rates different.

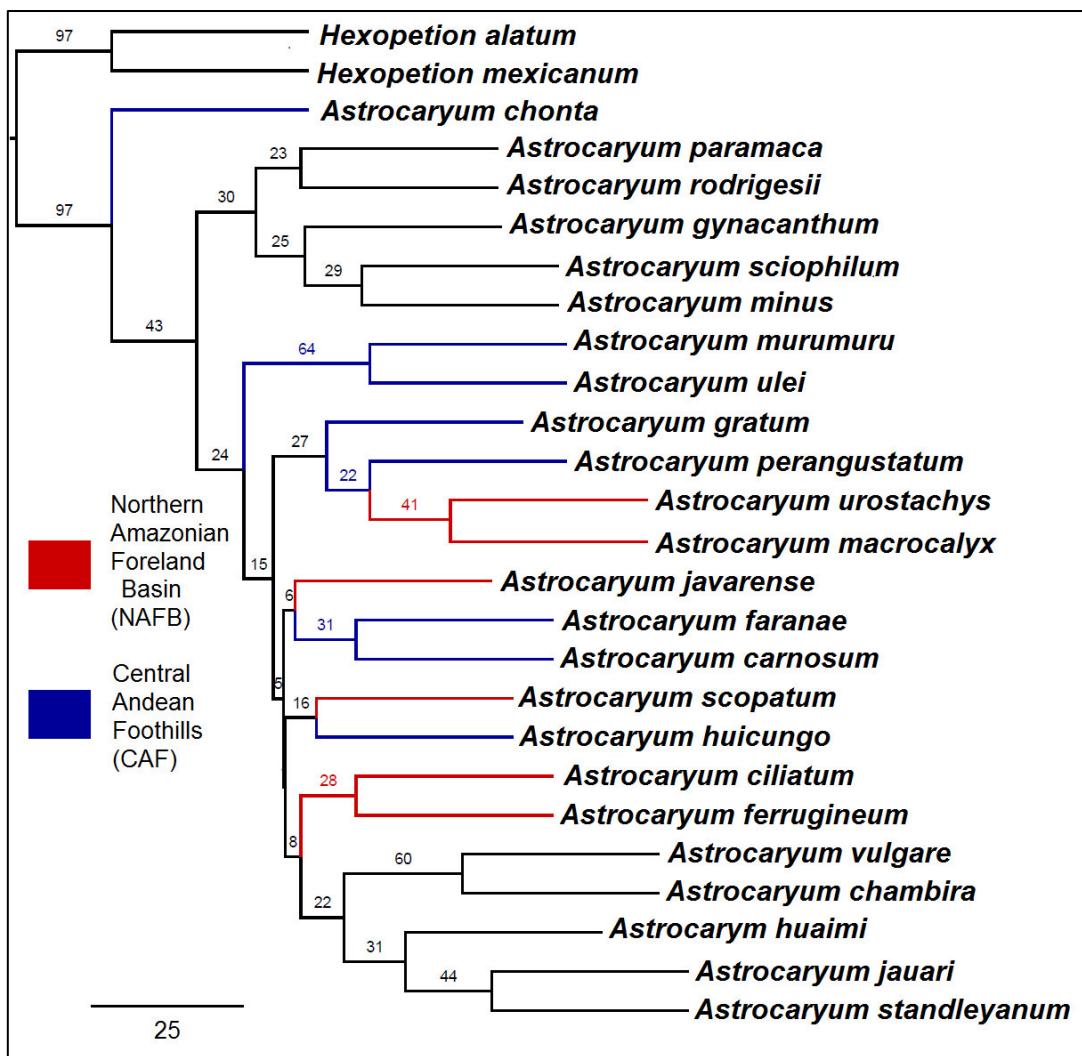
**Tabla 5.** Valores-p o significancias de los estadísticos G para las comparaciones entre los tres modelos de evolución de caracteres discretos. .

	Tamaño de las células hipodérmicas		Pared celular externa de la hipodermis de la célula abaxial	Aerénquima	
	ER	SYM	ER=SYM	ER	SYM
<b>ER</b>	-			-	
<b>SYM</b>	0.197867	-	-	0.105558	-
<b>ARD</b>	0.102206	0.114728	0.956530	0.250584	0.547551

ER: Equal rates, SYM: Symmetrical rates, ARD: all rates different.

## **6.5. Filogenia de máxima parsimonia a partir de caracteres anatómicos y morfológicos**

El análisis filogenético de máxima parsimonia realizado con los caracteres anatómicos y morfológicos resultó en 23 árboles igualmente parsimoniosos con una longitud de 273 pasos, índices de consistencia y retención iguales a 0.41 y 0.51, respectivamente. El árbol consenso resultante al 50% se muestra en la Figura 16. Corresponde a un árbol con una baja resolución y bajos soportes estadísticos internos para la sección *Huicungo* y no distingue entre los dos clados resultantes con el análisis de datos moleculares (clados NAFB y CAF). No obstante recuperó la monofilia de la sección con alto soporte estadístico (*bootstrap* = 98). Los únicos grupos de especies hermanas recuperados fueron *A. macrocalyx* / *A. urostachys* (*bootstrap* = 45%) y *A. murumuru* / *A. ulei* (*bootstrap* = 56%). El análisis también recuperó un grupo conformado por *A. gratum*, *A. macrocalyx*, *A. perangustatum* y *A. urostachys* consistente con la subsección Sachacungo descrita por Kahn (2008), pero con un soporte estadístico bajo (*bootstrap* = 27%).



**Figura 16.** Árbol consenso al 50% de los 23 árboles igualmente más parsimoniosos hallados con la información anatómica y morfológica. La barra inferior representa la escala del número de pasos. Los números sobre cada nodo representan soportes *bootstrap*.

## 7. DISCUSION

### 7.1. Análisis filogenético

Los análisis filogenéticos moleculares realizados en este estudio tuvieron por finalidad esclarecer las relaciones evolutivas en la sección Huicungo del género *Astrocaryum*, tanto a nivel de los dos clados ya identificados previamente como dentro de cada uno. Los análisis filogenéticos moleculares se basan, en su mayoría, en la concatenación de marcadores tras lo cual resulta un “árbol de evidencia total”. Sin embargo, existe la posibilidad de estimar un “árbol de especies” a partir de dicha concatenación y en base a la teoría de coalescencia. En este estudio fueron estimados ambos tipos de árboles, y principalmente el árbol de coalescencia fue obtenido con la finalidad de evaluar la monofilia de las especies de cada clado.

Aunque en nuestros análisis filogenéticos se recuperaron los dos clados NAFB y CAF ya identificados por Roncal *et al.* (2015), con altos soportes estadísticos, ni el árbol filogenético de evidencia total (máxima verosimilitud) estimado con RAxML, ni los árboles de especies basados en el modelo de coalescencia, resolvieron las relaciones evolutivas entre las especies de cada clado. Esto puede atribuirse a las siguientes causas:

- **Baja información filogenética ofrecida por los marcadores empleados como producto del tiempo generacional.** Muchas palmeras presentan tiempos generacionales altos, como ejemplo de ello podemos citar a las especies *Balaka microcarpa* con un promedio de 68 años (Pinero *et al.* 1984) y *Prestoea montana*, con 100 años (Van Valen 1975). Por otro lado, la edad promedio estimada para *Hexopetion mexicanum*, una especie del género hermano de *Astrocaryum*, es de 88 años, mientras que su edad máxima ha sido estimada en 140 años (Pinero *et al.* 1984). Estos elevados tiempos generacionales podrían constituir un factor, en términos ecológicos, de la competencia entre individuos con estadios fenológicos distintos lo cual afectaría indirectamente la maduración de individuos en estadios juveniles al no recibir luz o nutrientes suficientes. dado que con la maduración se desarrollan los órganos reproductores y se da origen a la descendencia,

la transmisión y fijación de las variaciones nucleotídicas, surgidas por el proceso natural de mutación, se vería afectada a lo largo del tiempo en los descendientes de un individuo, ya que se daría en periodos relativamente largos, y esto afectaría en última instancia la tasa de sustitución nucleotídica a nivel molecular (Yue *et al.* 2010).

- **Reciente edad de divergencia en el grupo.** Estimada entre 6 y 8 ma (Roncal *et al.* 2015), podría no ser suficiente aún como para provocar la diferenciación molecular de las especies identificadas por caracteres morfológicos; en consecuencia, las regiones estudiadas presentarían polimorfismos ancestrales, es decir, substituciones comunes entre especies de diferentes linajes. De ser así, nuestros resultados mostrarían una imagen instantánea del proceso evolutivo, en el cual las especies de *Astrocaruym* sección *Huicungo* están diferenciándose a nivel molecular dentro de cada clado.
- **Hibridación y/o flujo genético continuo.** Si existe hibridación dentro de cada uno de los clados de *Astrocaruym* sección *Huicungo*, como se ha reportado en géneros como *Phoenix* (Sudhersan & Al-Shayji, 2011; González-Pérez & Sosa, 2009), se esperaría identificar regiones génicas comunes entre especies distintas. Los haplotipos identificados por Roncal *et al.* (2015) para las regiones cloroplastidiales, y las nucleares PRK y WRKY-7, podrían corresponderse con este hecho. Por otro lado, estudios recientes sobre genética evolutiva evidencian que los eventos de especiación pueden darse aún en presencia de flujo genético (Morales *et al.* 2017)

## 7.2. Diferenciación de nicho

Las poblaciones ancestrales pueden radiar u ocupar diferentes nichos ecológicos, como consecuencia estarán sujetas a una presión de selección divergente, la cual dará lugar a un aislamiento reproductivo y finalmente generar nuevas especies (Nosil 2012). Esta hipótesis de la especiación ecológica es consistente con reconstrucciones filogenéticas que muestran la

divergencia de un grupo en nodos basales (divergencias ancestrales), y éstos se encuentran asociados con ambientes distintos (Losos 2009). Este es el caso de la sección *Huicungo*. Esta segregación de nicho observada en nuestros resultados se corresponde con distintos regímenes de precipitación al norte y sur de los 5° de latitud sur en la Amazonia occidental. Al sur de los 5° S, se registran niveles menores de precipitación anual y una estación seca más prolongada. Aunque en este estudio fueron empleados datos climáticos actuales, y no ancestrales, con la finalidad de comprender los patrones y procesos evolutivos de la sección (estimada entre 6 y 8 ma por Roncal *et al.* 2015), modelamientos climáticos recientes indican que la Amazonía occidental presenta estas mismas características climáticas desde el Neógeno hace 23 ma (Vonhof & Kaandorp 2010). Para aquel tiempo, además los Andes aún no habían alcanzado su altitud actual, y dado que esta cadena montañosa supone una barrera físico-climática y es uno de los factores determinantes de la precipitación en la Amazonia Occidental, se ha sugerido que esta zona habría experimentado aún una mayor variación estacional de la precipitación durante el Neógeno o durante la época de la divergencia de los clados *Huicungo* (Sepulchre *et al.* 2010). La interpretación de que esta gradiente de precipitación haya actuado como agente de selección durante la especiación ecológica de los Huicungos, debe corroborarse con pruebas sobre la presencia y fuerza de selección, así como las características del flujo genético.

Ter Steege *et al.* (2006) encontró gradientes de diversidad de plantas a nivel de género en Sudamérica. Una de estas gradientes está correlacionada con la fertilidad del suelo y la otra relacionada con la duración de la estación seca, la cual aumenta desde Colombia hasta el sudeste Amazónico. Es precisamente esta segunda gradiente la que se corresponde con la distribución de la sección *Huicungo*, a través de dos hallazgos: 1) los individuos del clado CAF crecen en un ambiente cuya variación anual de la precipitación es casi tres veces la del área ocupada por los del clado NAFB; 2) la precipitación del mes más seco es la mitad para los individuos del clado CAF, en comparación con el clado NAFB.

### **7.3. Análisis de máxima parsimonia con caracteres anatómicos y morfológicos y reconstrucción de estados ancestrales**

Nuestros análisis filogenéticos con caracteres morfológicos y anatómicos no se correspondieron con los realizados con la información molecular. Por otro lado, la reconstrucción de caracteres anatómicos ancestrales en el árbol de especies obtenido con \*BEAST, mostró múltiples cambios de estados en todos los caracteres. Horn *et al.* (2009) proponen que los caracteres anatómicos foliares presentan una mayor variabilidad que los morfológicos, sin embargo mencionan también que la evolución de los mismos es homoplásica, pero no aleatoria. Nuestros resultados muestran un alto nivel de homoplasia, como reflejan los índices de consistencia y retención (0.41 y 0.51, respectivamente), y con ello se puede mencionar que éstos no responderían a la evolución del grupo y no contienen información filogenética.

Solo observamos dos caracteres anatómicos, aproximadamente diagnósticos, cuya reconstrucción ancestral fue diferente para ambos clados de Huicungo. El primero fue el *grosor de la pared de las células de la hipodermis en la cara abaxial*. Esta característica tanto en células de la epidermis como hipodermis se asocia con el ajuste osmótico en la planta necesario para su supervivencia ante condiciones de estrés hídrico (Bussotti *et al.* 1998). Como es de esperarse ante condiciones de un período seco pronunciado, y como mostraron nuestros resultados, el ancestro del clado CAF probablemente tuvo una pared más gruesa en esta región anatómica mientras que ésta en el ancestro del clado NAFB fue más delgada. El segundo carácter corresponde al *aerénquima*, el cual fue ausente en el clado CAF y presente en la vena media en el clado NAFB. Con respecto al *aerénquima* se sabe que esta reducción del espacio intercelular limita el movimiento del agua y por lo tanto la transpiración (Bosabalidis & Kofidis 2002). Sería de esperar entonces que especies que habitan en zonas con una estación seca pronunciada presenten la reducción de este tejido o su ausencia, como en el caso del ancestro del clado CAF, sin considerar a *A. murumuru*. El tercer carácter, *tamaño de las células de la hipodermis*, no pudo ser reconstruido para algún estado en particular con mayor probabilidad para el ancestro del clado NAFB; pero sí para el ancestro del clado CAF, el cual presentó células más pequeñas en la hipodermis de la

cara adaxial. Esta característica ha sido también asociada con una mayor tolerancia al estrés hídrico (Oertli *et al.* 1990).

## **8. Conclusiones**

- Las diferencias entre los dos linajes de la sección *Huicungo* de género *Astrocaryum* (NAFB y CAF) con respecto a sus distribuciones potenciales y anatomía foliar, se corresponden con la hipótesis de especiación por especialización de nicho. Dicho evento habría sido propiciado por una divergencia ancestral y la ocupación de ambientes con características climáticas contrastantes, principalmente, con respecto a la precipitación.

## **9. Recomendaciones**

- El esclarecimiento de las relaciones evolutivas en la sección *Huicungo* del género *Astrocaryum* podría mejorar con el empleo de información molecular derivada del secuenciamiento de siguiente generación (NGS, *Next Generation Sequencing*).
- El esclarecimiento de las relaciones evolutivas en la sección *Huicungo* del género *Astrocaryum* podría mejorar además con el estudio y caracterización de la hibridación entre sus especies.

## 10. Referencias Bibliográficas

- Aleixo, A., & Rossetti, D. de F. (2007). Avian gene trees, landscape evolution, and geology: towards a modern synthesis of Amazonian historical biogeography? *Journal of Ornithology*, 148(2), 443-453. <https://doi.org/10.1007/s10336-007-0168-7>
- Álvarez, I., & J.F. Wendel. (2003). «Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference». *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29 (3): 417-34. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00208-2](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00208-2).
- Anderson, A. (1978). The names and uses of palms among a tribe of Yanomama Indians. *Principes*, 22, 30-41.
- Antonelli, A., & Sanmartín, I. (2011). Why are there so many plant species in the Neotropics? *TAXON*, 60(2), 403–414.
- Avise, John. (2004). Molecular Markers, Natural History and Evolution. 2.a ed. Sinauer Associates Inc.
- Baker, W. J., Savolainen, V., Asmussen-Lange, C. B., Chase, M. W., Dransfield, J., Forest, F., ... Wilkinson, M. (2009). Complete Generic-Level Phylogenetic Analyses of Palms (Arecaceae) with Comparisons of Supertree and Supermatrix Approaches. *Systematic Biology*, 58(2), 240-256. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syp021>
- Balick, M. J. (1988). The use of palms by the Apinayé and Guajajara Indians of northeastern Brazil. *Advances in Economic Botany*, 6, 65-90.
- Balslev, H., Grandez, C., Paniagua Zambrana, N. Y., Møller, A. L., & Hansen, S. L. (2008). Palmas (Arecaceae) útiles en los alrededores de Iquitos, Amazonía Peruana. *Revista Peruana de Biología*, 15(3), 121-132. <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v15i3.3343>.
- Balslev, H., Kahn, F., Millan, B., Svenning, J.-C., Kristiansen, T., Borchsenius, F., Eiserhardt, W. L. (2011). Species Diversity and Growth Forms in Tropical American Palm Communities. *Botanical Review*, 77(4), 381-425. <https://doi.org/10.1007/s12229-011-9084-x>.
- Balslev, H., & Moraes R, M. (1989). Sinopsis de las palmeras de Bolivia. AAU Reports 20.
- Barbosa Rodrigues, J. (1903). *Sertum Palmarum Brasiliensium, ou relation des palmiers nouveaux du Brésil, découverts, décrits et dessinés*

d'après nature (1.a-140.a, 91 pl; 2: 1-114.a, 83pl ed., Vols. 1-2). Bruxelles: Imprimerie Monnom.

- Barve, N., Vijay B., A, Jiménez-Valverde, A., Lira-Noriega, S. P. Maher, A. Townsend Peterson, J. Soberón, & F. Villalobos. (2011). The crucial role of the accessible area in ecological niche modeling and species distribution modeling. Ecological Modelling 222 (11): 1810-19.
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2013). GenBank. Nucleic Acids Research, 41(D1), D36-D42. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1195>.
- Bosabalidis, A. M., & Kofidis, G. (2002). Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive cultivars. Plant Science, 163(2), 375-379. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00135-8](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00135-8).
- Bussotti, F., Gravano, E., Grossoni, P., & Tani, C. (1998). Occurrence of Tannins in Leaves of Beech Trees (*Fagus sylvatica*) along an Ecological Gradient, Detected by Histochemical and Ultrastructural Analyses. The New Phytologist, 138(3), 469-479.
- Campbell Jr., K. E. (2004). The Paleogene Mammalian Fauna of Santa Rosa, Amazonian Peru (Natural History Museum of Los Angeles County). Los Angeles, California.
- Cavalcante, P. B. (1974). Frutas comestíveis da Amazônia. Brazil: INPA.
- Cintra, R., & Horna, V. (1997). Seed and seedling survival of the palm *Astrocaryum murumuru* and the legume tree *Dipteryx micrantha* in gaps in Amazonian forest. Journal of Tropical Ecology, 13(2), 257-277.
- Coleman, A. W., & Vacquier, V. D. (2002). Exploring the Phylogenetic Utility of ITS Sequences for Animals: A Test Case for Abalone (*Haliotis*). Journal of Molecular Evolution 54 (2): 246-57. <https://doi.org/10.1007/s00239-001-0006-0>.
- Consiglio, T., & Bourne, G. (2001). Pollination and breeding system of a neotropical palm *Astrocaryum vulgare* in Guyana: a test of the predictability of syndromes. Journal of Tropical Ecology, 17(4), 577-592.
- Coomes, O. T. (2004). Rain forest 'conservation-through-use'? Chambira palm fibre extraction and handicraft production in a land-constrained community, Peruvian Amazon. Biodiversity & Conservation, 13(2), 351-360. <https://doi.org/10.1023/B:BIOC.0000006503.90980.e8>.

- Coradin, L., & Lleras, E. (1983). Situación actual de la investigación y desarrollo en palmeras poco conocidas. En Palmeras poco utilizadas de América tropical (pp. 28-33). Brasil: FAO-CATIE, Turrialba.
- Cruz, P. E., Marquez, E., Amaya, D., & Farfán, J. (1984). Macaúba, bacuri, inajá e tucumá - caracterização química e nutricional destes frutos do estado do Maranhão e os oleos respectivos. Rev. quím. Ind, Outubro, 278-281.
- DeSalle, R., Giribet, G., & Wheeler, W. (2002). Techniques in Molecular Systematics and Evolution. 1.a ed. Springer.
- de Fátima Rossetti, D., Mann de Toledo, P., & Góes, A. M. (2005). New geological framework for Western Amazonia (Brazil) and implications for biogeography and evolution. Quaternary Research, 63(1), 78-89. <https://doi.org/10.1016/j.yqres.2004.10.001>.
- Dransfield, J., Uhl, N., Asmussen, C. B., Baker, W. J., Harley, M. M., & Lewis, C. E. (2008). Genera Palmarum: the evolution and classification of palms. Kew Publishing.
- Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. BMC Evol Biol, 7, 214.
- Edgar, R. (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. BMC Bioinformatics, 5, 113.
- Edwards, S. V. (2009). Is a new and general theory of molecular systematics emerging? Evolution 63 (1): 1-19. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00549.x>.
- Espurt, N., Baby, P., Brusset, S., Roddaz, M., Hermoza, W., & Barbarand, J. (2009). The Nazca Ridge and Uplift of the Fitzcarrald Arch: Implications for Regional Geology in Northern South America. En Amazonia: Landscape and Species Evolution (pp. 89-100). Wiley-Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781444306408.ch6>.
- Felsenstein, J. (1984). Distance methods for inferring phylogenies: A justification. Evolution 38 (1): 16-24. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1984.tb00255.x>.
- Felsenstein, J. (1988). Phylogenies from Molecular Sequences: Inference and Reliability. Annual Review of Genetics 22 (1): 521-65. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.22.120188.002513>.

- Felsenstein, J. (2004). Inferring Phylogenies. 1.a ed. Palgrave Macmillan.
- Fine P. V., Daly D. C., Villa Muñoz G., Mesones I., & Cameron K. M. (2005). The contribution of edaphic heterogeneity to the evolution and diversity of Burseraceae trees in the western Amazon. *Evolution*, 59: 1464-1478.
- Fouqué, A. (1975). Espèces fruitières d'Amérique tropicale. Paris: IFAC.
- Galeano-Garcés, G., Bernal, R., & Kahn, F. (1988). Una nueva especie de *Astrocaryum* (Palmae) de Colombia. *Candollea*, 43(1), 279-283.
- Galetti, M., Donatti, C., Pires, A., Guimaraes, P., & Jordano, P. (2006). Seed survival and dispersal of an endemic Atlantic forest palm: the combined effects of defaunation and forest fragmentation. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 151(1), 141-149. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2006.00529.x>
- Gautheron Cécile, Espurt Nicolas, Barbarand Jocelyn, Roddaz Martin, Baby Patrice, Brusset Stéphane, ... Douville Eric. (2012). Direct dating of thick- and thin-skin thrusts in the Peruvian Subandean zone through apatite (U-Th)/He and fission track thermochronometry. *Basin Research*, 25(4), 419-435. <https://doi.org/10.1111/bre.12012>.
- Gómez, D., Lebru, L., Paymal, N., & Soldi, A. (1996). Palmas útiles en la provincia de Pastaza, Amazonia ecuatoriana: manual práctico. Quito, Ecuador: Fundación Omaere.
- Goodman, M., Moore, G. W., Barnabas, J., & Matsuda, G. 1974. The phylogeny of human globin genes investigated by the maximum parsimony method. *Journal of Molecular Evolution* 3 (1): 1-48. <https://doi.org/10.1007/BF01795974>.
- Grenand, P., Moretti, C., Jacquemin, H., & Prévost, M.-F. (2004). Pharmacopées traditionnelles en Guyane. France: IRD (Institut de recherche pour le développement).
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., & Gascuel, O. (2010). New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*, 59(3), 307-321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>.
- Guisan, A., Edwards, T. C., & Hastie, T. 2002. Generalized linear and generalized additive models in studies of species distributions: setting

the scene. Ecological Modelling 157 (2): 89-100.  
[https://doi.org/10.1016/S0304-3800\(02\)00204-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3800(02)00204-1).

- Heled, J., & Drummond, A. J. (2010). Bayesian Inference of Species Trees from Multilocus Data. Molecular Biology and Evolution, 27(3), 570-580. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp274>.
- Hillis, D., Moritz, C., & Mable, B. (1996). Molecular Systematics. The University of California: Sinauer Associates.
- Hirzel, A. H., Hausser, J., Chessel, D., & Perrin, N. (2002). Ecological-niche factor analysis: how to compute habitat-suitability maps without absence data? Ecology 83 (7): 2027-36. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2002\)083\[2027:ENFAHT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2002)083[2027:ENFAHT]2.0.CO;2).
- Holder, M., & Lewis, O. (2003). Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches. Nat Rev Genet 4 (4): 275-84. <https://doi.org/10.1038/nrg1044>.
- Honorio Coronado E. N., Dexter K. G., Poelchau M. F., Hollingsworth P.M., Phillips O. L., Pennington R.T., & Carine M. (2014). *Ficus insipida* subsp. *Insipida* (Moraceae) reveals the role of ecology in the phylogeography of widespread Neotropical rain forest tree species. Journal of Biogeography, 41: 1697-1709.
- Hoorn, C. (1993). Marine incursions and the influence of Andean tectonics on the Miocene depositional history of northwestern Amazonia: results of a palynostratigraphic study. Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology, 105(3), 267-309. [https://doi.org/10.1016/0031-0182\(93\)90087-Y](https://doi.org/10.1016/0031-0182(93)90087-Y).
- Hoorn, C., Guerrero, J., Sarmiento, G., & Lorente, M. (1995). Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene northern South America. Geology, 23, 237–240.
- Hoorn, C., & Wesselingh, F. (2010). Amazonia, Landscape and Species Evolution: A Look into the Past (Wiley-Blackwell). Oxford.
- Horn, J. W., Fisher, J. B., Tomlinson, P. B., Lewis, C. E., & Laubengayer, K. (2009). Evolution of lamina anatomy in the palm family (Arecaceae). American Journal of Botany, 96(8), 1462-1486. <https://doi.org/10.3732/ajb.0800396>.
- Jackson, D. A. (1993). Stopping Rules in Principal Components Analysis: A Comparison of Heuristical and Statistical Approaches. Ecology 74 (8): 2204-14. <https://doi.org/10.2307/1939574>.

- Jenner, R. (2002). Boolean logic and character state identity: pitfalls of character coding in metazoan cladistics. Contributions to Zoology, (71), 67-91.
- Kahn, F. (1997). The palms of El Dorado. Orstom. Recuperado a partir de <https://books.google.com.pe/books?id=LPIsAQAAQAAJ>.
- Kahn, F. (2008). *The genus Astrocaryum* (Arecaceae). Revista Peruana de Biología, 15(sup 1), 31-48.
- Kahn, F., & de Granville, J.-J. (1992). Palms in forest ecosystems of Amazonia. Springer-Verlag.
- Kahn, F., & Millán, B. (1992). *Astrocaryum* (Palmae) in Amazonia—A preliminary treatment. Bulletin de l'Institut français d'études Andins, 21.
- Kahn, F., & Millán, B. (2013). Las Palmeras Huicungo - The Huicungo Palms. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos - Institut de Recherché pour le Développement.
- Kahn, F., Millán, B., & Pintaud, J.-C. (2011). Detailed assessment of the distribution of *Astrocaryum sect. Huicungo* (Arecaceae) in Peru. Revista Peruana de Biología, 18(3), 279-282.
- Kahn, F., & Moussa, F. (1999). Economic importance of *Astrocaryum aculeatum* (Palmae) in central Brazilian Amazonia. Acta Botánica Venezolana, 22(1), 237-245.
- La Rotta, C., Miraña, M., & Miraña, P. (1998). Estudio etnobotánico sobre las especies utilizadas por la comunidad indígena Miraña. Amazonas, Colombia. Bogotá, Colombia: FEN-WWF.
- Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S. Y. W., & Guindon, S. (2012). PartitionFinder: Combined Selection of Partitioning Schemes and Substitution Models for Phylogenetic Analyses. Molecular Biology and Evolution, 29(6), 1695-1701. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss020>.
- Larson, A. (1998). The comparison of morphological and molecular data in phylogenetic systematics. En Molecular Approaches to Ecology and Evolution, editado por Rob DeSalle y Bernd Schierwater, 275-96. Basel: Birkhäuser Basel. [https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8948-3\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-0348-8948-3_15).
- Lemey, P., Salemi, M., & Vandamme, A.-M. (2009). The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to Phylogenetic Analysis and Hypothesis Testing. 2.a ed. Cambridge University Press.

- Lima, R. R., & da Costa, J. P. (1991). Registro de introduções de plantas de cultura pre-colombiana coletadas na Amazônia. Belém: CPATU/EMBRAPA.
- Lima, R. R., Trassato, L. C., & Coelho, V. (1986). O tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.) principais características e potencialidade agroindustrial (Vol. 75). Brasil: Belém, PA: EMBRAPA-CPATU.
- Lleras, E., & Coradin, L. (1988). Native neotropical oil palms: State of the art and perspectives for Latin America. Advances in Economic Botany, 6, 201-213.
- Losos, J. B. (1990). The Evolution of Form and Function: Morphology and Locomotor Performance in West Indian *Anolis* Lizards. Evolution, 44(5), 1189-1203. <https://doi.org/10.2307/2409282>.
- Mayer, M. S., & Soltis, P. S. (1999). Intraspecific Phylogeny Analysis Using ITS Sequences: Insights from Studies of the *Streptanthus glandulosus* Complex (Cruciferae). Systematic Botany 24 (1): 47-61. <https://doi.org/10.2307/2419385>.
- Mejía, C. K. (1988). Utilization of palms in eleven Mestizo villages of the Peruvian Amazon (Ucayali River, Department of Loreto). Advances in Economic Botany, 6, 130-136.
- Millán, B. (1998). Estudio etnobotánico y taxonómico de especies amazónicas del género *Astrocaryum* (Arecaceae) (Tesis Magister en Botánica Tropical). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Millán, B. (2006). Arecaceae endémicas del Perú. En El Libro Rojo de las Plantas Endémicas del Perú Revista Peruana de Biología, Número especial 13 (2), 706-707.
- Millán B. (2009). Anatomía foliar de los géneros *Astrocaryum* y *Hexopetion* (Arecaceae) y su implicancia en la sistemática. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas. Unidad de Posgrado. Tesis doctoral. Lima-Perú.
- Millán, B., & Khan, F. (2010). Caracterización de la anatomía foliar de especies de *Astrocaryum* y *Hexopetion* (Arecaceae). Revista Peruana de Biología, 17 (1), 81-94.
- Montufar, R., & Pintaud, J.-C. (2006). Variation in species composition, abundance and microhabitat preferences among western Amazonian

terra firme palm communities. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 151(1), 127-140. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2006.00528.x>.

- Morales, A. E., Jackson, N. D., Dewey, T. A., O'Meara, B. C., & Carstens, B. C. (2017). Speciation with Gene Flow in North American Myotis Bats. *Systematic Biology*, 66(3), 440–452.
- Nelson, B. W., Ferreira, C. A. C., Da Silva, M. F., & Kawasaki, M. L. (1990). Endemism centres, refugia and botanical collection density in Brazilian Amazonia. *Nature*, 345, 714–716.
- Novembre, J., & Stephens, M. (2008). Interpreting principal component analyses of spatial population genetic variation. *Nature Genetics* 40: 646.
- Nosil, P. (2012). *Ecological Speciation*. Oxford: Oxford University Press.
- Oboh, F. O. J., & Oderinde, R. A. (1988). Analysis of the pulp and pulp oil of the tucum (*Astrocaryum vulgare* Mart) fruit. *Food Chemistry*, 30(4), 277-287. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(88\)90114-8](https://doi.org/10.1016/0308-8146(88)90114-8).
- Oertli, J. J., Lips, S. H., & Agami, M. (1990). The strength of sclerophyllous cells to resist collapse due to negative turgor pressure. *Acta Oecologica*, 11(2), 281-289.
- Paradis, E., Claude, J., & Strimmer, K. (2004). APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics*, 20(2), 289-290. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg412>.
- Peres-Neto, P. R., Jackson, D. A., & Somers, K. M. (2003). Giving meaningful interpretation to ordination axes: assessing loading significance in principal component analysis. *Ecology* 84 (9): 2347-63. <https://doi.org/10.1890/00-0634>.
- Pesce, C. (1985). *Oil Palms and Other Oilseeds of the Amazon (Studies in Economic Botany)*. Algonac, Michigan: Reference Publications.
- Phillips, S. J., Anderson, R. P., & Schapire, R. E. (2006). Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*, 190, 231-259.
- Pinero D., M. Martinez-Ramos & J. Sarukhan. (1984). A Population Model of *Astrocaryum mexicanum* and a Sensitivity Analysis of its Finite Rateof Increase. *Journal of Ecology*, 72(3). 977-991.
- Pinheiro, C. U. B., & Balick, M. J. (1987). Brazilian palms: notes on their uses and vernacular names compiled and translated from Pio Corrêa's «Diccionário das plantas úteis do Brazil e das exóticas cultivadas» with

updated nomenclature and added illustrations. New York, USA: New York Botanical Garden.

- Prates I., Rivera D., Rodrigues M.T., & Carnaval A.C. (2016). A mid-Pleistocene rainforest corridor enabled synchronous invasions of the Atlantic Forest by Amazonian anole lizards. *Molecular Ecology*, 25: 5174-5186.
- Pyron, R. A., Burbrink, F. T., Colli, G. R., de Oca, A. N. M., Vitt, L. J., Kuczynski, C. A., & Wiens, J. J. (2011). The phylogeny of advanced snakes (Colubroidea), with discovery of a new subfamily and comparison of support methods for likelihood trees. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 58. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.11.006>.
- Pyron, R. Alexander, Burbrink, F. T., & Wiens, J. J. (2013). A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC Evolutionary Biology*, 13(1), 1-54. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-93>.
- Roncal, J., Couderc, M., Baby, P., Kahn, F., Millán, B., Meerow, A. W., & Pintaud, J. C. (2015). Palm diversification in two geologically contrasting regions of western Amazonia. *Journal of Biogeography*, 42(8), 1365-2699.
- Roncal, J., Kahn, F., Millan, B., Couvreur, T., & Pintaud, J.-C. (2013). Cenozoic colonization and diversification patterns of tropical American palms: evidence from *Astrocaryum* (Arecaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, 171, 120-139.
- San Martín, I., & Ronquist, F. (2004). Southern hemisphere biogeography inferred by event-based models: plant versus animal patterns. *Systematic Biology*, 53(2), 1-28.
- Sang, T. (2002). Utility of Low-Copy Nuclear Gene Sequences in Plant Phylogenetics. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 37 (3): 121-47. <https://doi.org/10.1080/10409230290771474>.
- Schlüter U., Furch B., & Joly C. (1993). Physiological and anatomical adaptations by young *Astrocaryum jauari* Mart. (Arecaceae) in periodically inundated biotopes of central Amazonia. *Biotropica*, 25: 384-396.
- Schroth, G., da Mota, M. S. S., Lopes, R., & de Freitas, A. F. (2004). Extractive use, management and in situ domestication of a weedy palm, *Astrocaryum tucuma*, in the central Amazon. *Forest Ecology and*

Management, 202(1), 161-179.  
<https://doi.org/10.1016/j.foreco.2004.07.026>.

- Soberón, J., & Nakamura, M. (2009). Niches and distributional areas: Concepts, methods, and assumptions. Proceedings of the National Academy of Sciences 106 (Supplement 2): 19644. <https://doi.org/10.1073/pnas.0901637106>.
- Sosnowska, J., & Balslev, H. (2009). American palm ethnomedicine: A meta-analysis. Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine, 5(1), 43.
- Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. Bioinformatics, 22. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl446>.
- Stucky, B. J. (2012). SeqTrace: A Graphical Tool for Rapidly Processing DNA Sequencing Chromatograms. Journal of Biomolecular Techniques : JBT, 23(3), 90-93. <https://doi.org/10.7171/jbt.12-2303-004>.
- Sudhersan, C., & Al-Shayji, Y. (2011). Interspecific Hybridization and Embryo Rescue in Date Palm. En S. M. Jain, J. M. Al-Khayri, & D. V. Johnson (Eds.), Date Palm Biotechnology (pp. 567-584). Dordrecht: Springer Netherlands. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-1318-5\\_27](https://doi.org/10.1007/978-94-007-1318-5_27).
- Swofford, D. L. (2002). PAUP\*4.0. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods) (Versión 4). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
- ter Steege, H., Pitman, N. C. A., Phillips, O. L., Chave, J., Sabatier, D., Duque, A., Vásquez, R. (2006). Continental-scale patterns of canopy tree composition and function across Amazonia. Nature, 443, 444.
- Ursula B. Schlüter, Furch, B., & Joly, C. A. (1993). Physiological and Anatomical Adaptations by Young *Astrocaryum jauari* Mart. (Arecaceae) in Periodically Inundated Biotopes of Central Amazonia. Biotropica, 25(4), 384-396. <https://doi.org/10.2307/2388862>.
- Vaidya, G., Lohman, D. J., & Meier, R. (2011). SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. Cladistics, 27(2), 171-180. <https://doi.org/10.1111/j.1096-0031.2010.00329.x>.

- Van Valen, L. (1975). Life, death and energy of a tree. *Biotropica* 7, 259-269.
- Vargas, V., & Pintaud, J.-C. (2008). Caracterización de un contacto parapatrónico entre *Astrocaryum macrocalyx* y *Astrocaryum urostachys* en el límite de la planicie de Marañón-Pastaza con el Arco de Iquitos. *Revista Peruana de Biología*, 15(1), 79-83.
- Vonhof, H.B, Wesselingh, F., & Ganssen, G. (1998). Reconstruction of the Miocene western Amazonian aquatic system using molluscan isotopic signatures. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 141(1), 85-93. [https://doi.org/10.1016/S0031-0182\(98\)00010-8](https://doi.org/10.1016/S0031-0182(98)00010-8).
- Vonhof, Hubert B, & Kaandorp, R. J. G. (2011). Climate Variation in Amazonia during the Neogene and the Quaternary. En C Hoorn & F. P. Wesseling (Eds.), *Amazonia: Landscape and Species Evolution* (p. 464). Wiley-Blackwell. Recuperado a partir de <https://doi.org/10.1002/9781444306408.ch12>.
- Warren, D. L., Glor, R. E., & Turelli, M. (2008). Environmental niche equivalency versus conservatism: Quantitative approaches to niche evolution. *Evolution*, 62(11), 2868-2883. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00482.x>.
- Wesselingh, F. P., & Salo, J. A. (2006). A Miocene perspective on the evolution of the Amazonian biota. *Scripta Geologica*, 133, 439-458.
- Wolfe, K. H., Li, W. H., & Sharp, P. M. (1987). Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84 (24): 9054-58.
- Yue, J.-X., Li, J., Wang, D., Araki, H., Tian, D., & Yang, S. (2010). Genome-wide investigation reveals high evolutionary rates in annual model plants. *BMC Plant Biology*, 10(1), 242.

## **ANEXO**

**Anexo 1.** Números de accesión GenBank de las secuencias empleadas y/o generadas (resaltadas en negrita) en este estudio. Las regiones cloroplastidiales multiples por casilla corresponden al orden siguiente: psbM-trnD, rps16 intron, rps16-trnQ, trnT-trnD, trnG intron, y se corresponden con los haplotipos de Roncal *et al.* 2015.

Especie	Código de Laboratorio	Voucher	Cloroplasto	WRKY7	PRK	RPB2	CISP4	PHYB	AG1
<i>Astrocaryum carnosum</i> F.Kahn & B.Millán	JCP1855	Peru: B Millán & Kahn 1679 (USM)	KP218873	KP218811	KP218843				
<i>Astrocaryum carnosum</i>	JCP1925	Peru	KP218873	KP218811	KP218844				<b>MF686891</b>
<i>Astrocaryum carnosum</i>	JCP1982	Peru: F Kahn 4476 (USM)	KP218874	KP218811	KP218843	JQ821979	JQ822004	JQ822052	<b>MF686890</b>
<i>Astrocaryum carnosum</i>	JCP2000	Peru	KP218875	KP218811	KP218845				
<i>Astrocaryum carnosum</i>	JCP2169	Peru: F Kahn 1839 (P)	KP218876	KP218811	KP218846				
<i>Astrocaryum chambira</i> Burret	JCP0721	Ecuador	<b>MF593187</b> <b>MF593194</b> <b>MF593201</b> <b>MF593215</b> <b>MF593208</b>	<b>MF593230</b>	<b>MF593226</b>				
<i>Astrocaryum chambira</i>	JCP0808	Ecuador	<b>MF593188</b> <b>MF593195</b> <b>MF593202</b> <b>MF593216</b> <b>MF593209</b>	<b>MF593233</b>	HQ265584				<b>MF686889</b>
<i>Astrocaryum chambira</i>	JCP2302	Peru: H Balslev 7790 (AAU)	KP218877	<b>MF593235</b>	KP218847				
<i>Astrocaryum chambira</i>	JCP2303	Peru: H Balslev 7621 (AAU)	KP218877	KP218812	KP218848	JQ821980	JQ822005	JF812601	<b>MF686888</b>
<i>Astrocaryum chambira</i>	JCP366	Peru: F Kahn 2447 (USM)	KP218877	KP218812	KP218847				<b>JF414932</b>

Especie	Código de Laboratorio	Voucher	Cloroplasto	WRKY7	PRK	RPB2	CISP4	PHYB	AG1
<i>Astrocaryum chonta</i> Mart.	JCP0973	Peru: B Millán 711 (USM)	KP218878	KP218813	KP218845	JQ821981 (B. Millán 708 (USM)	JQ822006 (B. Millán 708 (USM)	JQ822053 (B. Millán 708 (USM)	
<i>Astrocaryum chonta</i>	JCP0974	Peru	KP218878	KP218813	<b>MF593225</b>				<b>MF686887</b>
<i>Astrocaryum chonta</i>	JCP2162	Peru	KP218878	KP218814	KP218845				<b>MF686917</b>
<i>Astrocaryum chonta</i>	JCP2177	Peru	KP218878	<b>MF593238</b>	KP218849				
<i>Astrocaryum chonta</i>	JCP306	Peru	KP218878	KP218811	KP218850				
<i>Astrocaryum chonta</i>	JCP307	Peru	KP218878	KP218813	KP218851				
<i>Astrocaryum faranae</i> F.Kahn & E.Ferreira	JCP1719	Peru	KP218880	KP218811	KP218845				
<i>Astrocaryum faranae</i>	JCP1720	Peru	KP218880	KP218811	KP218845				
<i>Astrocaryum faranae</i>	JCP1820	Peru: F Kahn 4444 (USM)	KP218880	KP218811	KP218845	JQ821982	JQ822007	JQ822054	
<i>Astrocaryum faranae</i>	JCP1856	Peru: B Millán & Kahn 1694 (USM)	KP218881	KP218811	KP218843				<b>MF686916</b>
<i>Astrocaryum faranae</i>	JCP1977	Peru: F Kahn 4475 (USM)	KP218882	KP218811	KP218843				
<i>Astrocaryum faranae</i>	JCP2408	Peru	KP218879	KP218811	KP218853				<b>MF686915</b>
<i>Astrocaryum ferrugineum</i> F.Kahn & B.Millán	JCP2175	Brazil: F Kahn & F Moussa 3227 (P)	KP218883	KP218816	KP218843				<b>MF686914</b>
<i>Astrocaryum ferrugineum</i>	JCP2178	Brazil: F Kahn & Moussa 3586 (CEN)	KP218881	KP218817	KP218845	JQ821984	JQ822009	JQ822056	

Especie	Código de Laboratorio	Voucher	Cloroplasto	WRKY7	PRK	RPB2	CISP4	PHYB	AG1
<i>Astrocaryum ferrugineum</i>	JCP2431	Colombia: G Galeano 8555 (COL)	KP218884	KP218818	KP218843				<b>MF686886</b>
<i>Astrocaryum gratum</i> F.Kahn & B.Millán	JCP1930	Peru: F Kahn 4458 (USM)	KP218879	KP218811	KP218843				
<i>Astrocaryum gratum</i>	JCP1965	Peru: F Kahn 4467 (USM)	KP218885	KP218820	KP218845				
<i>Astrocaryum gratum</i>	JCP0528	Peru: B. Millán 558 (USM)	KP218886 (JCP2424)	KP218811 (JCP2424)	KP218845 (JCP2424)	JQ821985	JQ822010	JQ822057	
<i>Astrocaryum gynacanthum</i> Mart.	JCP2142	Brazil	KP218887	KP218821	KP218855				
<i>Astrocaryum gynacanthum</i>	JCP2181		KP218887	KP218822	KP218856				<b>MF686913</b>
<i>Astrocaryum gynacanthum</i>	JCP2192	French Guiana: JJ de Granville 1879 (CAY)	KP218887	KP218823	KP218857	HQ265632 (A. Perez 934 (CAY))	JQ822011(A. Perez 934 (CAY))	JF422057 (A. Perez 934 (CAY))	<b>MF686881</b>
<i>Astrocaryum gynacanthum</i>	JCP2433	Colombia: G Galeano 8562 (COL)	KP218888	KP218821	KP218856				
<i>Astrocaryum gynacanthum</i>	JCP340	French Guiana	KP218887	KP218823	KP218857				<b>MF686912</b>
<i>Astrocaryum huicungo</i> Dammer ex Burret	JCP0867	Peru: F Kahn 4415A (USM)	KP218890	KP218811	KP218858				<b>MF686885</b>
<i>Astrocaryum huicungo</i>	JCP0873	Peru: F Kahn 4430 (USM)	KP218891	KP218825	KP218845				<b>MF686911</b>
<i>Astrocaryum huicungo</i>	JCP2151	Peru: F Kahn & F Moussa 3208 (P)	KP218876	KP218811	KP218843				
<i>Astrocaryum huicungo</i>	JCP2413	Peru	KP218879	KP218811	KP218859				<b>MF686910</b>

Especie	Código de Laboratorio	Voucher	Cloroplasto	WRKY7	PRK	RPB2	CISP4	PHYB	AG1
<i>Astrocaryum huicungo</i>	JCP318	Peru: B Millán 449 (USM)	KP218884	KP218811	KP218844	JQ821986 (B. Millán 447 (USM))	JQ822013 (B. Millán 447 (USM))	JQ822059 (B. Millán 447 (USM))	<b>MF686909</b>
<i>Astrocaryum javarens</i> e (Trail) Drude	JCP1090	Peru	KP218892	KP218826	KP218845				<b>MF686908</b>
<i>Astrocaryum javarens</i> e	JCP1231	Peru: F Kahn 1858 (USM)	KP218878	KP218826	KP218844				
<i>Astrocaryum javarens</i> e	JCP1238	Peru: B Millán 1083 (USM)	KP218878	MF593228	KP218843				<b>MF686884</b>
<i>Astrocaryum javarens</i> e	JCP1239	Peru: B. Millán 1087 (USM)	KP218892 (JCP2150)	KP218827 (JCP2150)	KP218860 (JCP2150)	JQ821988	JQ822015	JQ822061	<b>MF686907 (JCP2150)</b>
<i>Astrocaryum macrocalyx</i> Burret	JCP0500	Peru	KP218893	KP218827	KP218843				<b>MF686906</b>
<i>Astrocaryum macrocalyx</i>	JCP0507	Peru	KP218892	KP218827	KP218845				
<i>Astrocaryum macrocalyx</i>	JCP1094	Peru: B Millán 912 (USM)	KP218894	KP218827	KP218843				<b>MF686905</b>
<i>Astrocaryum macrocalyx</i>	JCP1107	Peru: JC Pintaud 593 (USM)	KP218895	KP218828	KP218843	JQ821989	JQ822016	JQ822062	
<i>Astrocaryum malybo</i> H.Karst.	JCP2095	N. D. Jiménez 109 (COL)	<b>MF593189</b> <b>MF593196</b> <b>MF593203</b> <b>MF593217</b> <b>MF593210</b>	<b>MF593227</b>	JQ821959	HQ265634	JQ822017	JF422059	<b>MF686904</b>
<i>Astrocaryum murumuru</i> Mart.	JCP1776	French Guiana	KP218879	KP218830	KP218844				<b>MF686903</b>
<i>Astrocaryum murumuru</i>	JCP2158	French Guiana: JJ de Granville 11202 (CAY)	KP218897	KP218830	KP218844				<b>MF686902</b>

Especie	Código de Laboratorio	Voucher	Cloroplasto	WRKY7	PRK	RPB2	CISP4	PHYB	AG1
<i>Astrocaryum murumuru</i>	JCP2165	French Guiana: JJ de Granville 11201 (CAY)	KP218879	<b>MF593232</b>	KP218862				
<i>Astrocaryum murumuru</i>	JCP310	French Guiana: A Perez 718 (CAY)	KP218879	KP218830	KP218863	HQ265637	JQ822020	JF422046	<b>JF414918</b>
<i>Astrocaryum perangustatum</i> F.Kahn & B.Millán	JCP1009	Peru: B Millán 830 (USM)	KP218898	<b>MF593239</b>	KP218864				
<i>Astrocaryum perangustatum</i>	JCP1883	Peru: B. Millán & F. Kahn 1597 (USM)	KP218879 (JCP1731)	KP218811 (JCP1731)	KP218845 (JCP1731)	JQ821991	JQ822022	JQ822064	<b>MF686901 (JCP1731)</b>
<i>Astrocaryum perangustatum</i>	JCP1810	Peru: F Kahn 4436 (USM)	KP218899	KP218811	KP218844				
<i>Astrocaryum perangustatum</i>	JCP2420	Peru	KP218879	KP218811	KP218845				
<i>Astrocaryum sciophilum</i> (Miq.) Pulle	JCP1519	French Guiana	KP218900	KP218832	KP218866				<b>MF686900</b>
<i>Astrocaryum sciophilum</i>	JCP2187	J. J. de Granville 11074 (CAY)	<b>MF593190</b> <b>MF593197</b> <b>MF593204</b> <b>MF593218</b> <b>MF593211</b>	<b>MF593231</b>	JQ821966	JQ821993	JQ822024	JF422047	
<i>Astrocaryum sciophilum</i>	JCP1770	French Guiana	KP218900	KP218833	KP218868				
<i>Astrocaryum sciophilum</i>	JCP312	French Guiana: Billiet & Jadin 1872 (CAY)	KP218900	KP218834	KP218866				

Especie	Código de Laboratorio	Voucher	Cloroplasto	WRKY7	PRK	RPB2	CISP4	PHYB	AG1
<i>Astrocaryum scopatum</i> F.Kahn & B.Millán	JCP0465	Peru: F Kahn 4340 (USM)	KP218889	<b>MF593237</b>	KP218845				<b>MF686899</b>
<i>Astrocaryum scopatum</i>	JCP0849	Peru: F Kahn 4364 (USM)	KP218889	<b>MF593234</b>	KP218845				
<i>Astrocaryum scopatum</i>	JCP2358	Peru	KP218889	KP218824	KP218845				<b>MF686898</b>
<i>Astrocaryum scopatum</i>	JCP2403	Peru	KP218901	KP218835	KP218843	JQ821994	JQ822025	JQ822065	
<i>Astrocaryum ulei</i> Burret	JCP1938	Peru: F Kahn 4460 (USM)	KP218902	KP218837	KP218843	JQ821996	JQ822028	JQ822068	<b>MF686897</b>
<i>Astrocaryum ulei</i>	JCP1946	Peru: F Kahn 4462 (USM)	KP218879	KP218811	KP218845				
<i>Astrocaryum ulei</i>	JCP1970	Peru: F Kahn 4469 (USM)	KP218879	KP218811	KP218843				
<i>Astrocaryum ulei</i>	JCP1851	Peru: F Kahn 4465 (USM)	KP218881	KP218836	KP218844				<b>MF686893</b>
<i>Astrocaryum urostachys</i> Burret	JCP0466	Ecuador: F. Kahn 4356 (USM)	<b>MF593191</b> <b>MF593198</b> <b>MF593205</b> <b>MF593219</b> <b>MF593212</b>	<b>MF593229</b>	<b>MF593224</b>				<b>MF686883</b>
<i>Astrocaryum urostachys</i>	JCP0472	Ecuador: F. Kahn 4347 (USM)	<b>MF593192</b> <b>MF593199</b> <b>MF593206</b> <b>MF593220</b> <b>MF593213</b>	<b>MF593240</b>	<b>MF593223</b>				<b>MF686918</b>
<i>Astrocaryum urostachys</i>	JCP2156	Ecuador	<b>MF593193</b> <b>MF593200</b> <b>MF593207</b> <b>MF593221</b> <b>MF593214</b>	<b>MF593236</b>	JQ821970	HQ265642	JQ822029	JF422051	<b>MF686919</b>
<i>Astrocaryum urostachys</i>	JCP2368	Peru	KP218903	KP218818	KP218843				<b>MF686896</b>

Especie	Código de Laboratorio	Voucher	Cloroplasto	WRKY7	PRK	RPB2	CISP4	PHYB	AG1
<i>Astrocaryum urostachys</i>	JCP2398	Peru	KP218904	KP218818	KP218860				<b>MF686895</b>
<i>Astrocaryum vulgare</i> Mart.	JCP0909	French Guiana: A Perez 793 (CAY)	KP218879	KP218838	KP218869				
<i>Astrocaryum vulgare</i>	JCP0910	French Guiana	KP218879	KP218838	KP218869				
<i>Astrocaryum vulgare</i>	JCP2132	French Guiana	KP218879	KP218839	KP218869	HQ265643	JQ822030	JQ822069	<b>MF686892</b>
<i>Astrocaryum vulgare</i>	JCP364	French Guiana	KP218879	KP218840	KP218870				<b>MF686894</b>
<i>Astrocaryum vulgare</i>	JCP372	Brazil: L. Noblick 4972 (FTG)	KP218879	KP218838	<b>MF593222</b>				<b>MF686882</b>
<i>Hexopetion alatum</i> (H.F.Loomis) F.Kahn & Pintaud	JCP371	Mexico: S Zona 921 (FTG)	KP218872	KP218810	KP218841	HQ265630	JQ822002	JF422040	<b>JF414908</b>
<i>Hexopetion mexicanum</i> (Liebm. ex Mart.) Burret	JCP370	Mexico: JC Pintaud 637 (USM)	KP218896	KP218829	KP218861	HQ265635	JQ822018	JF812602	<b>JF414923</b>

**Anexo 2.** Lista de los 35 marcadores anatómicos foliares y 31 caracteres morfológicos multiestado obtenidos y recodificados del estudio de Millán & Kahn, 2010 y Kahn & Millán, 2013. Caracteres anatómicos y morfológicos están numerados con “A” o “M” respectivamente.

Caracter #	Descripción	Estado 0	Estado 1	Estado 2	Estado 3	Estado 4	Estado 5	Estado 6
<b>Lamina</b>								
A1	Epidermis Adaxial : pared externa	Células con pared externa delgada	células con pared externa gruesa					
A2	Epidermis Abaxial: forma de las células	Células redondeadas en el borde	Células rectangulares	Células ovaladas				
A3	epidermis Abaxial: Pared externa	Células con pared externa delgada	Células con pared externa gruesa					
A4	Indumento de la epidermis	ausente	papiloso	células en forma de cono con base multicelular				
A5	Número de células subsidiarias alrededor de las células de guardia	Dos células laterales subsidiarias , sin células terminales	Cuatro células subsidiarias: dos laterales y dos células terminales	Seis células subsidiarias: dos laterales externas, dos laterales internas, dos células terminales				
A6	Formas de las células terminales	ausente	Redondeadas en el borde	arriñonadas	Forma de “V”	lobadas	Forma de “Y”	Acampanadas Estado 7= ovalada Estado 8= triangular
A7	Sobre posición de las células terminales	ausente	Sobrepuestas solo en los extremos de las	Sobrepuestas en los extremos de las células	Sobrepuestas en mayor parte del			

			células subsidiarias internas o externas	subsidiarias laterales externas e internas.	exterior o interior de las células laterales subsidiarias			
A8	Ubicación de los extremos de las células terminales	Ausente	Sobre los extremos externos e internos de las células subsidiarias laterales	Sobre los extremos de las células laterales subsidiarias externas e internas	Sobre la mayor parte de las células laterales subsidiarias externas e internas			
A9	Disposición de los estomas en la epidermis	Regular	Irregular					
A10	Tamaño de las células hipodérmicas	Hipodermis adaxial más grande que en la cara abaxial	Mismo tamaño en ambas caras	Hipodermis adaxial más pequeña que en la cara abaxial				
A11	Pared celular externa en la cara adaxial	Gruesa	Delgada					
A12	Pared celular interna de la hipodermis de la cara adaxial	Delgada	Gruesa					
A13	Pared celular externa de la hipodermis de la celula abaxial	Gruesa	Delgada					
A14	Pared celular interna de la hipodermis de la cara abaxial	Delgada	Gruesa					

A15	Forma de las fibras sobre la hipodermis adaxial	Ausente	Columnar	Arrosetada	Forma de racimo, mismo y diferentes tamaños	Dispuestas al borde y en forma de racimo		
A16	Presencia y forma de las fibras sobre la hipodermis abaxial	Fibras ausentes	Arrosetado	Alrededor del borde	Forma de racimo	Arrosetadas y alrededor del borde		
A17	Capa continua de parénquima entre la hipodermis y las fibras	Ausente	Presente					
A18	Clorénquima con células empalizadas	Con muy pocas células	Con células largas					
A19	Haz vascular principal	Ovoides	Romboides	Elipticas	Reunidas en el borde			
A20	Ubicación del xilema en el haz vascular principal	Uno o más vasos de metaxilema en el centro del haz vascular	Uno o más vasos de metaxilema en la parte baja del haz vascular					
A21	Ubicación del floema en el haz vascular principal	Solo en la parte baja del xilema	Con forma de "U" rodeando parcialmente al xilema	Forma de medialuna rodeando parcialmente al xilema				
A22	Ubicación de las fibras en el haz vascular principal	Principalmente ubicadas en el fondo	Principalmente en los dos extremos y parcialmente laterales	Exclusivamente en los dos extremos				
A23	Extensión de la	Conformado	Conformado	Sin extensión				

	cubierta del haz	por parénquima y/o fibras dispuestas en forma de columna	por fibras dispuestas en forma de espolón					
A24	Haces vasculares menores	Arrosetados	Alrededor del borde	Elípticos	Ovoides	Alrededor del borde y elípticas		
<b>Vena principal</b>								
A25	Hipodermis: Expansión celular en un solo lado o en ambos lados de la vena	Expansión celular ausente	En la cara adaxial	En la cara abaxial				
A26	Tejido vascular	Sin envoltura perivascular	Envoltura perivascular esclerificada discontinua, romboide o triangular	Envoltura perivascular esclerificada dispuesta en forma de capa en posiciones abaxial y adaxial	Envoltura perivascular esclerificada continua			
A27	Haces de fibra	Ausencia de <i>estegmata</i>	Presencia de <i>estegmata</i>					
A28	Aerénquima	Ausente	Localizado bajo el haz vascular	Localizado en el centro del haz vascular				
<b>Peciolo</b>								
A29	Células epidérmicas: forma	Rectangular	Ovalada	Agrupadas al borde				
A30	Células	Gruesa	Delgada					

	epidérmicas: pared externa							
A31	Hipodermis	Presencia de parénquima	Presencia de esclereidas	Presencia de fibras septadas				
A32	Haces de fibra	Ausencia de <i>estegmata</i>	Presencia de <i>estegmata</i>					
<b>Vaina</b>								
A33	Células epidérmicas: Forma	rectangular	oval	Alrededor del borde				
A34	Células epidérmicas: Pared externa	Gruesa	Delgada					
A35	Hipodermis	Sin células esclereidas	Con células esclereidas					
M1	Tallo	Aéreo	Subterráneo	Sub- acaulescente				
M2	Hábito	Cespitoso	Solitario					
M3	Protección del tronco	Armado	No armado	Ligeramente armado				
M4	Cicatrices de las hojas en el tronco	Ausente	Presente					
M5	Cubierta de hojas	Persistente en el tallo	No persistente					
M6	Forma de la espina	Cilíndrica	Alada y aplanada	Aplanada				
M7	Espinaz flocosas	Ausente	Presente					
M8	Longitud las espinas entre la vaina y el pecíolo	Igual	Diferente					
M9	Forma de las espinas en las caras adaxial y abaxial de la	Igual	Diferente					

	<b>lámina</b>							
M10	Forma de las espinas en las caras adaxial y abaxial del raquis	Lanceolado	Negras y aplanadas					
M11	Disposición de las espinas en el raquis	Aleatoria	Agrupados en un determinado número					
M12	Longitud de las espinas en las caras adaxial y abaxial en el raquis	Igual	Diferente					
M13	Arreglo de las pinnas	Un plano	Más de un plano					
M14	Venas prominentes a ambos de la vena media	Ausente	Presente					
M15	Indumento abaxial de la pinna	Ausente	Presente					
M16	Posición de las inflorescencias	Flores femeninas y masculinas erectas	Uno de los dos péndulo					
M17	Inflorescencia : perfil insertado en el raquis	Insertado	No insertado					
M18	Inflorescencia: perfil con un indumento flocoso	Ausente	Presente					
M19	Inflorescencia:	Ausente	Presente					

	triada floral en la base de la raquilla							
M20	Tipo de flor en la parte distal de la raquilla	Estaminada	Pistilada					
M21	Forma del cáliz en la flor femenina	tubular	Urceolada	Truncada en copa	Ovoide – piriforme			
M22	Margen del cáliz de la flor femenina	Ligeramente en tres partes	Denticulado y lobado					
M23	Forma de la corola de la flor femenina	De oblonga a tubular	Urceolada	Truncada				
M24	Posición de las espinas en la corola de la flor femenina	Distantes del margen	A lo largo del margen					
M25	Proporción cáliz/corola en la flor femenina	Cáliz más pequeño o igual	Cáliz más largo					
M26	Indumento del cáliz de las flores femeninas	Espinás o setas	Glabro					
M27	Forma del pistilo	Conoidal	Cilíndrico	Oblongo				
M28	Endocarpo en el fruto	Membranoso	Variado					
M29	Forma del fruto	Turbinado	No turbinado	Variado				
M30	Indumento del epicarpo	Setas largas	Espinás largas					
M31	Proporción del anillo estaminoidal / corola	0.1 - 0.463	0.463 - 0.651					

**Anexo 3.** Matriz de caracteres morfológicos empleada en la reconstrucción filogenética por máxima parsimonia en PAUP.

Especie	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	M16	M17
<i>Hexopetion mexicanum</i>	0	1	0	?	1	2	?	?	?	?	?	?	0	?	1	0	?
<i>Hexopetion alatum</i>	0	1	0	?	0,1	2	?	?	?	?	?	?	0	?	1	0	?
<i>A. sciophilum</i>	0,1	1	?	?	0	2	?	1	?	?	?	?	0	1	?	0	?
<i>A. gynacanthum</i>	0	0	0	?	?	2	?	?	?	?	1	?	0	1	?	1	?
<i>A. vulgare</i>	0	0	0	?	?	0	?	?	?	?	?	?	1	?	?	0	?
<i>A. chambira</i>	0	1	0	?	?	1	?	?	?	?	?	?	1	?	?	0	?
<i>A. scopatum</i>	0,2	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1
<i>A. javarens</i>	0,2	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>A. macrocalyx</i>	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>A. urostachys</i>	0,2	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>A. chonta</i>	0	1	0,1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1
<i>A. murumuru</i>	0	0	1	1	1	1	0	0	0	?	0	0	0	0	0	1	1
<i>A. ulei</i>	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
<i>A. faranae</i>	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
<i>A. gratum</i>	0	1	0,1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>A. perangustatum</i>	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0
<i>A. carnosum</i>	2	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
<i>A. huicungo</i>	0,2	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1
<i>A. ciliatum</i>	1	1	?	?	?	2	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0,1
<i>A. ferrugineum</i>	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1
<i>A. huaimi</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>A. jauari</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>A. standleyanum</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>A. minus</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>A. paramaca</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>A. rodriquesii</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?

Especie	M18	M19	M20	M21	M22	M23	M24	M25	M26	M27	M28	M29	M30	M31	A1	A2	A3
<i>Hexopetion mexicanum</i>	?	0	0	2	?	?	?	0	?	?	1	?	?	?	0	1	0
<i>Hexopetion alatum</i>	?	0	0	2	?	?	?	0	?	?	1	?	?	?	1	1	0
<i>A. sciophilum</i>	?	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	1	2	0
<i>A. gynacanthum</i>	?	0	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	2	0
<i>A. vulgare</i>	?	0	?	1	?	?	?	0	?	?	?	?	?	?	1	0	1
<i>A. chambira</i>	?	0	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	0	1
<i>A. scopatum</i>	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	2	1
<i>A. javarens</i>	0	0	0	2	1	2	1	0	0	2	0	0	1	1	1	2	1
<i>A. macrocalyx</i>	0	0	0	3	0	?	1	1	1	0,2	0	0	0	1	0	2	0
<i>A. urostachys</i>	0	0	0	3	1	3	1	1	1	2	0	0	0	1	0	2	0
<i>A. chonta</i>	0	0	0	2	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	2	0
<i>A. murumuru</i>	1	0	0	2	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	2	1
<i>A. ulei</i>	0	0	1	2	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	2	1
<i>A. faranae</i>	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1
<i>A. gratum</i>	0	0	0	3	0	1	1	1	1	?	1	0	0	0	1	2	0
<i>A. perangustatum</i>	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	2	0
<i>A. carnosum</i>	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	2	1
<i>A. huicungo</i>	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0
<i>A. ciliatum</i>	?	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0,1	0	0	1	2	1
<i>A. ferrugineum</i>	0	0	0	?	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	?	?	?
<i>A. huaimi</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	1	2	0
<i>A. jauari</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	1	0	1
<i>A. standleyanum</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	1	1	1
<i>A. minus</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	0	2	0
<i>A. paramaca</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	1	1	0
<i>A. rodriguesii</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	1	2	0

Especie	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14	A15	A16	A17	A18	A19	A20
<i>Hexopetion mexicanum</i>	0	1	6	1	0	1	1	1	0	1	0	2,3	4	1	0	2	0
<i>Hexopetion alatum</i>	0	1	3	1	0	1	1	0	0	1	0	4	4	1	0	2	0
<i>A. sciophilum</i>	0	2	4	3	3	0	2	0	0	0	0	1,3	4	1	1	2	0
<i>A. gynacanthum</i>	0	2	3	3	0	0	2	0	0	0	0	2	0	1	1	3	1
<i>A. vulgare</i>	0	2	2	1	1	0	2	0	0	0	0	3	2	1	1	1	0
<i>A. chambira</i>	0	0	0	0	0	1	2	1	0	1	0	3	2	1	1	1	0
<i>A. scopatum</i>	0	2	3	2	2	0	2	1	0	1	0	2,3	2	0	1	0	1
<i>A. javarensense</i>	0	2	3	2	0	0	2	0	1	0	1	3	3	1	1	1	0
<i>A. macrocalyx</i>	0	2	5	2	2	0	1	0	1	1	0	3	2	1	1	2	1
<i>A. urostachys</i>	0	2	5	2	2	0	1	1	0	1	0	3	2	0	1	0	1
<i>A. chonta</i>	0	2	3	1	1	1	1	1	0	1	0	3	2	0	1	2	0
<i>A. murumuru</i>	0	2	3	1	1	1	1	0	1	0	1	3	4	1	1	2	1
<i>A. ulei</i>	0	2	3	1	1	1	2	0	1	0	0	3	2	1	1	1	1
<i>A. faranae</i>	0	2	3	2	0	0	0	0	1	0	0	1,3	4	1	1	0	1
<i>A. gratum</i>	0	2	1	2	2	0	2	0	0	0	0	3	2	1	1	1	1
<i>A. perangustatum</i>	0	2	3	2	2	0	2	1	0	0	1	3	1	1	1	1	1
<i>A. carnosum</i>	0	2	3	2	2	0	2	0	0	1	0	2,3	4	1	1	0	1
<i>A. huicungo</i>	0	2	3	2	0	0	2	1	0	1	0	3	2	0	1	1	1
<i>A. ciliatum</i>	0	2	3	2	2	0	2	0	1	1	1	3	2	1	1	1	1
<i>A. ferrugineum</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>A. huaimi</i>	0	2	7	2	2	0	0	1	1	1	1	1,3	1	1	1	1	0
<i>A. jauari</i>	1	2	8	0	1	0	1	2	1	1	1	1	2	1	1	0	0
<i>A. standleyanum</i>	0	2	1	0	1	0	2	3	1	1	1	2	2	1	1	1	1
<i>A. minus</i>	2	2	3	4	3	0	0	4	1	0	0	1,3	2	0	1	2	1
<i>A. paramaca</i>	0	2	2	4	0	0	2	5	1	1	0	2,3	2	1	1	3	1
<i>A. rodriguesii</i>	0	2	3	4	3	0	1	6	0	1	0	1,2,3	2	1	1	3	0

Especie	A21	A22	A23	A24	A25	A26	A27	A28	A29	A30	A31	A32	A33	A34	A35
<i>Hexopetion mexicanum</i>	1	0	1	3	2	3	0	0	?	?	?	?	?	?	?
<i>Hexopetion alatum</i>	1	0	1	1	2	3	0	0	?	?	?	?	?	?	?
<i>A. sciophilum</i>	0	0	0	3	2	2	0	0	0	0	1	0	?	?	?
<i>A. gynacanthum</i>	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
<i>A. vulgare</i>	0	1	2	4	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
<i>A. chambira</i>	0	1	2	2	1,2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>A. scopatum</i>	1	2	2	1	1,2	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0
<i>A. javarensse</i>	0	2	2	0	2	0	1	0	0	0	1	1	2	0	1
<i>A. macrocalyx</i>	0	1	2	1	0	0	1	2	0	0	1	1	2	0	1
<i>A. urostachys</i>	0	2	2	2	0	0	1	2	2	1	0	1	2	1	0
<i>A. chonta</i>	1	0	0	1	1,2	0	1	2	1	1	1	1	0	1	1
<i>A. murumuru</i>	0	0	0	2	1,2	0	1	2	1	0	0	1	0	0	0
<i>A. ulei</i>	1	1	2	2	1,2	0	1	2	1	0	1	1	0	0	1
<i>A. faranae</i>	1	1	2	4	1,2	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1
<i>A. gratum</i>	2	2	2	1	0	0	1	0	0	0	1	1	2	1	1
<i>A. perangustatum</i>	0	2	2	1	0	0	1	0	0	0	1	1	2	0	1
<i>A. carnosum</i>	0	1	2	4	1,2	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1
<i>A. huicungo</i>	0	0	2	0	2	0	1	0	0	0	1	1	2	0	0
<i>A. ciliatum</i>	1	1	2	4	1	0	1	0	1	0	2	1	1	0	0
<i>A. ferrugineum</i>	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
<i>A. huaimi</i>	1	1	2	4	1	0	1	1	0	0	0	1	2	1	0
<i>A. jauari</i>	0	1	2	1	1	0	1	1	0	0	0	1	2	1	0
<i>A. standleyanum</i>	1	1	2	1	1	0	1	1	0	0	0	?	2	1	0
<i>A. minus</i>	0	0	0	3	2	1	0	0	0	0	0	1	?	?	?
<i>A. paramaca</i>	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	?	?	?
<i>A. rodriguesii</i>	0	2	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0

**Anexo 3.** Artículo científico publicado en revista indexada

# Dry season characteristics in western Amazonia underlie the divergence of *Astrocaryum* section *Huicungo* (Arecaceae) and evaluation of potential anatomical adaptations

VICTOR JIMENEZ-VASQUEZ<sup>1,4\*</sup>, BETTY MILLÁN<sup>1,2</sup>, MIGUEL MACHAHUA<sup>2</sup>, FRANCIS KAHN<sup>2</sup>, RINA RAMIREZ<sup>1,2</sup>, JEAN-CHRISTOPHE PINTAUD<sup>3†</sup> and JULISSA RONCAL<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Lima 1, Peru

<sup>2</sup>Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Museo de Historia Natural, Apartado 14–0434, Lima 14, Peru

<sup>3</sup>UMR DIADE, Institut de Recherche pour le Développement, 34394 Montpellier, Cedex 5, France

<sup>4</sup>Department of Biology, Memorial University of Newfoundland, St John's, NL A1B 3X9, Canada

Received 30 April 2017; revised 23 July 2017; accepted for publication 12 August 2017

Population and species divergence in South America are usually attributed to geographical barriers in the form of rivers, mountains or climate. In western Amazonia (<1000 m elevation) case studies addressing the ecological niche as a divergent selection agent are scarce. Using sequences from five plastid and six low-copy nuclear DNA regions, we reconstructed coalescent species phylogenetic trees for *Astrocaryum* section *Huicungo* (15 species, Arecaceae), which corroborated the presence of two lineages distributed north and south of 5°S in western Amazonia. Using elevation, three climatic and six soil variables we evaluated the ecological niche of each lineage. Different annual precipitation regimes were associated with each lineage. Notably, a lower precipitation seasonality and lower elevation were attributed for the northern clade and the opposite was found for the southern clade. We also explored the diagnostic and evolutionary importance of 35 anatomical and 31 morphological characters using a phylogenetic analysis and ancestral character reconstructions. None of the anatomical characters was diagnostic for either lineage. However, hypodermal cell wall width and the location of aerenchyma had different ancestral states for the two lineages, and their adaptive values to the dry season differences are discussed.

ADDITIONAL KEYWORDS: anatomy – coalescent species tree – dry season – ecological speciation – morphology – Neotropics – precipitation seasonality – species distribution modelling.

## INTRODUCTION

Among the most studied abiotic factors that underlie phylogeographical breaks in South America are rivers, edaphic habitats, topography, climate and glaciation history (see Leite & Rogers, 2013; Turchetto-Zolet *et al.*, 2013 for reviews of phylogeographical studies in Amazonia and South America). In South America, the strongest phylogeographical break is attributed to the Andean uplift as a barrier (e.g. Cavers *et al.*, 2013;

Bacon *et al.*, 2016). The Andean uplift has also been proposed to have facilitated diversification of plant lineages through climatic niche differentiation along an elevation–temperature gradient (e.g. Sanin *et al.*, 2016). Rivers may also act as dispersal barriers promoting population divergence (e.g. Fernandes, Wink & Aleixo, 2012; de Lima *et al.*, 2014; Fouquet *et al.*, 2015; Rocha *et al.*, 2015; but see Pomara, Ruokolainen & Young, 2014; Tuomisto *et al.*, 2016; Nazareno, Dick & Lohmann, 2017, for evidence of river permeability). Edaphic heterogeneity has been proposed as a driver of plant speciation in the Amazon basin (Fine *et al.*, 2005). For example, phylogenetic analyses in

\*Corresponding author. E-mail: vr.jimenez.vs@gmail.com

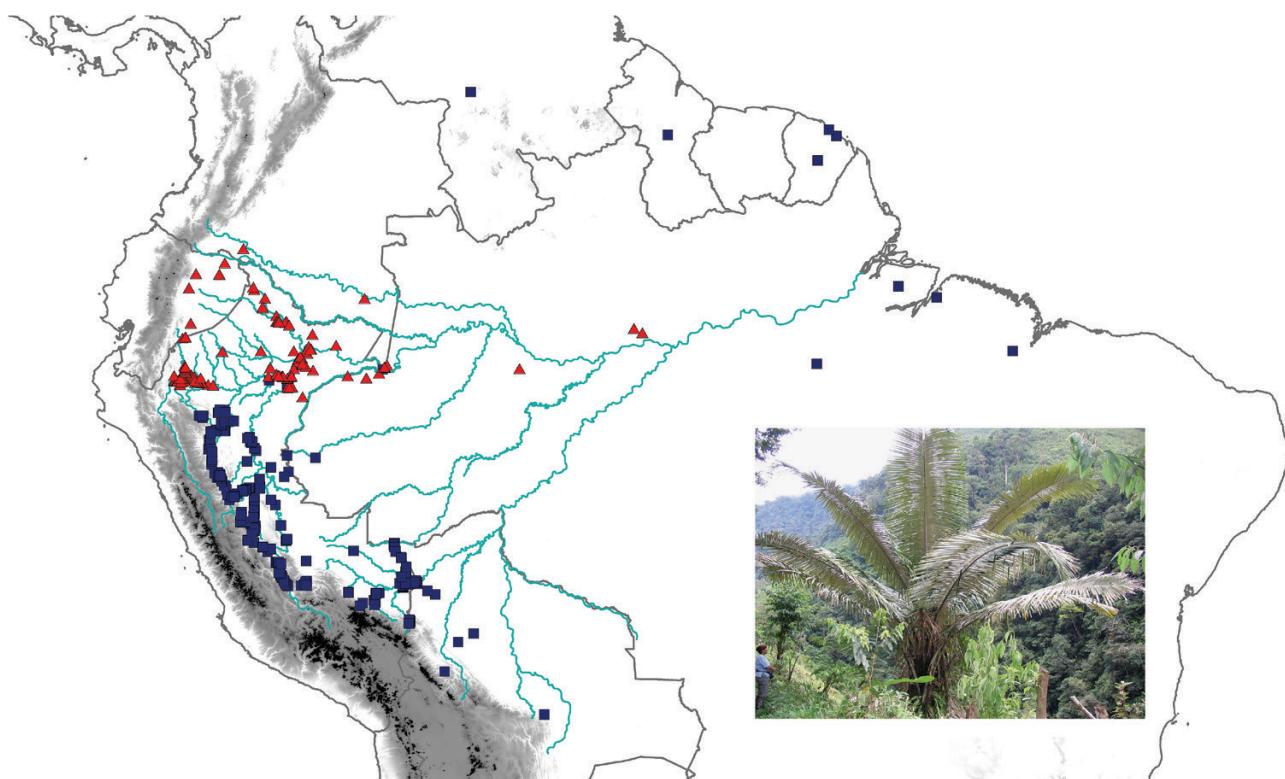
†In memoriam.

Burseraceae tribe Protieae have demonstrated convergent evolution of soil associations, suggesting that adaptive evolution played an important role in the speciation of this group (Fine *et al.*, 2005). Species also segregate across environmental gradients or climatic discontinuities in tropical America. For example, seasonally dry forests have restricted seed dispersal of *Ficus insipida* Willd. between Meso- and South America (Honorio Coronado *et al.*, 2014). In the lizard *Anolis punctatus* a phylogeographical structure was observed for western, central Amazonia and the Atlantic coastal forest (Prates *et al.*, 2016).

Western Amazonia (WA) comprises the tropical rain forests from the eastern Andean foothills <500 m in elevation to the adjacent lowlands extending politically into the Amazonian regions of Colombia, Peru, Ecuador, north-western Bolivia and the states of Amazonas and Acre in western Brazil (figure 1 in Montufar & Pintaud, 2006). This region is of interest because of the large biodiversity it contains (ter Steege *et al.*, 2006) and because its geological history is much more recent and dynamic than that of eastern Amazonia (Rossetti, de Toledo & Goes, 2005). WA is composed of numerous sedimentary units deposited during the late Cenozoic as a consequence of the

Andean uplift, which caused several episodes of subsidence that prompted retreat of a lake system at the end of the Miocene and gave rise to the development of a fluvial system with an eastward flow (Hoorn, 1993; Hoorn *et al.*, 1995; Vonhof, Wesselingh & Ganssen, 1998; Rossetti *et al.*, 2005). Shallow and short-lived marine incursions covered WA at least twice during the Miocene (Jaramillo *et al.*, 2017). Eastern Amazonia, by contrast, composed of old Palaeozoic and Precambrian rocks, remained geologically stable and had limited sediment deposition after the late Cretaceous (Aleixo & de Fatima Rossetti, 2007). In WA, case studies addressing abiotic factors underlying population or species divergence that may have acted as divergent selection agents are scarce.

Our case study, *Astrocaryum* G.Mey. section *Huicungo* F.Kahn (Arecaceae), is a clade of 15 species, of which 14 are present in WA, with most of them endemic to this region (Kahn, 2008; Roncal *et al.*, 2013). Three species reach Central Amazonia and the Guiana Shield (*A. ferrugineum* F.Kahn & B.Millán, *A. murumuru* Mart. and *A. ulei* Burret; Fig. 1). The palms in this group occupy the understorey to subcanopy (15 m) of rain forests in a variety of habitats ranging from primary to disturbed forests and from swamps to well-drained terra firme,



**Figure 1.** Map of northern South America showing occurrence data points for the central Andean foothills (blue squares) and northern Amazonian foreland basin (red triangles) clades used in the niche differentiation analysis. Inset photo of *Astrocaryum perangustatum* in Peru.

usually < 1000 m a.s.l. (rarely to 1200–1600 m). They tolerate deforestation and can be found in open areas. Detailed knowledge of the distribution of each species has been generated in Peru (Kahn *et al.*, 2011; Roncal *et al.*, 2015). The ‘huicungo’ palms, as rural inhabitants commonly call them, are not considered a commodity. However, local communities drink the liquid endosperm, the palm heart is edible, and oil extraction from the mesocarp and endocarp has been reported in Brazil (Kahn & Millán, 2013).

A synapomorphy of section *Huicungo* is that the rachillae or inflorescence branches have a glabrous proximal part, which is setose or pilose in the other three sections of subgenus *Monogynanthus* Burret (Kahn, 2008; Kahn & Millán, 2013). Species identification of the huicungo palms requires a combination of vegetative, pistillate flower and fruit morphological characters (Kahn & Millán, 2013). Anatomical characters of the lamina, main rib, petiole and sheath have also been proposed for taxonomic identification of *Astrocaryum* spp. (Millán & Kahn, 2010). Notably, characters of the stomata are distributed according to the infrageneric classification of *Astrocaryum* and the position of subsidiary terminal cells characterizes the different subsections in *Huicungo* (Millán & Kahn, 2010). However, morphological and anatomical characters have not been analysed in an evolutionary framework. The most recent study on evolutionary trends in leaf anatomy in palms did not include *Astrocaryum* (Horn *et al.*, 2009). Knowledge of the evolution of anatomical characters can provide insight on the selective regime (e.g. habitat type, climate) under which plant species evolved. For example, in the riparian *A. jauari* Mart., a well-developed aerenchyma transports gas from branches to roots under the hypoxic conditions of white- and black-water inundation forests, both leaf sides are heavily covered with wax to protect leaves from inundation and stomata are located only on the abaxial leaf surface (Schluter, Furch & Joly, 1993).

Cladogenesis of the huicungo palms was estimated at 6–8 Mya (Roncal *et al.*, 2013, 2015), post-dating the drainage of the Pebas aquatic system hypothesized to have dominated the WA landscape from 23 to 8 Mya (Wesselingh & Salo, 2006) and supporting its constraining role for colonization and *in situ* diversification. A time-calibrated tree and phylogeographical spatial diffusion analysis of the huicungo palms revealed a break in WA at c. 5°S between two main clades named the northern Amazonian foreland basin (NAFB) and central Andean foothills (CAF), with mean crown ages of 6.7 and 7.3 My, respectively (Roncal *et al.*, 2015). A biogeographical scenario was proposed of recurrent dispersal into WA from the Choco or the Guiana Shield followed by speciation in two areas of contrasting geological activity: tectonic uplift in the Fitzcarrald arch (FA) area in the CAF versus subsidence in the

NAFB. It is hypothesized that uplift of the FA indicates the onset of rock uplift in the sub-Andean Shira mountains dated to after 9 ± 2 Mya and is related to subduction of the Nazca Ridge (Espurt *et al.*, 2010; Gautheron *et al.*, 2013). The FA played a dynamic role in modifying the Amazonian foreland basin because it rearranged drainage divides and catchment areas, erosional and sedimentological processes, generating a dynamic edaphic mosaic (Espurt *et al.*, 2010). These hydrological and sedimentological landscape modifications could have acted as a selection agent during the diversification of the huicungo palms, but the lack of detailed occurrence data prevented the evaluation of this hypothesis.

In the present study we test three hypotheses: (1) coalescence-based species tree reconstruction reveals the same two *Astrocaryum* section *Huicungo* lineages identified in a previous concatenation analysis; (2) ecological niche divergence might have played a role in the speciation of this group; and (3) leaf morphological and anatomical traits are useful to distinguish clades and evolved in conjunction with the ecological niche.

## MATERIAL AND METHODS

### TAXON SAMPLING AND DNA SEQUENCING AND ALIGNMENT

We increased the number of individuals and DNA regions sequenced in Roncal *et al.* (2013, 2015) to improve the phylogenetic tree for the huicungo palms. We obtained silica-dried leaf material for 13 of the 15 species of *Astrocaryum* section *Huicungo* (*A. ciliatum* F.Kahn & B.Millán, and *A. cuatrecasanum* Dugand were unavailable). We used seven outgroup species representing sections *Astrocaryum* (*A. malybo* H.Karst, *A. vulgare* Mart.), *Euchambira* F.Kahn (*A. chambira* Burret), *Munbacca* Drude (*A. gynacanthum* Mart.) and *Monogynanthus* Burret [*A. sciophilum* (Miq.) Pulle] and two species of the sister genus *Hexopetion* Burret [*H. alatum* (H.F.Loomis) F.Kahn & Pintaud, *H. mexicanum* (Liebm. ex Mart.) Burret]. We followed the taxonomy of Kahn (2008). DNA was extracted from 25–45 µg of silica-gel-dried leaf tissue using the DNeasy plant mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). We sequenced five plastid regions (the *psbM-trnD*, *rps16-trnQ* and *trnD-trnT* intergenic spacers and the *rps16* and *trnG* introns) for seven *Astrocaryum* individuals, a WRKY transcription factor (WRKY7) for 13 individuals, intron 4 of the phosphoribulokinase gene (*PRK*) for five individuals and the AGAMOUS parologue 1 identified in the palm *Elaeis guineensis* Jacq. (AG1) for 39 individuals of *Astrocaryum* and *Hexopetion* (Supporting Information, Table S1). Primer pairs are specified in Table 1. Amplifications

**Table 1.** Primer pairs and annealing temperatures used to generate new DNA sequences for this study; alignment size in parentheses

	Locus (size)	Primer name	Annealing temperature (°C)	Reference
Nuclear	WRKY7 (719 bp)	CnW07-F4 CnW07-R4	61	Meerow <i>et al.</i> (2009)
	PRK (1023 bp)	717F 969R	57	Lewis & Doyle (2002)
	AG1 (409 bp)	AG1-F1 AG1-R1	60	Ludeña <i>et al.</i> (2011)
Plastid	rps16 intron (777 bp)	rps16-In-F rps16-In-R	58	Scarcelli <i>et al.</i> (2011)
	psbM-trnD (747 bp)	psbM-F trnD-R	53	Shaw <i>et al.</i> (2005)
	trnD-trnT (753 bp)	trnD-IGS-F trnT-IGS-R	62	Scarcelli <i>et al.</i> (2011)
	trnG intron (642 bp)	trnGin-F trnGin-R	61	Scarcelli <i>et al.</i> (2011)
	trnQ-rps16 (1086 bp)	trnQ-F rps16-R	62	Hahn (2002)

were performed on a 25-μL reaction mix containing 1 μL 1× Taq Buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 0.2 mM each dNTP, 0.2 μM each primer, 0.5 units PCR Taq DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific), 1.25 mM MgCl<sub>2</sub> and c. 20 ng template DNA. PCR conditions consisted of 35 cycles with the following steps: denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at various temperatures for 1 min (Table 1) and extension at 72 °C for 1 min. These cycles were preceded by an initial denaturation at 94 °C for 7 min and followed by a final extension at 72 °C for 10 min. PCR products were sent for Sanger sequencing to Macrogen Inc. (Seoul, Korea). In addition, the nuclear low-copy sequences of intron 23 of RNA polymerase II subunit 2 (*RPB2*), the region amplified by the conserved intron-scanning primer set #4 (*CISP4*) and phytochrome B (*PHYB*) were taken from Roncal *et al.* (2013). Specimens, herbarium voucher information and NCBI accession numbers are listed in Table S1 (Supporting Information). Each of the 11 DNA regions (five plastid and six nuclear) was independently aligned with MUSCLE (Edgar, 2004), manually adjusted in MEGA7 (Kumar, Stecher & Tamura, 2016) and subsequently concatenated in a supermatrix using SequenceMatrix 1.7.8 (Vaidya, Lohman & Meier, 2011). We removed a 108-bp region in *AG1* and a 36-bp microsatellite motif in *PHYB* because they were difficult to align. The total supermatrix consisted of 8131 bp for 79 individuals (57 from section *Huicungo* and 22 outgroups), with one to six individuals sampled per species and with 16% missing data. This matrix is available on TreeBASE (<http://purl.org/phylo/treebase/study/TB2:S21294>).

#### MOLECULAR PHYLOGENETIC ANALYSES

We performed a phylogenetic analysis on the supermatrix DNA alignment using maximum likelihood (ML) in RAxML v8.2.4 (Stamatakis, 2014). The best partition scheme was found using PartitionFinder (Lanfear *et al.*, 2012). An ML tree was reconstructed with 100 runs under the GTR+G+I model with the method 'lazy subtree rearrangement' from 100 different parsimony-starting trees. Branch support was assessed using the non-parametric Shimodaira–Hasegawa-like implementation of the approximate likelihood-ratio test (SH-aLRT; Guindon *et al.*, 2010). We used SH-aLRT instead of the bootstrap methodology because it is an order of magnitude faster, is based on whole alignment likelihoods rather than resampling random characters with replacement and is less sensitive to weak phylogenetic signal (Anisimova *et al.*, 2011; Pyron, 2011).

To address tree discordance among gene genealogies and to infer a species tree from multiple individuals per species, we used three methods that use a multispecies coalescent model. These three methods gave us insight on tree topology uncertainty and were useful to test how different topologies can affect the anatomical character state reconstruction analysis (see below). First, we used the NJst (Liu & Yu, 2011) and STAR (Liu *et al.*, 2009) algorithms as implemented in STRAW (Shaw *et al.*, 2013) with default parameters. These methodologies infer a species tree based on unrooted and rooted gene trees, respectively, and incorporate gene tree uncertainty using bootstrap analysis (Shaw *et al.*, 2013). For each of the six linkage units (all plastid regions were merged into one,

and *RPB2* was eliminated because it gave low-resolution trees), we generated 1000 bootstrap replicates with RAxML 8.2.4 under the GTR+G+I model. The 6000 bootstrap ML trees were compressed into a single zip file and uploaded into STRAW. We used NJst because it can handle multiple allele sequence data if the alleles sampled from the same species do not form a monophyletic group, which we demonstrated in the concatenation analysis (Liu & Yu, 2011). The STAR method was also performed because it is resistant to variable substitution rates along the branches in gene trees, and has been shown to outperform other coalescent methods such as STEAC, SC and GLASS (Liu *et al.*, 2009).

Second, because STAR and NJst may suffer from information loss and reduced efficiency, we performed a Bayesian analysis of the 11 DNA region dataset using the coalescent method of \*BEAST (Heled & Drummond, 2010) as implemented in BEAST v1.8.2 (Drummond *et al.*, 2012) via the CIPRES Science Gateway (Miller, Pfeiffer & Schwartz, 2010). We used the partition schemes and substitution model as obtained in PartitionFinder. A relaxed molecular clock with an uncorrelated lognormal distribution under the Yule process as divergence tree prior, with random starting trees for each partition, was used. We ran two independent Markov chain Monte Carlo runs each consisting of 100 million generations with parameters sampled every 1000 generations and a 25% burn-in. We combined independent runs using LogCombiner v1.8.2 and evaluated convergence by considering estimated sample size (ESS) values  $> 200$  for all model parameters in Tracer v1.8.2. We obtained a maximum clade credibility species tree with TreeAnnotator v1.8.2 (Drummond *et al.*, 2012).

#### ECOLOGICAL NICHE DIVERGENCE

We compiled 507 occurrence records of huicungo palms from Kahn *et al.* (2011), field observations in Bolivia, Peru, Ecuador, Colombia and Brazil, and Tropicos and Reflora databases (Fig. 1). To analyse the presence of niche divergence between clades we first conducted a principal component analysis (PCA) using ten environmental predictors: three climatic variables from WorldClim (Hijmans *et al.*, 2005); elevation from the NASA Shuttle Radar Topographic Mission 90m Digital Elevation Database v4.1 at 250-m spatial resolution (Jarvis *et al.*, 2008); and six soil variables from SoilGrids1km (Hengl *et al.*, 2014). These variables were chosen because they were not highly correlated (Pearson correlation coefficient  $< 0.60$ ). Environmental data were handled and extracted in ArcGIS v10.4 (ESRI, Redlands, CA, USA). We conducted the PCA on the log-transformed continuous variables in R (R Core Team, 2015).

In addition, we used the maximum entropy method implemented in MaxEnt v3.3.3k (Phillips, Anderson & Schapire, 2006) to model the spatial distribution of each clade. We used 135 and 372 occurrence records for the NAFB and CAF clades, respectively, and the same set of ten variables employed in the PCA. We rescaled the elevation layer to 1 km<sup>2</sup> to meet the spatial resolution of the climatic and soil layers. The raw MaxEnt output was chosen because it does not rely on post-processing assumptions. We ran 15 replicates using 75% of the records as training data, the remaining 25% for testing the model and five feature classes (linear, quadratic, product, threshold and binary). We used default parameters for the maximum number of iterations (500), background points of 10 000, regularization multiplier of 1 and convergence threshold of 0.00001. The resultant prediction map represents the probability of occurrence ranging from 0 (low suitability) to 1 (high suitability). The importance of each environmental predictor in the model was evaluated through permutation importance metrics and a jackknife test. We used the receiver operation characteristic (ROC) approach by calculating the area under the ROC curve (AUC) to characterize model performance. Finally, we measured niche overlap between the two huicungo clades using Hellenger distance  $I$  (Warren, Glor & Turelli, 2008) and Schoener's  $D$  (Schoener, 1968) statistics as implemented in ENMTools (Warren, Glor & Turelli, 2010). Both measures range from 0 to 1 for completely discordant and identical distributions, respectively.

#### MORPHOLOGICAL AND ANATOMICAL CHARACTERS

We recoded and rescored the list of 109 binary (presence/absence) leaf anatomical characters from the lamina, main rib, petiole and sheath published by Millán & Kahn (2010) as multistate characters, giving a new total of 35 characters (Supporting Information, Table S2). We recoded these binary characters because often the 'absence' state might be non-homologous, rendering incorrect suggestions of common ancestry and similarity in morphologically dissimilar taxa (Jenner, 2002). In addition, we newly coded and scored 31 morphological characters obtained from Kahn & Millán (2013), mostly describing the trunk, spines, inflorescence and female flower shape (Supporting Information, Table S2). The combined anatomical and morphological dataset (Supporting Information, Table S3) for 14 species of *Astrocaryum* section *Huicungo* and 12 outgroups (including *Hexopetion*) were used to reconstruct a phylogenetic tree using maximum parsimony in PAUP\* 4.0b10a (Swofford, 2002). We used a stepwise addition heuristic search with 1000 replicates of tree-bisection-reconnection (TBR), keeping ten trees per replicate, and with accelerated character

transformation (ACCTRAN). Additionally, TBR was applied to all the trees retained in memory. All characters were considered unordered and equally weighted. Node support was assessed with 1000 non-parametric bootstrap replicates and a 50% majority rule consensus tree was constructed. The data matrix and consensus tree are available on TreeBASE.

To explore the diagnostic and evolutionary importance of the anatomical characters, we estimated ancestral states by maximum likelihood using the ‘ace’ command in the R package ‘ape’ (Paradis, Claude & Strimmer, 2004). We tested three different models for transition probabilities between the states of each discrete character: equal rates (ER), symmetrical (SYM) and all rates different (ARD). A likelihood test (G statistics) between these models asks whether the difference in log likelihoods is large enough to lie at the rightmost tail of a chi-square distribution (Paradis, 2012). In every case, the chi-square *P*-value was not significant ( $> 0.05$ ), suggesting that all three models were not significantly different; we therefore chose the simplest ER model for every ancestral state reconstruction. To test how different topologies can affect the anatomical character state reconstruction analysis, we used the NJst and \*BEAST coalescent trees.

## RESULTS

### MOLECULAR PHYLOGENETIC ANALYSES

PartitionFinder found four optimal partitions for the 11 DNA loci: *AG1+CISP4+RPB2; PRK+WRKY7; PHYB*; and plastid. GTR+G+I was the best nucleotide substitution model for every partition according to the corrected Akaike information criterion. The topology obtained from the supermatrix ML analysis recovered section *Huicungo* as monophyletic (SH-aLRT = 99) and confirms the presence of two well-supported clades (Supporting Information, Fig. S1): the NAFB and CAF with SH-aLRT values of 80 and 89, respectively. The interspecific relationships remained unresolved in each clade since only *A. murumuru* was monophyletic (SH-aLRT = 97). SH-aLRT support values ranged from 72 to 99 and rendered most species para- or polyphyletic. Every outgroup species, however, was monophyletic.

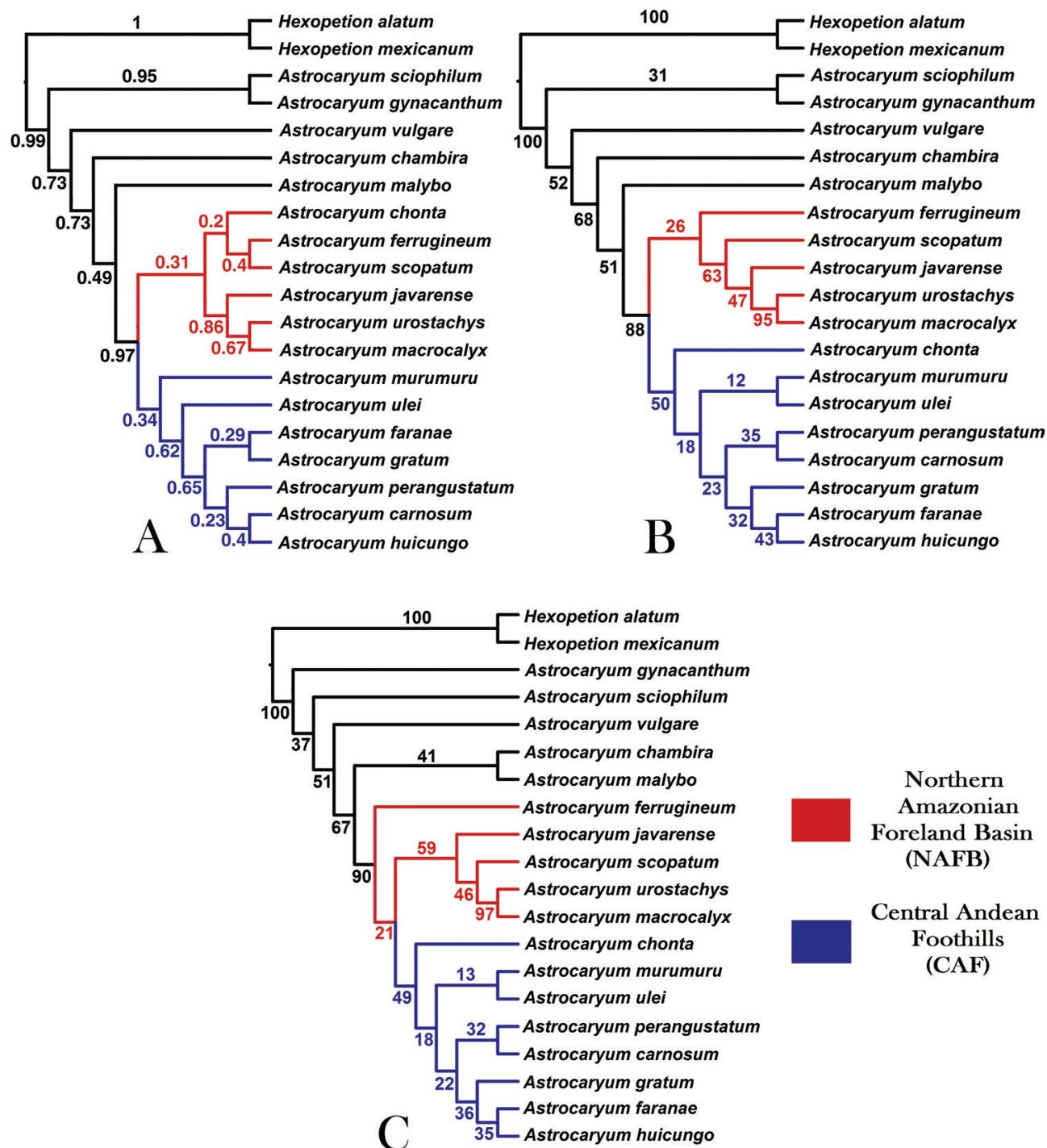
The three coalescent species trees recovered section *Huicungo* as monophyletic with strong support [*\*BEAST* posterior probability (pp) = 0.97, NJst bootstrap support (BS) = 88.1 and STAR BS = 90]. The NAFB and CAF clades were recovered in all trees, except for the NAFB, which was paraphyletic in the STAR tree (Fig. 2). Branch support in section *Huicungo* was mostly weak in all three coalescent trees (pp < 0.86, BS < 65). The three topologies differed slightly, but species members of each clade were the same, except for *A. chonta*

Mart. which appeared in the CAF clade in the NJst, STAR and concatenated ML trees and in the NAFB clade in the *\*BEAST* tree (Fig. 2). This constitutes the main difference between the *\*BEAST* tree and the rest. The sister relationship between *A. urostachys* Burret and *A. macrocalyx* Burret was recovered in the three coalescent trees with strong to moderate support (pp = 0.67, BS NJst = 95, BS STAR = 97). The ESS scores in Tracer from the *\*BEAST* analysis were all  $> 200$ . The gene trees from the six different linkage units imported in STRAW had polytomies, and the *PHYB* marker provided the most resolution.

### ECOLOGICAL NICHE DIVERGENCE

The first two principal components summarized 66.6% of the environmental variance. Individuals from the NAFB and CAF clades mostly discriminated along a diagonal line 130° from the first component (Fig. 3). Component 1 was largely related to elevation (load of 0.8), which was correlated with the mean temperature of the driest quarter (Bio9). Individuals in the NAFB clade grow at lower elevations (mean = 164 m asl, SD = 67.3) and higher Bio9 (mean = 25.8 °C, SD = 0.45) than CAF individuals (mean elevation = 457 m asl, SD = 291; Bio9 mean = 23.8 °C, SD = 1.6; Supporting Information, Fig. S2).

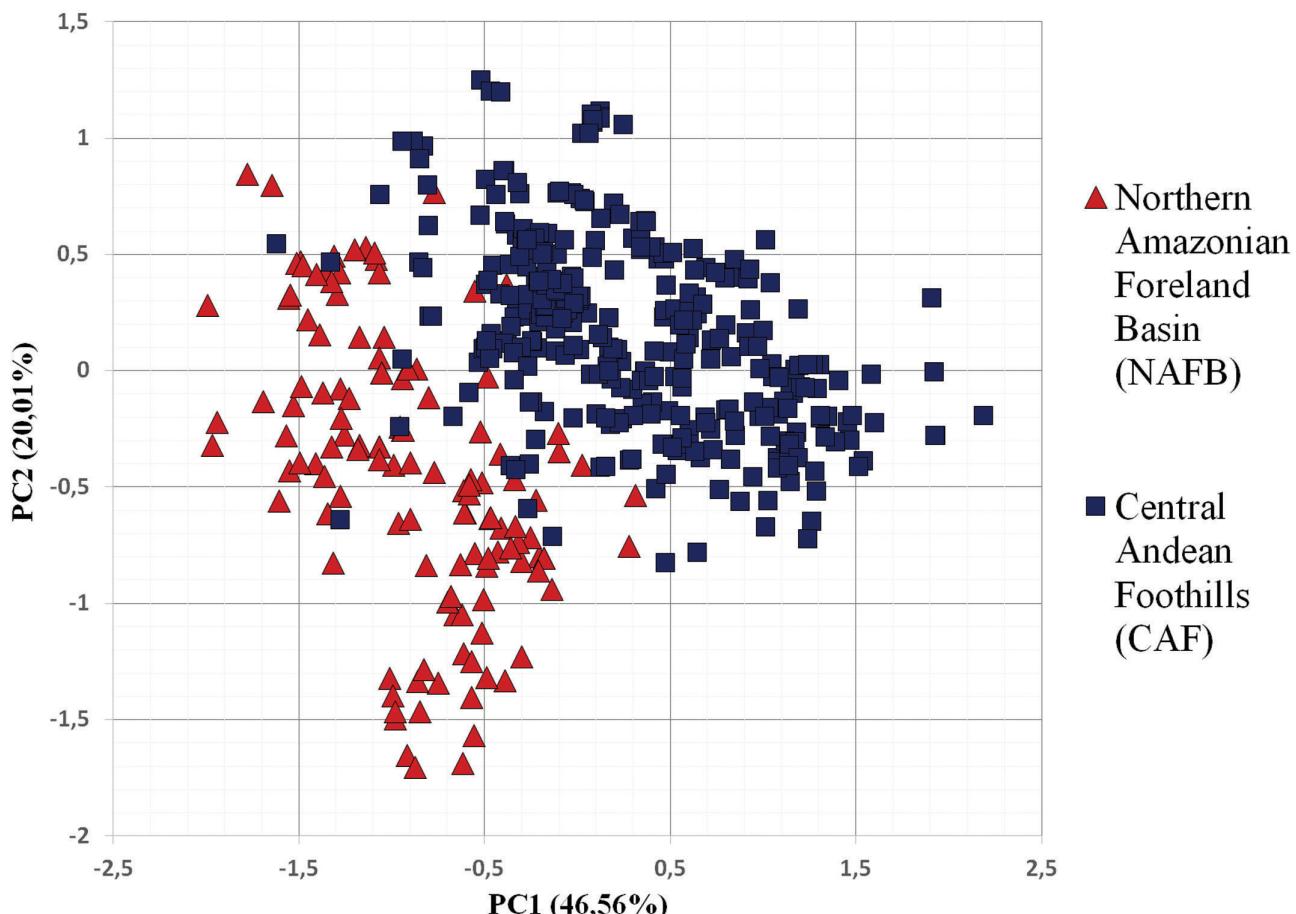
The validation of each MaxEnt model indicated that they were significantly better than the random distributions because the AUC values were well supported (AUC test/training for NAFB were 0.977/0.981, and for CAF were 0.950/0.956). Inspection of the models for each clade shows a clear niche differentiation between them (Fig. 4). Their geographical distributions are largely allopatric since areas of high niche suitability (blue in Fig. 4) showed no overlap. The models showed little predicted distribution overlap between the two clades corresponding to areas of low niche suitability (orange in Fig. 4). The distribution model of the NAFB clade is mainly restricted to the Marañon and upper Amazonas river basin in Peru, north into eastern Ecuador and, to a lesser extent, in Colombia (Amazonas) and north-western Brazil (Amazonas); by contrast, the CAF is mainly distributed in the eastern Andean foothills of Peru and Bolivia and, to a lesser extent, in western Brazil (Acre, Amazonas). The low niche suitability values in Brazil and the Guiana shield might be the result of the small number of occurrence records available for *A. murumuru*, *A. ferrugineum* and *A. ulei*. Climatic variables contributed the most to the MaxEnt models (not elevation or soil characteristics). The most important climatic variables for fitting the models were precipitation seasonality (Bio15) and precipitation of the warmest quarter (Bio18, Supporting Information, Table S4). Individuals in the NAFB clade grow in regions of lower Bio15 (mean = 16.02, SD = 4.18) than those of the CAF clade



**Figure 2.** Species tree of *Astrocaryum* section *Huicungo* (Arecaceae) using three coalescent model methods based on five plastid and six low-copy nuclear DNA regions. Numbers along the branches are posterior probabilities for the \*BEAST tree (A) and bootstrap support for NJst (B) and STAR (C) trees, respectively.

(mean = 41.67, SD = 9.87). Bio18, however, was not significantly different between clades. Since Bio15 was correlated with precipitation of the driest month (Bio14), we included this variable in the Supporting Information Fig. S2. A higher Bio14 (mean = 164.55,

SD = 24.92) characterizes sites of the NAFB clade than those of the CAF clade (mean = 80.06, SD = 38.32). Niche overlap between clades was small to negligible, as revealed by Hellenger distance  $I$  of 0.2684 and Schoener's  $D$  of 0.0739.



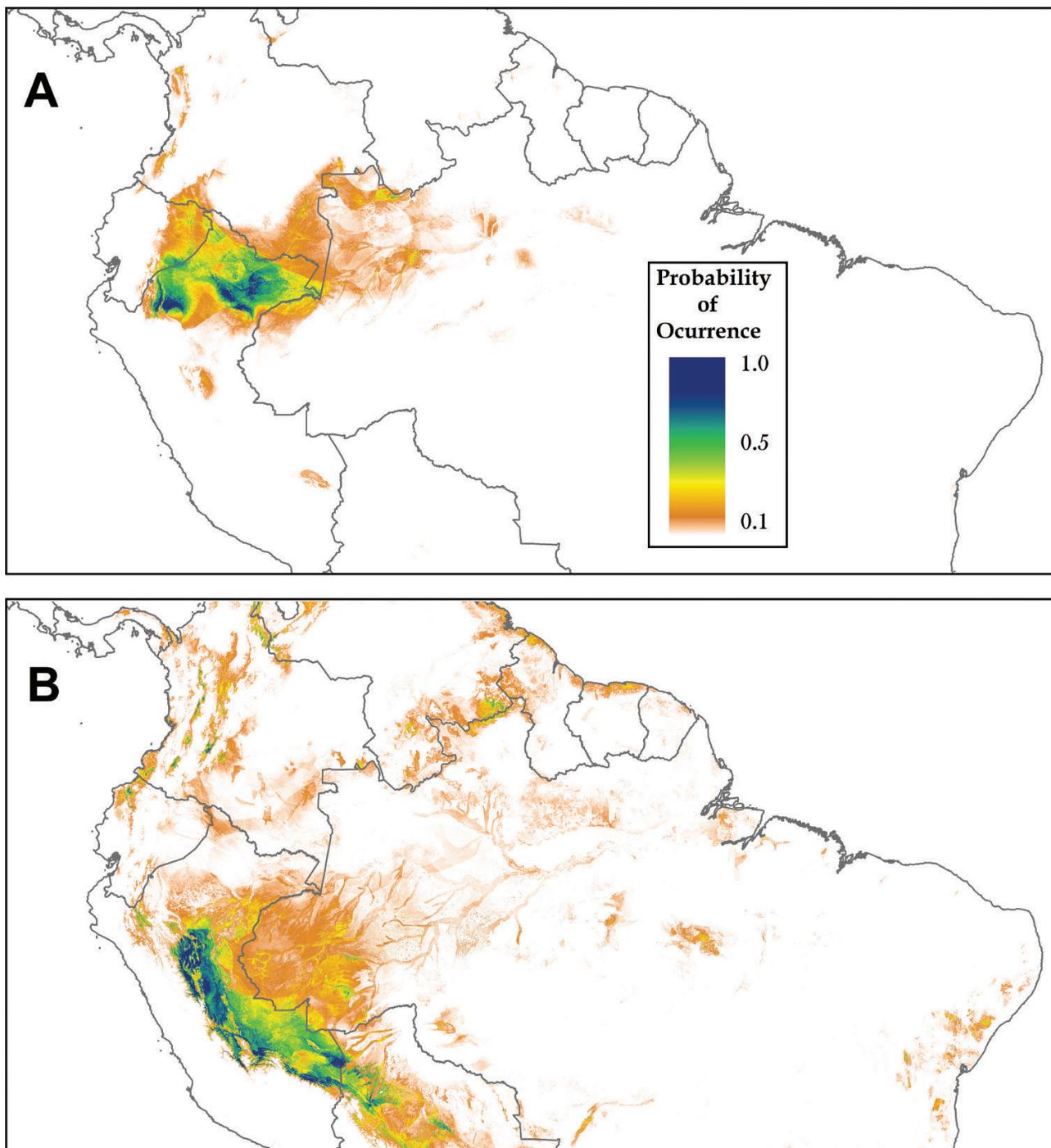
**Figure 3.** Principal component analysis of environmental characteristics (soil, climate and elevation) showing niche divergence of the central Andean foothills and northern Amazonian foreland basin lineages.

#### MORPHOLOGICAL AND ANATOMICAL CHARACTERS

The combined anatomical and morphological parsimony analysis resulted in a tree with low node support for the relationships among *Astrocaryum* (BS < 58, Supporting Information, Fig. S3). This analysis recovered *Astrocaryum* as monophyletic (BS = 98), but did not recover section *Huicungo*, or the NAFB or CAF clades. The sister relationship of *A. macrocalyx* and *A. urostachys* was recovered with weak support (BS = 45), and of *A. murumuru* and *A. ulei* with BS of 56. The analysis also recovered a group (*A. gratum* F.Kahn & B.Millán, *A. macrocalyx*, *A. perangustatum* F.Kahn & B.Millán, *A. urostachys*) compatible with subsection *Sachacungo* F.Kahn (Kahn, 2008) with weak support (BS = 34). The number of most-parsimonious trees was 23, tree length was 273, consistency index was 0.41 and retention index was 0.51, revealing high homoplasy.

No anatomical character was diagnostic for either clade, with most character reconstructions revealing the same most likely ancestral state for both clades at the time of divergence (e.g. hypodermal cell size,

Fig. 5A). However, two drought-related anatomical characters showed different ancestral states for the two clades in the \*BEAST tree. The ancestral condition for the hypodermal outer cell wall width on the abaxial side of leaves was thick for the CAF clade and thin for the NAFB clade (character A13, Fig. 5B). Aerenchyma was absent in the ancestor of a clade distributed in the eastern Andean foothills of Peru and Bolivia (CAF minus *A. murumuru*), and located in the centre of the main rib in the ancestor of the NAFB clade (character A28, Fig. 5C). When using the NJst tree, the ancestral states for the hypodermal outer cell wall width were equivocal for both clades. For the location of aerenchyma, the ancestor of the NAFB probably had no aerenchyma, whereas the reconstruction was equivocal for the ancestor of the CAF clade. We discuss the results of the \*BEAST tree and disregard those of the NJst tree because of these multiple equivocal reconstructions for the nodes of interest. We showed that tree topology can affect the reconstruction of ancestral states, and thus our results need to be corroborated using a better-resolved species tree for section *Huicungo*.



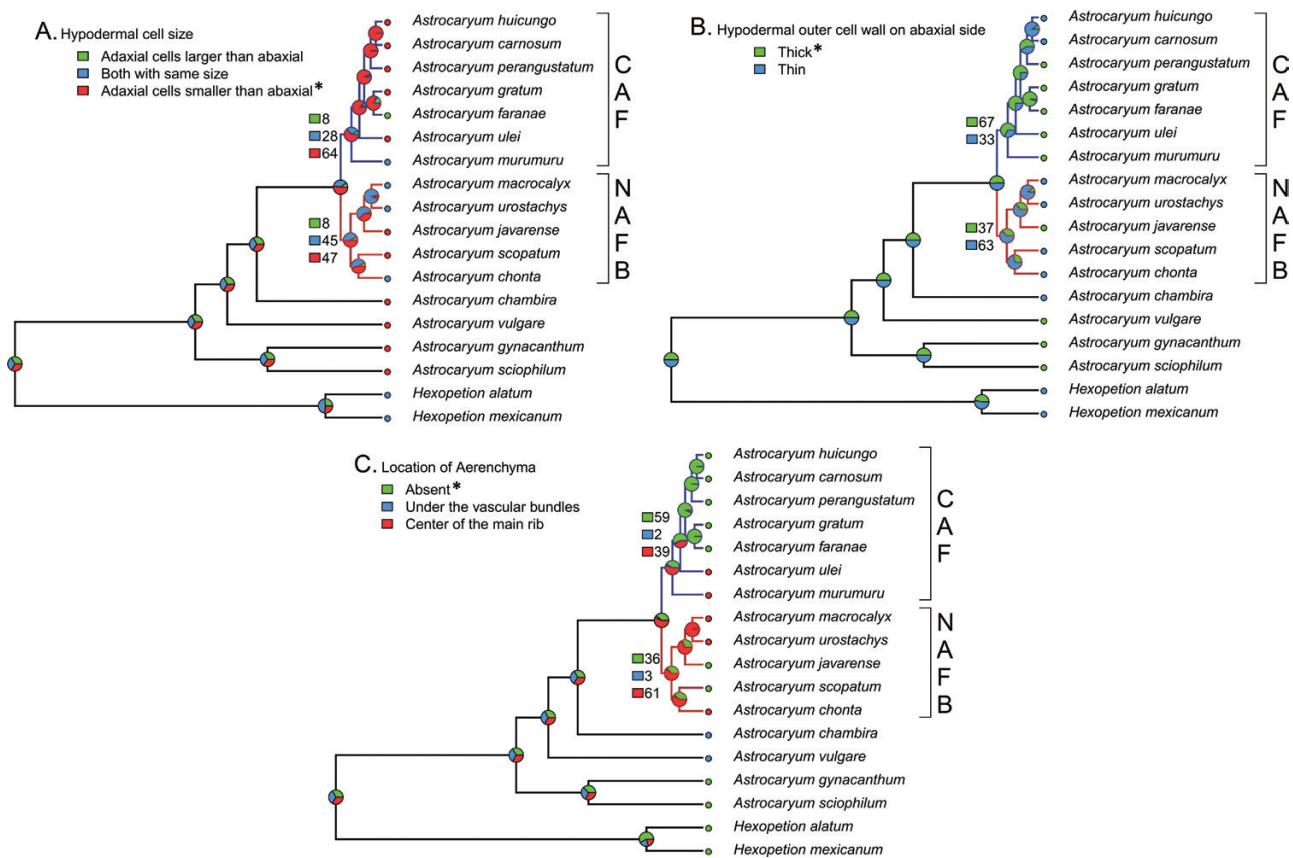
**Figure 4.** Species distribution modelling estimated using MaxEnt for (A) northern Amazonian foreland basin, and (B) central Andean foothills. Colours from orange via yellow and green to blue refer to MaxEnt values of occurrence probability (range 0–1, raw MaxEnt output).

## DISCUSSION

### MOLECULAR PHYLOGENETIC ANALYSES

Sequencing of 11 DNA loci allowed recognition of two clades, but resolution in each of them was still

low. This was not surprising since no species in section *Huicungo* were monophyletic in the RAxML tree except for *A. murumuru*. Low resolution and support within clades are probably because of their recent origin (6–8 Mya, Roncal *et al.*, 2015), which might not



**Figure 5.** Ancestral character state reconstruction using maximum likelihood for three hypothesized drought-related anatomical characters plotted on the \*BEAST coalescent tree. A, hypodermal cell size (character A10); B, hypodermal outer cell wall on abaxial side (character A13); C, aerenchyma (character A28). An asterisk marks states expected under dry conditions. Numbers next to boxes are the probabilities for each character state at the corresponding node.

have allowed the accumulation of numerous informative characters among species and the correct sorting of allelic variation. Alternatively, the evolution of the huicungo palms might not be entirely tree-like because of gene flow and hybridization, contributing to the degree of discordance we found among coalescent trees which only account for incomplete lineage sorting (ILS). The discordance among the three coalescent species trees in terms of some interspecific relationships can be explained by the sensitivity of these methods to the inherent lack of resolution in the gene trees (e.g. Huang *et al.*, 2010), which was evident from the polytomies recovered in all linkage unit trees (results not shown). The low bootstrap support of gene-tree-based methods (e.g. STAR, NJst) has been explained by gene tree estimation error, branch length information disregarded, and the addition of poorly supported gene trees (Liu *et al.*, 2015). Our results were concordant with claims that concatenation can result in more strongly supported phylogenetic trees than coalescent-based methods (e.g. Brumfield *et al.*, 2008; Townsend *et al.*, 2011), but the para- and polyphyly of species

prevents us from relying solely on the concatenation approach.

Membership of clades does not match the classification of section *Huicungo* proposed by Kahn (2008). The clade of *A. murumuru*, *A. ulei* and *A. chonta* (subsection *Huicungo*) recovered by Roncal *et al.* (2015) did not appear in any phylogenetic analysis. Our results, therefore, do not support the taxonomic recognition of any subsection (*Sachacungo*, *Huicungo* or *Murumuru*) defined on the basis of pistillate flower morphological characters (Kahn, 2008) and anatomical stomata characteristics such as the position of subsidiary terminal cells (Millán & Kahn, 2010). Populations of *A. chonta* show a disjunct spatial distribution in northern and central Peru, which could explain its recovery in both clades in the coalescent trees. The sister relationship between *A. macrocalyx* and *A. urostachys* was consistently recovered in all molecular and morphological/anatomical phylogenetic analyses. These two species grow mostly in parapatry, adjacent to each other, with a small contact zone in some parts of the Napo and Tigre river valleys in Peru (Kahn & Millán, 2013).

*Astrocaryum macrocalyx* is found in terra firme forests from the north-eastern region of Peru in Loreto, northwards into Colombia, whereas *A. urostachys* is found in Restinga forests on periodically inundated alluvial soils, from the Tigre river valley in Peru, throughout Amazonian Ecuador and into adjacent Colombia (Kahn & Millán, 2013). An anatomical synapomorphy for these two sister species is the Y-shape of terminal cells in the stomata (Millán & Kahn, 2010).

As Pennington & Dick (2010) suggested, over the course of millions of years, long-distance seed dispersal may overwrite and obscure any genetic signature of specific events that may have acted as speciation drivers in Amazonia such as riverine barriers, tectonic arches or marine incursions. This concept of historical ‘dispersal overwrite’ may explain why some disjunct lineages appear closely related (Pennington & Dick, 2010). Our results did not show historical dispersal overwrite, at least during the early evolution of section *Huicungo*, because we found geographical structure at the deep node of the phylogenetic tree. Since most species of section *Huicungo* occur in allopatry (Kahn *et al.*, 2011; Roncal *et al.*, 2015), we expected to also find phylogenetic geographical structure at a finer scale (i.e. shallow nodes in the tree), but this was not found, and we attribute this to the lack of phylogenetic resolution rendered by the markers chosen and/or historical dispersal overwrite.

#### ECOLOGICAL NICHE DIVERGENCE

Ancestral populations can divide and radiate into novel ecological niches, which are then subject to divergent selection, leading to reproductive isolation and speciation (Nosil, 2012). This hypothesis of ecological speciation is consistent with phylogenetic trees showing their greatest ecological differentiation along the inner nodes (Losos, 2009), and we found this pattern in section *Huicungo*. The niche segregation we observed for the two *Huicungo* clades involved different precipitation regimes north and south of the c. 5°S break in WA, with a decreased precipitation and increased length of the dry season south of the break. We acknowledge that our niche analysis considered only current environmental data and not the conditions under which the evolution of section *Huicungo* occurred (6–8 Mya). However, recent modelling of the effects of lower elevation during Andean upheaval suggested that total precipitation remained similar for most of the Amazon basin during the Neogene, not altering rainfall patterns enough to depart from a wet and warm tropical climate (Vonhof & Kaandorp, 2010). Since the Andes acted as a moisture barrier for atmospheric circulation, Amazonian climate probably experienced enhanced seasonality during the Neogene (Sepulchre, Sloan & Fluteau, 2010) and therefore the

current precipitation regime we suggest as having promoted niche differentiation was perhaps already present during the early divergence of section *Huicungo*. The interpretation that the niche differentiation found between clades acted as a divergent selection agent for ecological speciation awaits a formal test on the presence and strength of selection and gene flow.

Using forest inventory data, ter Steege *et al.* (2006) found two dominant geographical gradients in genus-level plant community composition across northern South America. The first community gradient was correlated with a gradient in soil fertility, whereas the second one paralleled a gradient in dry season length stretching from Colombia (least dry) to southeastern Amazonia (figure 1b in ter Steege *et al.*, 2006). This second community gradient matches the spatial distribution of the two *Huicungo* clades quite well. Individuals in the CAF grow under an annual precipitation seasonality (variance) of almost three times the seasonality occurring in the NAFB. Likewise, precipitation of the driest month (correlated with seasonality) was half for individuals in the CAF, compared with NAFB individuals (Supporting Information, Fig. S2). Although studies like that of ter Steege *et al.* (2006) are useful to detect the relative performance of species with respect to the environment, they are insufficient to demonstrate that climate in general and dry season length specifically can drive speciation. A phylogenetic framework like ours needs to be conducted for a wider spectrum of taxa in WA.

#### MORPHOLOGICAL AND ANATOMICAL CHARACTERS

Horn *et al.* (2009) argued that a functional significance could be attributable to many lamina anatomical characters, compensating for the morphological limitations in palms, and that such anatomical variation appears to be largely decoupled from lamina morphology. They further argued that evolution of palm leaf anatomy is homoplasious, but not at random since they observed recurrent evolution of character states. In our case study, we found multiple shifts among character states, with no anatomical character useful to distinguish the two *Huicungo* clades unequivocally. The parsimony analysis based on anatomical and morphological characters resulted in a poorly resolved tree with almost no similarity to the molecular trees, suggesting that the characters coded might be plastic or lack phylogenetic utility. Despite the fact that we tested some anatomical characters previously diagnosed as leaf adaptations that prevent water loss, only two characters showed ancestral states that were consistent with expectations if these were adaptations to the dry precipitation regimes in WA. The first was the thickness of the hypodermal cell wall on the leaf abaxial surface. Thickening of outer walls in the epidermis

and hypodermis has been associated with the osmotic adjustment that enables plants to survive under water stress (Bussotti *et al.*, 1998). As expected for individuals exposed to a pronounced dry season, the ancestor of the dry CAF clade most probably had thick hypodermal cell walls, whereas the ancestor of the wet NAFB clade probably had thin hypodermal cell walls.

The second character was the location of aerenchyma, which was reconstructed as absent for the ancestor of the dry CAF minus *A. mururmuru* clade, and at the centre of the main rib for the ancestor of the wet NAFB clade. A reduction of mesophyll intercellular spaces (aerenchyma) provides internal blocking of water movement reducing transpiration (Bosabalidis & Kofidis, 2002). A third character, hypodermal cell size, could not be reconstructed unequivocally for the ancestor of the wet NAFB clade, for which we expected to find an ancestor with equal cell size in the abaxial and adaxial leaf surfaces. However, the dry CAF ancestor did show the expected state of smaller hypodermal cells on the adaxial surface, which has been shown to prevent cell collapse under water stress conditions (Oertli, Lips & Agami, 1990).

Among the anatomical drought tolerance characters that did not differ for the two lineage ancestors were cell wall thickness of the epidermis, papillate or hairy indumentum and bundle sheath extension. Besides osmotic adjustment, cell wall thickening and lignification in the epidermis can be due to autophagic processes with exocytosis of degraded material in response to drought (Vollenweider *et al.*, 2016). A higher density of non-glandular scales or hairs on the leaf surface is known to block externally water vapour movement reducing transpiration (Bosabalidis & Kofidis, 2002). Bundle sheath extension refers to a group of cells (usually fibres) that bridge veins to the surface layers of leaves. They occur in many angiosperms and are characteristic of heterobaric leaves, which are known to confer adaptive benefits such as structural support under water stress (Kenzo *et al.*, 2007) and accelerated stomatal response to humidity (Buckley, Sack & Gilbert, 2011). We acknowledge that incomplete sampling (13 out of 15 species) and different topologies could affect the character state reconstruction results presented here. Thus, the drought-related potential anatomical adaptations we propose in this study need to be confirmed with a better resolved, taxonomically complete species tree.

#### CONCLUSIONS AND FUTURE RESEARCH PROSPECTS

This study is one of a few to address the climatic niche as a potential divergent selection agent in lowland WA plants. The distribution of precipitation in WA differentiates the ecological niche of the NAFB and CAF *Huicungo* clades. The anatomical characters evaluated

were not diagnostic of these two clades. However, hypodermal cell wall thickness and location of aerenchyma might have played a role as adaptations to the dry season length at the initial split of section *Huicungo*.

The use of targeted sequence enrichment and restriction-site-associated DNA sequencing methods may increase the phylogenetic resolution. Hypothesis testing on ecological speciation at a finer geographical scale than that presented here and confirmation of the potential anatomical adaptations could be possible with this improved phylogenetic tree. The multispecies coalescent methods used in this study imply only ILS as the source of gene tree incongruence. It is well known, however, that ILS by itself cannot explain all gene tree differences, and thus the *Huicungo* DNA dataset awaits to be evaluated with other species tree methods that incorporate hybridization, gene flow and reticulation.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by an NSERC-Discovery grant (RGPIN-2014-03976) to J.R., the Emerging Leaders in the Americas Scholarship offered by the Canadian Ministry of Foreign Affairs to V.J., and the Vicerektorate of Research of UNMSM (#141001031 and #151001021) to R.R. We are grateful to Yolanda Wiersma for discussions on niche modelling. We are also grateful to Christine Bacon, an anonymous reviewer and the editor for improving the quality of this work. This study constitutes part of the MSc thesis in Molecular Biology at UNMSM of V.J. and is dedicated to the memory of Jean-Christophe Pintaud and Gloria Galeano, two excellent palm researchers, mentors and friends.

#### REFERENCES

- Aleixo A, de Fatima Rossetti D.** 2007. Avian gene trees, landscape evolution, and geology: towards a modern synthesis of Amazonian historical biogeography? *Journal of Ornithology* **148**: S443–S453.
- Anisimova M, Gil M, Dufayard JF, Dessimoz C, Gascuel O.** 2011. Survey of branch support methods demonstrates accuracy, power, and robustness of fast likelihood-based approximation schemes. *Systematic Biology* **60**: 685–699.
- Bacon CD, Velasquez-Puentes F, Florez-Rodriguez A, Balslev H, Galeano G, Bernal R, Antonelli A.** 2016. Phylogenetics of Iriarteeae (Arecaceae), cross-Andean disjunctions and convergence of clustered infructescence morphology in *Wettinia*. *Botanical Journal of the Linnean Society* **182**: 272–286.
- Bosabalidis A, Kofidis G.** 2002. Comparative effects of drought stress on leaf anatomy of two olive cultivars. *Plant Science* **163**: 375–379.

- Brumfield RT, Liu L, Lum DE, Edwards SV.** 2008. Comparison of species tree methods for reconstructing the phylogeny of bearded manakins (Aves: Pipridae, *Manacus*) from multilocus sequence data. *Systematic Biology* **57**: 719–731.
- Buckley TN, Sack L, Gilbert ME.** 2011. The role of bundle sheath extensions and life form in stomatal responses to leaf water status. *Plant Physiology* **156**: 962–973.
- Bussotti F, Gravano E, Grossoni P, Tani C.** 1998. Occurrence of tannins in leaves of beech trees (*Fagus sylvatica*) along an ecological gradient, detected by histochemical and ultrastructural analyses. *New Phytologist* **138**: 469–479.
- Cavers S, Telford A, Arenal Cruz F, Perez Castaneda AJ, Valencia R, Navarro C, Buonamici A, Lowe AJ, Vendramin GG.** 2013. Cryptic species and phylogeographical structure in the tree *Cedrela odorata* L. throughout the Neotropics. *Journal of Biogeography* **40**: 732–746.
- de Lima NE, Lima-Ribeiro MS, Tinoco CF, Terribile LC, Collevatti RG.** 2014. Phylogeography and ecological niche modelling, coupled with the fossil pollen record, unravel the demographic history of a Neotropical swamp palm through the Quaternary. *Journal of Biogeography* **41**: 673–686.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A.** 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUTi and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* **29**: 1969–1973.
- Edgar R.** 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* **5**: 1–19.
- Espurt N, Baby P, Brusset S, Roddaz M, Hermoza W, Barbarand J.** 2010. The Nazca Ridge and uplift of the Fizcarrald Arch: implications for regional geology in northern South America. In: Hoorn C, Wesselingh F eds. *Amazonia: landscape and species evolution. A look into the past*. Oxford: Wiley-Blackwell, 89–100.
- Fernandes AM, Wink M, Aleixo A.** 2012. Phylogeography of the chestnut-tailed antbird (*Myrmeciza hemimelaena*) clarifies the role of rivers in Amazonian biogeography. *Journal of Biogeography* **39**: 1524–1535.
- Fine PV, Daly DC, Villa Muñoz G, Mesones I, Cameron KM.** 2005. The contribution of edaphic heterogeneity to the evolution and diversity of Burseraceae trees in the western Amazon. *Evolution* **59**: 1464–1478.
- Fouquet A, Courtois EA, Baudain D, Lima JD, Souza SM, Noonan BP, Rodrigues MT.** 2015. The trans-riverine genetic structure of 28 Amazonian frog species is dependent on life history. *Journal of Tropical Ecology* **31**: 361–373.
- Gautheron C, Espurt N, Barbarand J, Roddaz M, Baby P, Brusset S, Tassan-Got L, Douville E.** 2013. Direct dating of thick- and thin-skin thrusts in the Peruvian Subandean zone through apatite (U–Th)/He and fission track thermochronometry. *Basin Research* **25**: 419–435.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O.** 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology* **59**: 307–321.
- Hahn WJ.** 2002. A phylogenetic analysis of the Arecoid Line of palms based on plastid DNA sequence data. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **23**: 189–204.
- Heled J, Drummond AJ.** 2010. Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Molecular Biology and Evolution* **27**: 570–580.
- Hengl T, de Jesus JM, MacMillan RA, Batjes NH, Heuvelink GB, Ribeiro E, Samuel-Rosa A, Kempen B, Leenaars JG, Walsh MG, Gonzalez MR.** 2014. SoilGrids1km—global soil information based on automated mapping. *PloS One* **9**: e105992.
- Hijmans R, Cameron S, Parra J, Jones P, Jarvis A.** 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* **25**: 1965–1978.
- Honorio Coronado EN, Dexter KG, Poelchau MF, Hollingsworth PM, Phillips OL, Pennington RT, Carine M.** 2014. *Ficus insipida* subsp. *insipida* (Moraceae) reveals the role of ecology in the phylogeography of widespread Neotropical rain forest tree species. *Journal of Biogeography* **41**: 1697–1709.
- Hoorn C.** 1993. Marine incursions and the influence of Andean tectonics on the Miocene depositional history of northwestern Amazonia – results of a palynostratigraphic study. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* **105**: 267–309.
- Hoorn C, Guerrero J, Sarmiento G, Lorente M.** 1995. Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene northern South America. *Geology* **23**: 237–240.
- Horn JW, Fisher JB, Tomlinson PB, Lewis CE, Laubengayer K.** 2009. Evolution of lamina anatomy in the palm family (Arecaceae). *American Journal of Botany* **96**: 1462–1486.
- Huang H, He Q, Kubatko LS, Knowles LL.** 2010. Sources of error inherent in species-tree estimation: impact of mutational and coalescent effects on accuracy and implications for choosing among different methods. *Systematic Biology* **59**: 573–583.
- Jaramillo C, Romero I, D'Apolito C, Bayona G, Duarte E, Louwye S, Escobar J, Luque J, Carrillo-Briceño JD, Zapata V, Mora A, Schouten S, Zavada M, Harrington G, Ortiz J, Wesselingh FP.** 2017. Miocene flooding events of western Amazonia. *Science Advances* **3**: e1601693.
- Jarvis A, Reuter H, Nelson A, Guevara E.** 2008. *Hole-filled SRTM for the globe Version 4*, available from the CGIAR-CSI SRTM 90m Database. Available at: <http://srtm.csi.cgiar.org> (accessed June 2017).
- Jenner R.** 2002. Boolean logic and character state identity: pitfalls of character coding in metazoan cladistics. *Contributions to Zoology* **71**: 67–91.
- Kahn F.** 2008. The genus *Astrocaryum* (Arecaceae). *Revista Peruana de Biología* **15**: 31–48.
- Kahn F, Millán B.** 2013. *Las palmeras huicungo - the huicungo palms*. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos - Institut de Recherche pour le Développement.
- Kahn F, Millán B, Pintaud J, Machahua M.** 2011. Detailed assessment of the distribution of *Astrocaryum* sect. *Huicungo* (Arecaceae) in Peru. *Revista Peruana de Biología* **18**: 279–282.
- Kenzo T, Ichie T, Watanabe Y, Hiromi T.** 2007. Ecological distribution of homobaric and heterobaric leaves in tree species of Malaysian lowland tropical rainforest. *American Journal of Botany* **94**: 764–775.

- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016.** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution* **33**: 1870–1874.
- Lanfear R, Calcott B, Ho SY, Guindon S. 2012.** Partitionfinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution* **29**: 1695–1701.
- Leite RN, Rogers DS. 2013.** Revisiting Amazonian phylogeny: insights into diversification hypotheses and novel perspectives. *Organisms Diversity & Evolution* **13**: 639–664.
- Lewis C, Doyle J. 2002.** A phylogenetic analysis of tribe Areceae (Arecaceae) using two low-copy nuclear genes. *Plant Systematics and Evolution* **236**: 1–17.
- Liu L, Xi Z, Wu S, Davis CC, Edwards SV. 2015.** Estimating phylogenetic trees from genome-scale data. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1360**: 36–53.
- Liu L, Yu L. 2011.** Estimating species trees from unrooted gene trees. *Systematic Biology* **60**: 661–667.
- Liu L, Yu L, Pearl DK, Edwards SV. 2009.** Estimating species phylogenies using coalescence times among sequences. *Systematic Biology* **58**: 468–477.
- Losos J. 2009.** *Lizards in an evolutionary tree: ecology and adaptive radiation of anoles*. Berkeley: University of California Press.
- Ludeña B, Chabrilange N, Aberlenc-Bertossi F, Adam H, Tregear JW, Pintaud JC. 2011.** Phylogenetic utility of the nuclear genes AGAMOUS 1 and PHYTOCHROME B in palms (Arecaceae): an example within Bactridinae. *Annals of Botany* **108**: 1433–1444.
- Meerow AW, Noblick L, Borrone JW, Couvreur TL, Mauro-Herrera M, Hahn WJ, Kuhn DN, Nakamura K, Oleas NH, Schnell RJ. 2009.** Phylogenetic analysis of seven WRKY genes across the palm subtribe Attaleinae (Arecaceae) [corrected] identifies *Syagrus* as sister group of the coconut. *PloS One* **4**: e7353.
- Millán B, Kahn F. 2010.** Characterization of leaf anatomy in species of *Astrocaryum* and *Hexopetion* (Arecaceae). *Revista Peruana de Biología* **17**: 81–94.
- Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T. 2010.** Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*. New Orleans: Institute for Electrical and Electronic Engineers (IEEE), 1–8.
- Montufar R, Pintaud J. 2006.** Variation in species composition, abundance and microhabitat preferences among western Amazonian terra firme palm communities. *Botanical Journal of the Linnean Society* **151**: 127–140.
- Nazareno AG, Dick CW, Lohmann LG. 2017.** Wide but not impermeable: testing the riverine barrier hypothesis for an Amazonian plant species. *Molecular Ecology* **26**: 3636–3648.
- Nosil P. 2012.** *Ecological speciation*. Oxford: Oxford University Press.
- Oertli JJ, Lips SH, Agami M. 1990.** The strength of sclerophyllous cells to resist collapse due to negative turgor pressure. *Acta Oecologica* **11**: 281–289.
- Paradis E. 2012.** *Analysis of phylogenetics and evolution with R, 2nd edn*. New York: Springer.
- Paradis E, Claude J, Strimmer K. 2004.** APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* **20**: 289–290.
- Pennington RT, Dick CW. 2010.** Diversification of the Amazonian flora and its relation to key geological and environmental events: a molecular perspective. In: Hoorn C, Wesselingh FP eds. *Amazonia, landscape and species evolution: a look into the past*. Oxford: Wiley-Blackwell, 373–385.
- Phillips S, Anderson R, Schapire R. 2006.** Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* **190**: 231–259.
- Pomara LY, Ruokolainen K, Young KR. 2014.** Avian species composition across the Amazon River: the roles of dispersal limitation and environmental heterogeneity. *Journal of Biogeography* **41**: 784–796.
- Prates I, Rivera D, Rodrigues MT, Carnaval AC. 2016.** A mid-Pleistocene rainforest corridor enabled synchronous invasions of the Atlantic Forest by Amazonian anole lizards. *Molecular Ecology* **25**: 5174–5186.
- Pyron RA. 2011.** Divergence time estimation using fossils as terminal taxa and the origins of Lissamphibia. *Systematic Biology* **60**: 466–481.
- R Core Team. 2015.** *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing.
- Rocha RG, Ferreira E, Loss AC, Heller R, Fonseca C, Costa LP. 2015.** The Araguaia River as an important biogeographical divide for didelphid marsupials in central Brazil. *Journal of Heredity* **106**: 593–607.
- Roncal J, Couderc M, Baby P, Kahn F, Millán B, Meerow AW, Pintaud J. 2015.** Palm diversification in two geologically contrasting regions of western Amazonia. *Journal of Biogeography* **42**: 1503–1513.
- Roncal J, Kahn F, Millán B, Couvreur TLP, Pintaud J. 2013.** Cenozoic colonization and diversification patterns of tropical American palms: evidence from *Astrocaryum* (Arecaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **171**: 120–139.
- Rossetti D, de Toledo P, Goes A. 2005.** New geological framework for western Amazonia (Brazil) and implications for biogeography and evolution. *Quaternary Research* **63**: 78–89.
- Sanin MJ, Kissling WD, Bacon CD, Borchsenius F, Galeano G, Svenning J, Olivera J, Ramirez R, Trenel P, Pintaud J. 2016.** The Neogene rise of the tropical Andes facilitated diversification of wax palms (*Ceroxylon*: Arecaceae) through geographical colonization and climatic niche separation. *Botanical Journal of the Linnean Society* **182**: 303–317.
- Scarelli N, Barnaud A, Eiserhardt W, Treier UA, Seveno M, d'Anfray A, Vigouroux Y, Pintaud JC. 2011.** A set of 100 chloroplast DNA primer pairs to study population genetics and phylogeny in monocotyledons. *PloS One* **6**: e19954.
- Schlüter U, Furch B, Joly C. 1993.** Physiological and anatomical adaptations by young *Astrocaryum jauari* Mart. (Arecaceae) in periodically inundated biotopes of central Amazonia. *Biotropica* **25**: 384–396.
- Schoener T. 1968.** Anolis lizards of Bimini: resource partitioning in a complex fauna. *Ecology* **49**: 704–726.

- Sepulchre P, Sloan LC, Fluteau F.** 2010. Modelling the response of Amazonian climate to the uplift of the Andean mountain range. In: Hoorn C, Wesselingh FP eds. *Amazonia, landscape and species evolution: a look into the past*. Oxford: Wiley-Blackwell, 211–222.
- Shaw J, Lickey EB, Beck JT, Farmer SB, Liu W, Miller J, Siripun KC, Winder CT, Schilling EE, Small RL.** 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* **92**: 142–166.
- Shaw TI, Ruan Z, Glenn TC, Liu L.** 2013. STRAW: Species TRee Analysis Web server. *Nucleic Acids Research* **41**: W238–W241.
- Stamatakis A.** 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* **30**: 1312–1313.
- Swofford DL.** 2002. *PAUP\*4.0. Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods)*. Sunderland: Sinauer Associates.
- ter Steege H, Pitman NC, Phillips OL, Chave J, Sabatier D, Duque A, Molino JF, Prévost MF, Spichiger R, Castellanos H, von Hildebrand P, Vásquez R.** 2006. Continental-scale patterns of canopy tree composition and function across Amazonia. *Nature* **443**: 444–447.
- Townsend TM, Mulcahy DG, Noonan BP, Sites JW Jr, Kuczynski CA, Wiens JJ, Reeder TW.** 2011. Phylogeny of iguanian lizards inferred from 29 nuclear loci, and a comparison of concatenated and species-tree approaches for an ancient, rapid radiation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **61**: 363–380.
- Tuomisto H, Moulatlet GM, Balslev H, Emilio T, Figueiredo FO, Pedersen D, Ruokolainen K.** 2016.
- A** A compositional turnover zone of biogeographical magnitude within lowland Amazonia. *Journal of Biogeography* **43**: 2400–2411.
- Turchetto-Zolet AC, Pinheiro F, Salgueiro F, Palma-Silva C.** 2013. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology* **22**: 1193–1213.
- Vaidya G, Lohman DJ, Meier R.** 2011. SequenceMatrix: concatenation software for the fast assembly of multi-gene datasets with character set and codon information. *Cladistics* **27**: 171–180.
- Vollenweider P, Menard T, Arend M, Kuster TM, Gunthardt-Goerg MS.** 2016. Structural changes associated with drought stress symptoms in foliage of Central European oaks. *Trees-Structure and Function* **30**: 883–900.
- Vonhof H, Kaandorp R.** 2010. Climate variation in Amazonia during the Neogene and the Quaternary. In: Hoorn C, Wesselingh F eds. *Amazonia, landscape, and species evolution: a look into the past*. Oxford: Wiley-Blackwell, 201–210.
- Vonhof H, Wesselingh F, Ganssen G.** 1998. Reconstruction of the Miocene western Amazonian aquatic system using molluscan isotopic signatures. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology* **141**: 85–93.
- Warren DL, Glor RE, Turelli M.** 2008. Environmental niche equivalency versus conservatism: quantitative approaches to niche evolution. *Evolution* **62**: 2868–2883.
- Warren DL, Glor RE, Turelli M.** 2010. ENMTools: a toolbox for comparative studies of environmental niche models. *Ecography* **33**: 607–611.
- Wesselingh F, Salo J.** 2006. A Miocene perspective on the evolution of the Amazonian biota. *Scripta Geologica* **133**: 439–458.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site:

**Fig S1.** Maximum likelihood tree reconstructed in RAxML for 57 *Astrocaryum* section *Huicungo* individuals within 13 species plus 22 outgroup within 6 species. Branch support SH-aLRT along each node. Individuals distributed in the Northern Amazonian Foreland Basin and the Central Andean Foothills are marked with branch colors red and blue, respectively. Bar represents number of substitutions per site.

**Fig S2.** Boxplots of A. precipitation of the driest month (bio14), B. precipitation seasonality (bio15), C. temperature of driest quarter (bio9), and D. elevation, derived from occurrence records for *Astrocaryum* section *Huicungo*. Boxes represent the interquartile range, horizontal lines within the boxes represent means and whiskers extend to the 95% most extreme data points.

**Fig S3.** 50% majority rule consensus tree resulting from a maximum parsimony analysis in PAUP\* 4.0b10a for 14 *Astrocaryum* section *Huicungo* species and 12 outgroup based on the polymorphism of 35 anatomical and 31 morphological characters. Numbers along branches are bootstrap support. Species distributed in the Northern Amazonian Foreland Basin and Central Andean Foothills are marked in red and blue, respectively.

**Table S1.** Study species with information on sample identity in the DNA bank at the Institut de Recherche pour le Développement (IRD) in France, herbarium voucher number, and Genbank (NCBI) accession number used to reconstruct the phylogenetic tree of *Astrocaryum* section *Huicungo*. Sequences in bold were newly generated for this study. Within the column "Chloroplast", Genbank numbers correspond to the following DNA sequences: *psbM-trnD*, *rps16* intron, *rps16-trnQ*, *trnT-trnD*, *trnG* intron, otherwise they correspond to plastid haplotypes obtained from Roncal *et al.* 2015. DNA region acronyms described in the methods section.

**Table S2.** List of 35 leaf anatomical and 31 morphological multistate characters obtained from the literature but newly or recoded in this study (Millán & Kahn, 2010; Kahn & Millán, 2013). Anatomical and morphological characters are numbered with an A and M, respectively.

**Table S3.** Data matrix of 31 morphological and 35 anatomical characters coded in this study. Multiple states within a species are indicated by a comma (polymorphic species). ?=missing data

**Table S4.** List of the 10 environmental variables used for the MAXENT distribution modeling of the Northern Amazonian Foreland Basin (NAFB) and Central Andean Foothills (CAF) clades. This table shows relative contributions of each environmental variable to each model as estimated by permutation importance values and Jackknife test gain.