



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE BIOLOGÍA

**“Diversidad genética poblacional de *Quercus crassipes* y
Quercus obtusata y su relación con la variación de caracteres
funcionales en comunidades con distinta diversidad de
encinos”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS (ECOLOGÍA Y CONSERVACIÓN)

P R E S E N T A:

Biól. Silvia Ecaterina García Jain

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Pablo Cuevas Reyes

COASESOR DE TESIS: Dr. Antonio González Rodríguez

MORELIA, MICHOACÁN, AGOSTO 2016



ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Encinos en México	3
1.2 Flujo génico e hibridación en encinos	4
1.3 Variación morfológica en los encinos	9
1.4 Caracteres funcionales	9
2. HIPÓTESIS	12
3. OBJETIVOS	13
3.1 Objetivo general	13
3.2 Objetivos particulares	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS	14
4.1 Descripción de las especies de estudio	14
4.2 Determinación de la diversidad de especies de encinos en los sitios	15
4.3 Análisis de los caracteres funcionales	18
4.4 Análisis de diversidad genética	19
4.5 Análisis de datos	20
5. RESULTADOS	22
5.1 Caracteres funcionales de <i>Q. crassipes</i> y <i>Q. obtusata</i>	22
5.2 Diversidad genética de <i>Q. crassipes</i> y <i>Q. obtusata</i>	26
5.3 Correlaciones de la diversidad de encinos en las comunidades, las variables climáticas y los estimadores de diversidad genética con los caracteres funcionales	27
5.3.1 <i>Quercus crassipes</i>	27
5.3.2 <i>Quercus obtusata</i>	31
6. DISCUSIÓN	34
7. CONCLUSIONES	41
8. LITERATURA CITADA	42

RESUMEN

El género *Quercus* (Fagaceae), incluye aproximadamente 500 especies distribuidas principalmente en el Hemisferio Norte. México es el mayor centro de riqueza y diversificación de encinos en el Continente Americano con alrededor de 161 especies, de las cuales 109 son endémicas. Particularmente, el estado de Michoacán presenta aproximadamente 30 especies de encinos. El flujo de genes interespecífico entre dos o más especies de encinos es un fenómeno ampliamente documentado que a su vez promueve procesos de especiación. Existe intercambio de genes entre las especies de encinos cuando las poblaciones naturales de especies de la misma sección del género *Quercus* se encuentran en simpatria y la fenología se sobrepone en una misma zona, lo que favorece a la hibridación. Los caracteres funcionales de las plantas son las características morfológicas, fisiológicas y fenológicas que representan las estrategias ecológicas y determinan cómo las plantas responden a los factores ambientales. Los efectos de la hibridación sobre caracteres fenotípicos de relevancia ecológica han sido poco estudiados y menos aún en condiciones naturales. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar la relación entre la diversidad de especies de encinos con los niveles de variación genética y en caracteres funcionales de *Q. crassipes* y *Q. obtusata*. Se eligieron cinco poblaciones por cada especie de estudio que se encuentran en comunidades con distinta diversidad de encinos en Michoacán. Se examinó por población la variación de caracteres funcionales como el diámetro a la altura del pecho, el contenido de clorofila, el peso seco foliar, el grosor foliar, el área foliar, el área foliar específica, la densidad foliar y la densidad estomática. Además, se estimó en cada población mediante microsatélites de cloroplasto la diversidad y la riqueza de haplotipos, así como otros descriptores de la variación genética. Para ambas especies (*Q. crassipes* y *Q. obtusata*) se encontró que los caracteres con mayor variación en las poblaciones fueron el peso seco foliar y el área foliar, por su parte, los caracteres que presentaron los valores de menor variación en las poblaciones estudiadas fueron la cantidad de clorofila y la densidad de estomas. Se encontraron un total de 16 haplotipos en las cinco poblaciones de *Q. crassipes* y 22 haplotipos en las cinco poblaciones de *Q. obtusata*. No se encontraron correlaciones significativas entre los coeficientes de variación de los caracteres funcionales evaluados con los índices de riqueza y diversidad de especies de encinos en las comunidades locales de las especies focales. Las poblaciones de *Q. crassipes* presentaron una relación entre la variación de los caracteres funcionales con variables ambientales y con estimadores de diversidad genética, así como una relación negativa con el índice de diversidad de Shannon de la sección *Quercus* con estimadores de diversidad genética. Las poblaciones de *Q. obtusata* presentaron una relación entre la variación de los caracteres funcionales con variables ambientales y con estimadores de diversidad genética. Se concluye que la riqueza de especies de encinos en las comunidades locales no es un factor importante que explique la variación funcional y genética en *Q. crassipes* y *Q. obtusata*.

Palabras clave: encinos, riqueza de especies, caracteres funcionales, flujo génico, diversidad genética.

ABSTRACT

The genus *Quercus* (Fagaceae) includes about 500 species distributed mainly in the Northern Hemisphere. Mexico is the largest center of wealth and diversification of oaks in the Americas with about 161 species, of which 109 are endemic. In particular, the state of Michoacán has about 30 species of oaks. Interspecific gene flow between two or more species of oak trees is a widely documented phenomenon which in turn promotes speciation processes. There is exchange of genes between species of oak trees when natural populations of the same section of the genus *Quercus* are sympatric and phenology overlaps in the same area, favoring hybridization. Functional traits of plants are morphological, physiological and phenological characteristics that represent ecological strategies and determine how plants respond to environmental factors. The effects of hybridization on phenotypic traits of ecological significance have been little studied and even less under natural conditions. Therefore, the objective of this study was to evaluate the relationship between the diversity of oak species with levels of genetic variation and functional traits of *Q. crassipes* and *Q. obtusata*. Five populations were chosen for study species found in communities with different variety of oaks in Michoacán. Population was examined by variation of functional traits such as diameter at breast height, chlorophyll content, leaf dry weight, leaf thickness, leaf area, specific leaf area, leaf stomatal density and density. In addition, each population was estimated by chloroplast microsatellite diversity and richness of haplotypes and other descriptors of genetic variation. For both species (*Q. crassipes* and *Q. obtusata*) found that characters with greater variation in populations were leaf dry weight and leaf area, meanwhile, the characters had values less variation in the populations studied were the amount of chlorophyll and density of stomata. A total of 16 haplotypes were found in five populations of *Q. crassipes* and 22 haplotypes in five populations of *Q. obtusata*. No significant correlations between the coefficients of variation of functional traits evaluated with indices of richness and diversity of oak species in local communities of the focal species were found. *Q. crassipes* populations showed a relationship between the variation of functional traits and environmental variables estimators of genetic diversity, as well as a negative relationship with Shannon diversity index of *Quercus* section estimators of genetic diversity. *Q. obtusata* populations showed a relationship between the variation of functional traits and environmental variables estimators of genetic diversity. It is concluded that the richness of oak species in local communities is not an important factor that explains functional and genetic variation in *Q. crassipes* and *Q. obtusata*.

1. INTRODUCCIÓN

El género *Quercus* (encinos o robles) pertenece a la familia Fagaceae e incluye aproximadamente 500 especies de árboles y arbustos localizados principalmente en el Hemisferio Norte (Nixon 1993, Manos et al. 1999). Las especies del género dominan en los bosques templados, subtropicales, tropicales, mesófilos y también se les encuentra en áreas xéricas (Rzedowski 1978, Nixon 1993, Manos et al. 1999). Los estudios filogenéticos y taxonómicos de este género lo dividen en dos subgéneros, *Cyclobalanopsis* y *Quercus*. Este último se divide en cuatro secciones: *Cerris*, *Lobatae* (encinos rojos), *Protobalanus* y *Quercus* (encinos blancos) (Nixon 1993, Manos et al. 1999).

Los encinos presentan polinización anemófila; durante su periodo de reproducción forman amentos (flores masculinas) que contienen sacos de polen, el cual es liberado previo a la apertura de las flores pistiladas, las cuales son casi inconspicuas. Después de la fertilización, el ovario se desarrolla en un fruto unicelular e indehiscente (nuez), contenido en una estructura escamosa con forma de copa llamada cúpula. Ambas estructuras conforman la bellota, característica diagnóstica del género (Borgardt y Pigg 1999). Las bellotas pueden encontrarse solitarias o en racimos sobre un pedúnculo. Cuando maduran, caen por gravedad o son dispersadas por mamíferos pequeños y aves (Bossema 1979, Valencia 2004).

El género *Quercus* tiene una gran importancia económica, ya que es utilizado como fuente de leña, carbón, corcho y alimento. Los encinos también se utilizan para la construcción de barricas, muebles y herramientas (Nixon 1993). En términos de su relevancia ecológica, la presencia de encinos contribuye a la dinámica de nutrientes, al balance hídrico, al mantenimiento del microclima, a la reducción de la erosión del suelo, y al mantenimiento de la biodiversidad al tener interacciones multitroficas con diferentes taxa (Lewington y Streeter 1993).

1.1 Encinos en México

El género *Quercus* en México incluye árboles y arbustos con distribución principalmente en zonas con climas templados formando bosques de *Quercus*

o bosques de pino-encino. La geografía de México ha sufrido grandes cambios a través de su historia geológica, representando una gran riqueza de escenarios fisiográficos y climáticos, donde transcurrió parte importante de la historia evolutiva del género *Quercus* (Ferrusquía-Villafranca 1998). A nivel mundial, México es uno de los centros de diversificación de este género, ya que en nuestro país se encuentran 81 especies de la sección *Quercus* (encinos blancos), cuatro especies de la sección *Protobalanus* (encinos intermedios) y 76 especies de la sección *Lobatae* (encinos rojos) (Nixon 1998, Valencia 2004, Rodríguez y Romero 2007). Por lo tanto, se considera que México es el mayor centro de riqueza y evolución de encinos en el Continente Americano con alrededor de 161 especies. Se calcula que 109 especies (68%) son endémicas.

Los bosques de encinos se encuentran ampliamente distribuidos en las cadenas montañosas de México, y cubren aproximadamente 5.5% de la superficie total del país, hallándose la mayor diversidad de especies en un intervalo altitudinal que varía entre los 1200 y los 2800 msnm, aunque es posible encontrar especies desde los 200 hasta los 3500 m de altitud. Los estados con mayor riqueza de encinos son Nuevo León, Veracruz y Oaxaca (Arizaga et al. 2009). Sin embargo, las entidades con mayor información científica sobre este tipo de plantas son Jalisco, Guerrero, México y Michoacán. De manera natural el único estado sin encinos es Quintana Roo. El estado de Michoacán presenta aproximadamente 30 especies de encinos (Arizaga et al. 2009).

1.2 Flujo génico e hibridación en encinos

El flujo de genes es un factor clave en la evolución de las especies, ya que influye en el tamaño efectivo de las poblaciones, en la adaptación local y también en los procesos de hibridación. Las poblaciones de una especie pueden intercambiar genes en mayor o menor grado, ya sean genes nucleares o de cloroplasto, debido al movimiento de gametos, semillas, individuos juveniles o adultos (Burczyk y Chybicki 2004). El movimiento de genes a través de poblaciones puede promover la recombinación genética y un aumento en la diversidad genética (Rieseberg 1995) ofreciendo ventajas como la capacidad de responder a cambios ambientales, enfermedades, parásitos y

depredadores, en comparación con aquellas poblaciones que presentan niveles bajos de variación genética (Amos y Harwood 1998, Hedrick 2011).

En las plantas, el flujo de genes se produce por dos vías: la dispersión de las semillas y del polen (Petit et al. 2002). Sin embargo, la dispersión de semillas es el único vehículo para la colonización de nuevos hábitats. En cambio, la dispersión del polen puede resultar en mayor medida en procesos de hibridación e introgresión. La hibridación es un proceso natural que ocurre constantemente en las plantas (Harrison 1993), lo cual origina nuevas combinaciones genéticas por la introducción de genes semicompatibles dentro de otro genotipo (Tovar-Sánchez y Oyama 2004). Este proceso es importante, ya que tiene un papel vital en la evolución, por la formación de nuevas especies o el incremento de la variación genética dentro de las mismas (Arnold 1997).

El flujo de genes interespecífico entre dos o más especies de encinos es un fenómeno común ampliamente documentado que a su vez promueve la transferencia de material genético. En la literatura se reporta intercambio de genes entre las especies de encinos cuando las poblaciones naturales de especies de la misma sección del género *Quercus* se encuentran en simpatria (Manos et al. 1999) y la fenología se sobrepone en una misma zona (Whittemore y Schaal 1991, Dumolin-Lapègue et al. 1999, González-Rodríguez et al. 2004, Curtu 2007). Este fenómeno ha quedado sobre todo en evidencia porque las especies de encinos simpátricas por lo general comparten los haplotipos de ADN de cloroplasto a escala regional (Whittemore y Schaal 1991, Dumolin-Lapègue et al. 1995). Dado que los encinos presentan polinización anemófila y que es común encontrar varias especies entremezcladas que conviven de forma natural en diferentes sitios, la variación en la riqueza de especies de encinos en la comunidad local entre sitios podría promover las diferencias en la incidencia, tipos y frecuencia de híbridos (Lagache et al. 2013). Estos individuos híbridos bajo condiciones específicas pueden permanecer y potencialmente retrocruzarse con las especies progenitoras aumentando la diversidad genética (Arnold 1997, Dumolin-Lapègue et al. 1999). El alto número de especies de encinos que conviven de forma natural en diferentes sitios, ofrece una oportunidad para investigar la dinámica del flujo de genes en especies múltiples.

La hibridación ha sido estudiada intensamente en las secciones *Quercus* (blancos) y *Lobatae* (rojos). En general, estos estudios sugieren que los encinos rojos presentan barreras reproductivas entre especies más débiles que los encinos blancos (Kashani y Dodd 2002; Aldrich et al. 2003). Existe poca información sobre la base genética de las diferencias entre especies de encinos rojos y blancos, pero la evidencia hasta la fecha sugiere que el acervo genético de los encinos rojos está pobremente diferenciado (Kashani y Dodd 2002; Aldrich et al. 2003, Valencia-Cuevas et al. 2014).

Es interesante destacar también que la hibridación no sólo depende de las características intrínsecas de las especies involucradas, sino también del ambiente. Particularmente, ha sido documentado que las condiciones del hábitat (Williams y Ehleringer 2000, Williams et al. 2001, Himrane et al. 2004, Lagache et al. 2013), la localización geográfica de la zona de hibridación (Tovar-Sánchez y Oyama 2004), el establecimiento y la supervivencia de los individuos híbridos (Valbuena-Carabana et al. 2007), las diferentes tasas de flujo génico (Curtu et al. 2007), la abundancia relativa, la identidad de las especies (Lepais et al. 2009), la estructura espacial de las especies (Salvini et al. 2009), la proporción de polen de la misma especie y la densidad de individuos disponibles para el apareamiento (Lagache et al. 2013), pueden influir en los niveles de la hibridación y la introgresión en encinos. Además, estudios recientes han informado de que las barreras reproductivas que operan entre las especies de encinos involucrados en eventos de hibridación cambian entre las especies progenitoras, dependiendo de la especie que actúa como materna y la paterna (Curtu et al. 2007, Jensen et al. 2009, Lepais et al. 2009).

Los análisis genéticos de complejos híbridos de encinos han documentado que la hibridación favorece el aumento de los niveles de diversidad genética. Dentro de las áreas simpátricas, la superposición en la fenología de la floración entre encinos es común, lo que favorece al flujo de genes (González-Rodríguez et al. 2005, Tovar-Sánchez et al. 2008). Las especies de encinos en simpatría probablemente intercambian material genético de forma simultánea. Esto sugiere que el aumento en el número de especies de encinos de la misma sección en los sitios de simpatría promoverá un aumento de sus niveles de diversidad genética como resultado de

intercambio genético interespecífico (Valencia-Cuevas *et al.* 2014). Sin embargo, los estudios que se han realizado en sitios donde se localizan más de dos especies de encinos de forma natural, presentan resultados contrastantes (Dodd y Afzal-Rafii 2004, Curtu *et al.* 2007, Lepais *et al.* 2009, Peñaloza-Ramírez *et al.* 2010, Moran *et al.* 2012).

Por ejemplo, Hardin (1975) mostró patrones potenciales de flujo génico e hibridación entre 16 especies de encinos blancos en el Noreste de Estados Unidos, lo cual indica que ninguna de estas especies de encinos se encuentra completamente aislada reproductivamente. Lo anterior sugiere que cuando dos o más especies de encinos de la misma sección se encuentran en simpatria potencialmente puede ocurrir flujo génico entre ellas. Posteriormente, Whittemore y Schaal (1991), examinaron la distribución de haplotipos en poblaciones de especies de encinos blancos en el Noreste de Estados Unidos que se encontraban en simpatria. Según este estudio, encontraron evidencia de flujo de genes entre los individuos de diferentes especies simpátricas, las cuales típicamente comparten un haplotipo común, sobre la base de patrones compartidos de ADN del cloroplasto. El intercambio genético fue mayor entre distintas especies de encinos dentro de la misma área geográfica que entre poblaciones conespecíficas separadas geográficamente. Se ha registrado en estudios de ADNcp poca variación dentro de las poblaciones y una fuerte estructuración entre localidades (Dumolin *et al.* 1995, Grivet *et al.* 2008).

Por otra parte, en un estudio utilizando microsatélites nucleares, Peñaloza-Ramírez *et al.* (2010) analizaron tres especies de encinos mexicanos (*Q. hypoleucoides*, *Q. scytophylla*, y *Q. sideroxylla*) y encontraron que los híbridos y probables triples híbridos son dominantes en las zonas de contacto donde se localizan las tres especies. Otro estudio de cuatro especies de encinos europeos (*Q. robur*, *Q. petraea*, *Q. pyrenaica* y *Q. pubescens*) reportó un porcentaje de híbridos entre 10.7% y el 30.5% en diferentes zonas (Lepais *et al.* 2009). Valencia-Cuevas *et al.* (2014) analizaron a *Q. castanea* en un gradiente de riqueza de encinos rojos, encontrando evidencia de eventos de hibridación e introgresión entre *Q. castanea* y otras tres especies de encinos rojos. En contraste, otros estudios reportan bajos niveles de hibridación. Por ejemplo, un estudio del flujo génico interespecífico entre *Q. robur*, *Q. petraea*,

Q. pubescens y *Q. frainetto* en Rumania reportó un bajo nivel de hibridación variando del 1.7% a 16.7% (Curtu et al. 2007). Burgarella et al. (2009) encontraron que los híbridos entre dos especies de encinos mediterráneos (*Q. suber* y *Q. ilex*) comprenden menos del 2% de los adultos en zonas donde se localizan las dos especies de encinos.

Valencia-Cuevas et al. (2014) utilizaron 14 microsatélites (SSRs) primers (seis nSSRs y ocho cpSSRs) y pusieron en manifiesto que la diversidad genética de las poblaciones *Q. castanea* (sección *Lobatae*) aumenta a medida que el número de especies asociadas de encinos rojos también aumenta en los sitios simpátricos sugiriendo que este resultado es consecuencia del intercambio genético interespecífico. Finalmente Valencia-Cuevas et al. (2015) obtuvieron evidencia genética de que *Q. castanea* está involucrado en eventos de hibridación con *Q. crassipes*, *Q. laurina* y *Q. crassifolia*, tres de las especies de encinos rojos más comunes que conviven con *Q. castanea*. También sugieren que el aumento de la riqueza de especies de encinos rojos en la comunidad local favorece el flujo de genes interespecífico entre *Q. castanea* y las especies asociadas. Asimismo, el intercambio genético que se ha producido entre *Q. castanea* y las tres especies asociadas sugiere que la hibridación posiblemente ha contribuido a los patrones atípicos de variación morfológica foliar observados en poblaciones simpátricas. La variación morfológica atípica se ha observado en otros estudios con especies de encinos que ocurren en simpatria y este hecho por lo general se ha interpretado como el apoyo a la hipótesis de flujo génico interespecífico.

De forma interesante, dichas relaciones entre la diversidad genética intraespecífica y la riqueza de especies a nivel de las comunidades locales ha sido encontrada también en otros grupos de plantas y no únicamente en encinos. Por ejemplo, He et al. (2008) demostraron una covariación positiva entre la diversidad de especies y la diversidad genética de *Banksia attenuata* (Proteaceae). También se observó al nivel de varias comunidades de árboles forestales en Alemania (Wehenkel et al. 2006). Los mecanismos que explican tales relaciones no están aún del todo claro, lo que sugiere la necesidad de realizar mayores estudios al respecto.

1.3 Variación morfológica en los encinos

El estudio de los encinos ofrece un interés particular por tratarse de un grupo taxonómicamente complejo que muestra una gran variación morfológica intraespecífica, causada por factores ambientales y bióticos (Manos et al. 1999). Los encinos se caracterizan por presentar altos niveles de variación morfológica foliar entre poblaciones de una especie (Bruschi et al. 2003); también es posible encontrar variación entre árboles de la misma población y aún entre hojas dentro del mismo individuo. Se considera que los patrones de variación morfológica foliar en gradientes ambientales, son el resultado tanto de respuestas ecológicas como de diferenciación genética entre y dentro poblaciones (Bruschi et al. 2003, González-Rodríguez y Oyama 2005, Warren et al. 2005). Los encinos son notoriamente variables en sus caracteres de la hoja (Bruschi et al. 2003), a pesar de que las hojas se utilizan con frecuencia para las identificaciones.

1.4 Caracteres funcionales

Se ha encontrado que los híbridos entre especies de *Quercus* no necesariamente presentan una morfología intermedia, sino que pueden presentar distintos fenotipos, desde fenotipos similares a los progenitores hasta características intermedias (Rieseberg y Ellstrand 1993). Sin embargo, una alta proporción de individuos híbridos también pueden presentar caracteres extremos o novedosos (Rieseberg et al. 1999). Himrane et al. (2004) realizaron un estudio en la especie con origen híbrido *Quercus subpyreneica* (*Q. faginea* × *Q. pubescens*), en el que los híbridos presentaron mayor área foliar y conductividad hidráulica específica en comparación con sus progenitores; lo cual indica que estos rasgos podrían tener un valor adaptativo (Schwarzbach et al. 2001). Esto sugiere que ciertos rasgos funcionales podrían verse afectados por los procesos de hibridación presentes en los encinos.

El estudio de los rasgos funcionales, es decir “las características morfo-fisio-fenológicas que influyen directa o indirectamente en la adecuación (fitness) de la planta a través de sus efectos sobre el crecimiento, la reproducción y la supervivencia” (Violle et al. 2007), puede aportarnos información relevante sobre la ecología y distribución de las especies. Los

rasgos de hojas, tallos y raíces varían entre las diferentes especies modulando su crecimiento y supervivencia (Ackerly et al. 2000, Westoby et al. 2002). Parte de la variabilidad de estos rasgos está condicionada en gran medida por la historia filogenética de las distintas especies. Así, la caracterización funcional de especies dentro de un mismo linaje evolutivo, nos permite conocer su grado de diversificación funcional y al mismo tiempo comprender las limitaciones morfológicas, fisiológicas o de desarrollo que restringen la variación y evolución de las mismas. Las estrategias ecológicas de las plantas se pueden clasificar de acuerdo con el espectro de variación de sus características funcionales (Díaz et al. 2004, Wright et al. 2004), como la velocidad de crecimiento o la resistencia a factores abióticos, tales como la tolerancia al frío o a la sequía. En las especies de encinos, la hibridación podría estar jugando un papel importante en la variación de rasgos funcionales, debido a que la hibridación favorece el flujo génico interespecífico, provocando el intercambio de genes entre diferentes especies y de forma potencial incrementado la diversidad genética en estas comunidades (Hardin 1975, Whittemore y Schaal 1991, Dumolin-Lapègue et al. 1997).

El estudio de los caracteres (rasgos) de la planta reflejan las estrategias ecológicas de las especies y determinan cómo las plantas responden a factores ambientales, estos caracteres pueden afectar a otros niveles tróficos e influenciar las propiedades de los ecosistemas (Kattge et al. 2011). Hay una creciente evidencia de que la variación en los rasgos de las plantas, dentro y entre las especies, está asociada con muchos procesos ecológicos importantes en un intervalo de escalas. Esto ha dado lugar a una fuerte demanda de formas estandarizadas para medir características ecológicamente significativas de las plantas. Los rasgos de la hoja desempeñan un papel particularmente importante en la asimilación de carbono, las relaciones hídricas y el balance energético (Fonseca et al. 2000). El tamaño de la lámina foliar, la dureza foliar, la calidad nutricional, el contenido de carbono, nitrógeno y fósforo foliar, la tasa fotosintética y la densidad estomática son ejemplos de rasgos funcionales que se encuentran presentes en plantas y estos podrían verse afectados por cambios en la variación genética de las plantas. Durante las últimas décadas se ha estudiado extensivamente la

dinámica de las estrategias funcionales a nivel de la hoja (Ackerly et al. 2002, Wright et al. 2004; Rozendaal et al. 2006, Fyllas et al. 2009). Los efectos de la hibridación sobre caracteres fenotípicos de relevancia ecológica han sido poco estudiados y menos aún en condiciones naturales (Williams y Ehleringer 2000; Himrane et al. 2004). Se encuentra poca información en la literatura sobre las consecuencias que tiene la hibridación sobre los caracteres funcionales de las plantas.

En este estudio se eligieron cinco poblaciones de *Q. crassipes* y cinco poblaciones de *Q. obtusata* en comunidades con distinta diversidad de encinos en Michoacán. Se examinaron los cambios de diversidad genética poblacional a través de las comunidades con distinta diversidad de encinos. Mediante microsatélites de cloroplasto se estimó en cada población la diversidad y la riqueza de haplotipos, así como otros descriptores de la variación genética. Los microsatélites de cloroplasto resultan muy útiles ya que el ADN de cloroplasto es una molécula no recombinante y por lo tanto todos sus loci están ligados (Navascués y Emerson 2005). Estos marcadores se han utilizado exitosamente en el estudio de estructura genética de poblaciones y filogeografía (Petit et al. 2002, Afzal-Raffi y Dodd 2007), y en algunos casos se ha encontrado que son de mayor utilidad que otros marcadores para este tipo de estudios debido a sus altos niveles de variación.

Además se examinó la variación de caracteres funcionales de acuerdo a la diversidad genética poblacional a través de las comunidades con distinta diversidad de encinos. Los caracteres funcionales estimados en cada población fueron: el contenido de clorofila, el peso seco foliar, el grosor foliar, el área foliar, el área foliar específica, la densidad foliar y la densidad estomática. Las preguntas específicas que se plantean en este trabajo son: i) ¿La diversidad genética poblacional de *Q. crassipes* o *Q. obtusata* cambiará a través del gradiente de riqueza de especies de encinos de la misma sección? ii) ¿Los cambios en los patrones de diversidad genética de *Q. crassipes* o *Q. obtusata* estarán relacionados con la variación en los caracteres funcionales a través de las comunidades con distinta diversidad de encinos?

2. HIPÓTESIS

1. La variación genética poblacional de *Q. crassipes* y *Q. obtusata* está directamente relacionada con la diversidad de especies de encinos a nivel local en las comunidades en las que se encuentran estas especies.
2. La variación de caracteres funcionales de *Q. crassipes* y *Q. obtusata* se incrementara con la mayor diversidad de especies de encinos y con la diversidad genética poblacional.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar la relación entre la diversidad de especies de encinos con los niveles de variación genética poblacional y de los caracteres funcionales de *Q. crassipes* y *Q. obtusata* en comunidades locales.

3.2 Objetivos particulares

1. Determinar si la variación genética poblacional de *Q. crassipes* y *Q. obtusata* es afectada por la diversidad de especies de encinos a nivel local en las comunidades en las que se encuentran estas especies.
2. Determinar si la variación de caracteres funcionales de *Q. crassipes* y *Q. obtusata* es afectada por la diversidad de especies de encinos y por la diversidad genética poblacional.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Descripción de las especies de estudio

Quercus crassipes Humb. & Bonpl. 1809. Sección *Lobatae* (encinos rojos). Es un árbol de 10 a 35 m de altura y con diámetro del tronco de 15 a 100 cm. Presenta una corteza color pardo oscura con placas alargadas, la hoja es caducifolia con forma elíptica o lanceolada de 2.5 a 14 cm de largo por 0.6 a 4.0 cm de ancho; margen revoluto; haz verde grisáceo o verde oscuro y lustroso; envés amarillento grisáceo cubierto con un tomento persistente. Su fruto es bianual, solitario o en pares; la bellota es ovoide de 10 a 21 mm de largo por 12 a 14 mm de diámetro; se producen de octubre a enero. Florece en Mayo. La distribución geográfica en México abarca los estados de Colima, D.F, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tlaxcala y Michoacán, en altitudes en un intervalo de 1100-2800 msnm. Esta especie está amenazada por la transformación de su hábitat por tala y cultivo (Arizaga et al. 2009) (Figura 1).

Quercus obtusata Humb. & Bonpl. 1809. Sección *Quercus* (encinos blancos). Es un árbol de 3 a 20 m de altura y con diámetro del tronco de 10 a 60 cm; presenta una corteza gris y escamosa, la forma de la hoja es obovada o elíptica, con margen con 4 a 8 dientes a cada lado; haz verde, lustroso y tomentoso en la base; envés verde amarillento con pubescencia. Su fruto es anual, producido en grupos de 2 o 3; bellota ovoide. Florece de Abril a Mayo. La distribución geográfica en México abarca los estados de Aguascalientes, D.F, Durango, Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tlaxcala, Veracruz, Zacatecas y Michoacán en altitudes de 620-2800 msnm. No amenazado (Arizaga et al. 2009) (Figura 2).



Figura 1. Ejemplar de *Quercus crassipes*



Figura 2. Ejemplar de *Quercus obtusata*

4.2 Determinación de la diversidad de especies de encinos en los sitios

En Michoacán están presentes aproximadamente 30 especies de encinos (Arizaga et al. 2009). Con base en la superposición de los mapas de distribución potencial de las 30 especies se caracterizó un gradiente de riqueza de encinos en el estado de Michoacán (Figura 3; Rodríguez-Correa et al. en prensa). Además, se identificó a *Quercus crassipes* (encino rojo) y *Q. obtusata* (encino blanco) como especies representadas en comunidades con distinta riqueza de especies del género, desde sitios donde forman bosques mono específicos hasta en los que coexisten con otras seis especies de encinos.

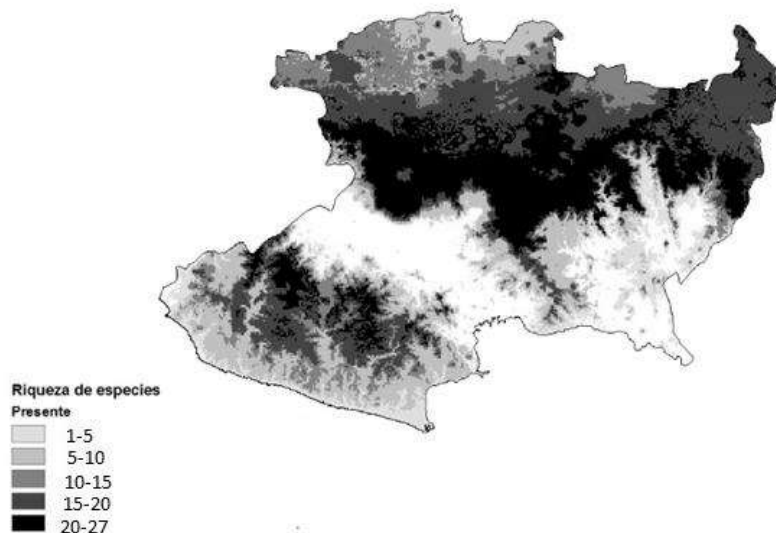


Figura 3. Mapa del gradiente de riqueza de especies de encinos en Michoacán. Tomado de Rodríguez-Correa H. et al. en prensa.

A lo largo del gradiente de riqueza de especies de encinos en Michoacán, se eligieron cinco poblaciones de *Q. crassipes* y cinco poblaciones de *Q. obtusata* (Figura 4). En la Tabla 1 se presenta la ubicación geográfica, la altitud, la temperatura media anual (TMA; °C) y la precipitación anual (PA, mm) de cada localidad, tomados del sitio WorldClim (<http://www.worldclim.org/>; Hijmans et al. 2005). Además se obtuvieron otras 17 variables bioclimáticas para cada sitio (Hijmans et al. 2005; datos no mostrados).

Para determinar en el campo la riqueza y diversidad de especies que coexisten con las especies de interés (*Q. crassipes* o *Q. obtusata*) en cada sitio, se realizaron tres transectos aleatoriamente colocados de 100 m de largo y 20 m de ancho, en los que se censaron todos los árboles de las especies de encinos presentes. Se identificaron las especies que fueron posibles en el sitio de muestreo. Sin embargo, para los individuos con identidad dudosa se colectaron ejemplares herborizados para posteriormente realizar su identificación taxonómica, cotejándola en el herbario. Con base en la información obtenida de los transectos realizados para caracterizar cada sitio de muestreo, se obtuvieron la riqueza total de especies de encinos presentes en la comunidad, el índice de diversidad total de Shannon, la riqueza y el índice

de diversidad de Shannon por secciones (*Lobatae* y *Quercus*) y la densidad de individuos.

Tabla 1. Especie, localidad de muestreo, ubicación geográfica, altitud, Temperatura Media Anual (TMA) y Precipitación Anual (PA).

ESPECIE	SITIO	LATITUD (N)	LONGITUD (W)	ALTITUD (msnm)	TMA (°C)	PA (mm)
<i>Q. crassipes</i>	Ejido San Lázaro	19°27'	101°36'	2355	14.6	1199
	Cuanajo	19°28'	101°28'	2426	14.3	1229
	La Paloma	19°25'	101°16'	1991	16.4	1148
	San Nicolás de Obispo	19°37'	101°20'	2488	15.1	1085
	Remolino	19°37'	101°22'	2766	12.5	1314
<i>Q. obtusata</i>	Uruapan	19°25'	102° 5'	1973	16.2	1219
	Umécuaro	19°32'	101°15'	2135	16.5	1005
	Cuanajo	19°28'	101°28'	2426	14.3	1229
	San Miguel del Monte	19°36'	101° 9'	2250	15.3	1087
	Atécuaro	19°42'	101°16'	2122	17.2	811

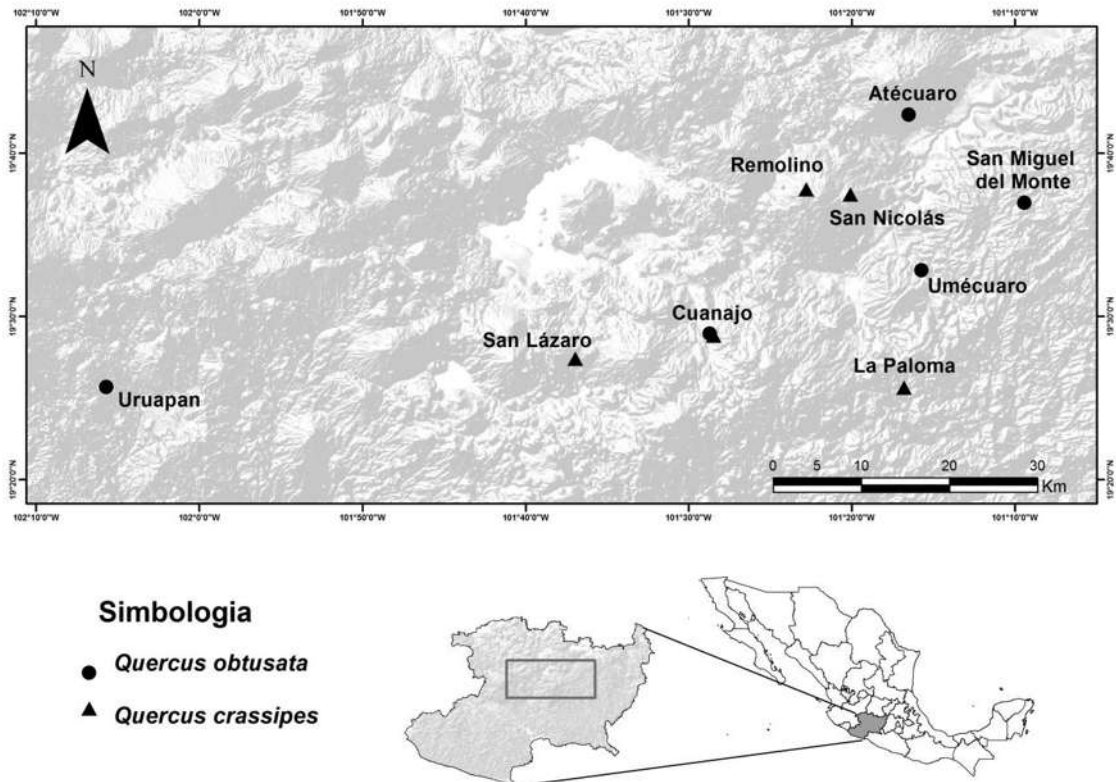


Figura 4. Ubicación de los sitios de muestreo en Michoacán.

4.3 Análisis de los caracteres funcionales

Se colectaron entre 20 y 30 individuos de *Q. crassipes* y *Q. obtusata* (el número de individuos estuvo sujeto a la abundancia de la especie en cada sitio) en cada uno de los cinco sitios previamente seleccionados a lo largo del gradiente de riqueza de especies, obteniendo en total 129 individuos de *Q. crassipes* y 139 individuos de *Q. obtusata*. Los caracteres que se midieron en cada individuo fueron el diámetro a la altura del pecho (DAP), el contenido de clorofila, el peso seco foliar, el grosor foliar, el área foliar, el área foliar específica, la densidad foliar y la densidad estomática. Estos caracteres están relacionados con la capacidad fotosintética, el crecimiento, el uso del agua, la tolerancia a la sequía y el uso de nutrientes (Bongers y Popma 1990, Lamont et al. 2002).

En campo se obtuvo para cada individuo el DAP con un flexómetro, así como el contenido de clorofila mediante lecturas tomadas en tres hojas por individuo con un medidor de clorofila portátil SPAD 502 (Minolta). Por otra parte, para cada individuo se tomaron varias ramas por individuo para posteriormente prensarlas y colocarlas en una secadora botánica aproximadamente por una semana. El peso seco se obtuvo pesando las hojas en una balanza analítica. El grosor foliar se obtuvo con un calibrador vernier. Para medir el área foliar se realizó un análisis digital de las hojas escaneadas, utilizando el programa ImageJ versión 1.48 (Rasband 2007). El área foliar específica se obtuvo como el cociente entre el área foliar y el peso seco. La densidad foliar se obtuvo como el cociente entre el área foliar específica y el grosor. La densidad estomática se obtuvo en cinco individuos por población, utilizando tres hojas por individuo. Las hojas fueron recubiertas con barniz de uñas transparente en su superficie abaxial, se removió la capa al secarse el barniz obteniendo una impresión epidérmica de la hoja, la cual fue montada en un portaobjetos. Se observaron tres campos de la impresión en un microscopio óptico compuesto con cámara integrada para ser fotografiadas con el objetivo 40X. La densidad de estomas se contó en el programa ImageJ versión 1.48 (Rasband 2007).

4.4 Análisis de diversidad genética

Para cada individuo de las especies de interés (*Q. crassipes* y *Q. obtusata*) se colectaron hojas jóvenes sin daño aleatoriamente de árboles adultos con una separación mínima de 20 m para evitar muestrear individuos relacionados. Las hojas se colocaron en bolsas de plástico en hielo y posteriormente se almacenaron en el laboratorio a -80°C.

La extracción de ADN se realizó a partir de 100 mg de tejido foliar que se maceró con nitrógeno líquido para obtener un polvo fino. Se continuó con un protocolo de CTAB modificado; que consiste en dos lavados con buffer 1 (Tris HCl 100 mM pH 8, NaCl 0.45 M, EDTA 17 mM pH8, CTAB 1%, 0.3% β-mercaptoetanol), y dos lavados con buffer 2 (Tris HCl 100 mM pH 8, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM pH8, CTAB 2%, 0.3% β-mercaptoetanol). Posteriormente la mezcla, se incubó a 65 °C en un termoblock por 20 min, se agregó 600 µL de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1 y se provocó un choque de temperaturas pasándolo a hielo por 5 min. Se centrifugó a 9000 rpm por 15 min, en un tubo nuevo se recuperó 400 µL del sobrenadante y se prosiguió con la precipitación del ADN agregando 800 µL de isopropanol frío a -20 °C. Se centrifugó a 9000 rpm por 5min, se eliminó el sobrenadante y se obtuvo la pastilla de ADN. Se agregó 800 µL de etanol al 70% a -20 °C, se centrifugó a 7000 rpm por 7 min y se eliminó el sobrenadante. En la secadora de vacío por 30 min se secó la pastilla y después se rehidrató con 75 µL de agua desionizada. Para la cuantificación de ADN de las muestras se utilizó un instrumento NanoDrop 2000 el cual calcula la concentración de ADN por absorbancia. Se obtuvieron cantidades de ADN que oscilaron entre 35 y 304 ng/µL.

Para determinar los primers a utilizar y las temperaturas de amplificación que se utilizaron se realizaron reacciones de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) en un gradiente de temperaturas de 40 a 60 °C. Las reacciones se llevaron a cabo utilizando el kit Multiplex Platinum (Invitrogen) en un volumen final de 6 µL (3 µL de Platinum, 0.1 µL de Mg, 0.5 µL de primer, 1.4 µL de agua, 1 µL de ADN). Se probaron 13 microsatélites de cloroplasto caracterizados para la familia Fagaceae: cmcs2, cmcs3, cmcs4, cmcs5, cmcs10, cmcs12 (Sebastiani *et al.* 2004), udt1, udt3, udt4, ucd4, ucd5, ukk3,

ukk4 (Deguilloux *et al.* 2003). Como marcadores moleculares para *Q. crassipes* fueron seleccionados cinco microsatélites de cloroplasto polimórficos: cmcs3, cmcs5, cmcs12 (Sebastiani *et al.* 2004), udt1 y ucd4 (Deguilloux *et al.* 2003). En el caso de *Q. obtusata* se seleccionaron cuatro microsatélites de cloroplasto polimórficos: cmcs3, cmcs12 (Sebastiani *et al.* 2004) udt1 y ucd4 (Deguilloux *et al.* 2003).

El programa final del termociclador constó de un paso de desnaturalización a 94 °C durante 4 min, y después de 35 ciclos, cada uno con un paso de desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento a 52 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 1 min. Se incluyó un paso de extensión final a 72 °C por 10 min. Los productos de PCR se diluyeron con agua en una proporción 1:10 y se prepararon para su análisis en un secuenciador automático agregando 1 µL de esta dilución en una placa para secuenciador, adicionando 0.4 µL de LIZ 600 (Applied Biosystems) como marcador interno de tamaño molecular y 9 µL de HiDi formamida. Previamente a su análisis, las muestras fueron desnaturalizadas por 5 min a 95° C y transferidas a un secuenciador ABI prism Hitachi, 3100- Avant Genetic Analyzer equipado con 16 capilares y un polímero POP-6 (Applied Biosystems). Los fragmentos fueron analizados y medidos con el programa Peak Scanner versión 1.0 (Applied Biosystems).

4.5 Análisis de datos

Se obtuvo el promedio y el coeficiente de variación (CV) por población para los valores del grosor foliar, el peso seco foliar, el área foliar, el área foliar específica, la densidad foliar, el contenido de clorofila y la densidad de estomas por población. Se realizó un análisis de componentes principales para determinar la asociación entre los siete caracteres medidos; a partir de este análisis se obtuvo el promedio y el CV de los tres primeros componentes principales.

Se asignaron como haplotipos cada una de las combinaciones diferentes de tamaños (alelos) en los cinco loci utilizados para *Q. crassipes* y los cuatro loci utilizados para *Q. obtusata*. Como estimadores de la variación genética, en cada población se estimó el número de haplotipos (A), el número de haplotipos privados (P), el número efectivo de haplotipos (Ne), la riqueza haplotípica

(estimada mediante el método de rarefacción; R_h), el índice de diversidad genética (H_e) y la distancia genética media entre los individuos (D^2_{sh}) mediante el programa Haplotype analysis versión 1.05 (Eliades y Eliades 2009).

Para evaluar si las variables climáticas tienen una influencia sobre la variabilidad de los caracteres funcionales y sobre la variación genética, se obtuvieron para cada sitio de muestreo datos climáticos a partir de las 19 variables bioclimáticas disponibles en WorldClim y posteriormente eliminando las variables redundantes a partir de los resultados de un análisis de correlación pareado (el criterio fue eliminar una variable de cada par con una $r > 0.8$ reteniendo la variable más general). Las variables seleccionadas fueron la temperatura media anual, la precipitación anual, la temperatura mínima del mes más frío, la isothermalidad, el intervalo diurno de la temperatura, la estacionalidad de la precipitación y la precipitación del trimestre más húmedo.

Se realizaron regresiones lineales en el programa JMP 9 (SAS Institute 2005) para determinar si existe relación entre los índices de riqueza y diversidad de especies de encinos en las comunidades locales, con los valores del CV de los caracteres funcionales medidos por población y los estimadores de diversidad genética. De igual forma, se usaron regresiones lineales para investigar la relación de las variables climáticas con los valores del CV de los caracteres funcionales medidos por población y el CV de los tres primeros componentes principales. Finalmente, para evaluar si existe asociación entre los estimadores de diversidad genética con los valores del CV de los caracteres funcionales medidos por población y el CV de los tres primeros componentes principales, se realizaron regresiones lineales.

5. RESULTADOS

En la Tabla 2 se muestran los valores de densidad y diversidad de la comunidad de especies de encinos para cada uno de los cinco sitios muestreados por especie focal (*Quercus crassipes* y *Quercus obtusata*) ordenados de menor a mayor riqueza de especies de encinos. Se encontraron nueve especies de encinos (*Q. candicans*, *Q. castanea*, *Q. conspersa*, *Q. crassipes*, *Q. deserticola*, *Q. laeta*, *Q. magnoliifolia*, *Q. obtusata* y *Q. rugosa*) en las 10 comunidades de especies muestreadas.

Tabla 2. Densidad y diversidad de la comunidad de encinos en los cinco sitios muestreados por especie focal, (*Quercus crassipes* y *Quercus obtusata*).

ESPECIE	SITIO	RIQUEZA TOTAL	SHANNON TOTAL	RIQUEZA LOBATAE	SHANNON LOBATAE	RIQUEZA QUERCUS	SHANNON QUERCUS	DENSIDAD ind/m ²
<i>Q. crassipes</i>	Ejido San Lázaro	2	0.64	1	0	1	0	240
	Cuanajo	3	0.96	1	0	2	0.55	58
	La Paloma	5	1.48	4	1.28	1	0	172
	SON	6	1.04	3	0.74	3	0.77	275
	Remolino	6	1.39	3	0.98	3	0.36	90
<i>Q. obtusata</i>	Uruapan	2	0.44	1	0	1	0	103
	Umécuaro	2	0.59	1	0	1	0	158
	Cuanajo	3	0.96	1	0	2	0.55	58
	SMM	3	0.72	1	0	2	0.08	132
	Atécuaro	5	1.28	1	0	4	1.17	304

5.1 Caracteres funcionales de *Q. crassipes* y *Q. obtusata*

Los caracteres con mayor coeficiente de variación en los individuos de *Q. crassipes* fueron el peso seco foliar y el área foliar; cabe resaltar que los mayores valores del CV se encontraron en el sitio de Cuanajo. Los caracteres menos variables en las poblaciones de *Q. crassipes* fueron la cantidad de clorofila (CV 5.5-11.6%) y la densidad promedio de estomas (CV 1.9-14.6%). Cabe destacar que el sitio de *Q. crassipes* con menor riqueza de especies fue el Ejido San Lázaro (ESL). Este sitio presentó la menor variación en la cantidad de clorofila y en la densidad promedio de estomas; además para el resto de los caracteres medidos este sitio no presentó los mayores valores de CV, a excepción de la densidad foliar (32.9%) (Tabla 3).

En los individuos de *Q. obtusata* se encontró igualmente que los caracteres de mayor variación fueron el peso seco foliar y el área foliar, así como los caracteres menos variables fueron la cantidad de clorofila y la densidad promedio de estomas. Uruapan, uno de los sitios con menor riqueza de especies, presentó los mayores valores de CV para el peso seco foliar (60.9%) y el área foliar (56.8%) (Tabla 3).

Tabla 3. Sitios muestreados para *Quercus crassipes* y *Quercus obtusata* ordenados de menor a mayor riqueza de especies de encinos en la comunidad. Se presentan las medias de cada carácter funcional, en negrita se resaltan la menor y la mayor media entre los cinco sitios. Entre paréntesis se reportan los valores del coeficiente de variación (CV) de cada carácter funcional, subrayando el menor y el mayor CV entre los cinco sitios.

ESPECIE	SITIO	GROSOR FOLIAR (mm)	PESO SECO FOLIAR (g)	AREA FOLIAR (cm ²)	AREA FOLIAR ESPECIFICA (cm ² /g)	DENSIDAD FOLIAR (cm ² /g/mm)	CLOROFILA (SPAD)	DENSIDAD ESTOMATICA (estomas/mm ²)
<i>Q. crassipes</i>	ESL	0.37 (18.64)	0.19 (42.63)	15.2 (38.4)	82.6 (16.4)	236.9 (<u>32.9</u>)	47.3 (<u>5.5</u>)	404 (<u>1.9</u>)
	Cuanajo	0.53 (17.10)	0.15 (<u>54.51</u>)	11.0 (<u>52.2</u>)	73.7 (17.5)	144.7 (27.8)	47.0 (11.6)	376 (14.6)
	La Paloma	0.55 (11.78)	0.15 (<u>36.06</u>)	13.7 (<u>33.7</u>)	90.2 (15.4)	167.2 (<u>23.9</u>)	44.4 (6.9)	422 (9.3)
	SNO	0.49 (16.13)	0.11 (52)	10.0 (47.7)	89.6 (16.7)	190.3 (28.7)	47.0 (7.8)	383 (8.0)
	Remolino	0.33 (<u>19.96</u>)	0.12 (54.22)	10.0 (43.9)	86.8 (<u>16.1</u>)	279.7 (31.3)	48.8 (8.7)	387 (9.9)
<i>Q. obtusata</i>	Uruapan	0.67 (<u>23.47</u>)	0.62 (<u>60.93</u>)	54.7 (<u>56.8</u>)	90.7 (13.7)	144.6 (<u>32.2</u>)	41.7 (<u>6.8</u>)	613 (7.9)
	Umécuaro	0.66 (18.63)	0.54 (<u>39.17</u>)	42.6 (<u>34.2</u>)	81.9 (14.0)	131.9 (32.1)	45.0 (10.0)	686 (<u>10.3</u>)
	Cuanajo	0.68 (20.89)	0.53 (49.17)	37.5 (43.0)	72.9 (13.7)	113.4 (30.6)	45.5 (<u>10.4</u>)	710 (<u>3.1</u>)
	SMM	0.62 (<u>17.46</u>)	0.52 (42.78)	40.7 (35.0)	81.6 (<u>14.5</u>)	137.8 (<u>29.9</u>)	44.0 (7.8)	755 (4.7)
	Atécuaro	0.70 (22.57)	0.47 (49.27)	34.3 (44.9)	75.0 (<u>13.1</u>)	113.5 (31.3)	44.0 (9.3)	660 (7.9)

El análisis de componentes principales (ACP) realizado para los caracteres funcionales analizados en las cinco poblaciones por especie focal se muestra en la Figura 5. Los dos primeros ejes explicaron la mayor parte de la varianza 69.57% en *Q. crassipes* y 81.43% en *Q. obtusata*.

En la Figura 5a se muestran las cinco poblaciones de *Q. crassipes*. La población de Remolino tiende a separarse sobre el eje X que corresponde al CP1 (Área Foliar Específica, Densidad Foliar). Las poblaciones de San Nicolás de Obispo y La Paloma se encuentran mezcladas sin una separación evidente. La población de Cuanajo tiende agruparse sobre el eje Y en la parte posterior

que corresponde al CP2 (Grosor foliar). En el caso del Ejido San Lázaro, la población tiende a separarse sobre el eje Y en la parte superior (Área Foliar Especifica, Densidad Foliar, Área foliar, Peso seco foliar).

En la Figura 5b se muestran las cinco poblaciones de *Q. obtusata*. Las poblaciones de Atécuaro y Cuanajo tienden agruparse sobre el eje Y en la parte posterior (Clorofila). La población de Uruapan tiende a separarse sobre el eje Y en la parte superior (Área Foliar Especifica, Densidad Foliar, Área foliar, Peso seco foliar). Las poblaciones de Umécuaro y San Miguel del Monte se encuentran mezcladas sin una separación evidente.

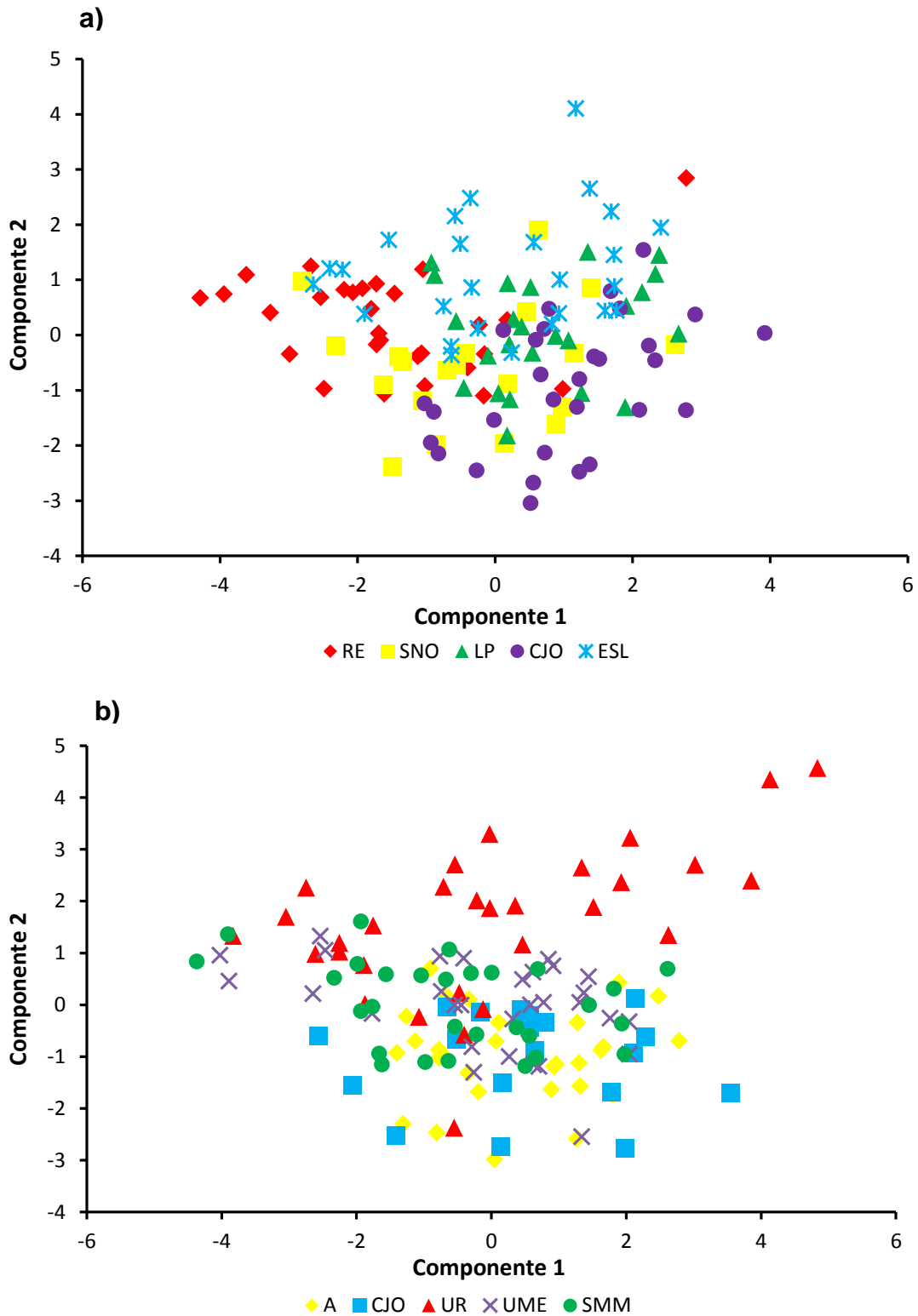


Figura 5. Representación de los ejes Componente 1 y Componente 2 obtenidos del análisis de componentes principales de los caracteres funcionales: **a)** poblaciones muestreadas para *Q. crassipes*; Remolino (Re), San Nicolás de Obispo (SNO), La Paloma (LP), Cuanajo (CJO) y Ejido San Lázaro (ESL). **b)** poblaciones muestreadas para *Q. obtusata*; Atécuaro (A), Cuanajo (CJO), Uruapan (UR), Umécuaro (UME) y San Miguel del Monte (SMM).

5.2 Diversidad genética de *Q. crassipes* y *Q. obtusata*

Los resultados del análisis realizado utilizando los microsatélites de cloroplasto mostró un total de 16 haplotipos en las cinco poblaciones de *Q. crassipes* y 22 haplotipos en las cinco poblaciones de *Q. obtusata*. En las poblaciones muestreadas de *Q. crassipes* el número de haplotipos (A) estuvo entre 3 y 6; la riqueza haplotípica (Rh) osciló entre 1.42 y 4.83, el índice de diversidad genética (He) fue de 0.16 a 0.65, mientras que la distancia genética promedio entre los individuos (D^2sh) fue de 0.05 a 1.35. Las poblaciones que mostraron mayor diversidad genética son el Ejido San Lázaro y La Paloma (Tabla 4).

Para las poblaciones muestreadas de *Q. obtusata* el número de haplotipos encontrado fue de 3 a 8; la riqueza haplotípica osciló entre 1.76 y 5.57, el índice de diversidad genética fue de 0.20 a 0.78, mientras que la distancia media genética entre los individuos fue de 0.10 a 2.11. Las poblaciones que mostraron mayor diversidad genética son Atécuaro y Uruapan (Tabla 4).

Tabla 4. Estimadores de diversidad genética de las poblaciones de *Q. crassipes* y *Q. obtusata*. Número de haplotipos (A), número de haplotipos privados (P), número efectivo de haplotipos (Ne), riqueza haplotípica estimada mediante el método de rarefacción (Rh), el índice de diversidad genética (He) y la distancia media genética entre los individuos (D^2sh).

ESPECIE	SITIO	A	P	Ne	Rh	He	D^2sh
<i>Q. crassipes</i>	Ejido San Lázaro	6	4	2.64	3.72	0.65	0.71
	Cuanajo	3	2	1.19	1.42	0.16	0.43
	La Paloma	6	3	2.45	4.83	0.63	1.35
	San Nicolás de Obispo	3	0	1.27	2.00	0.23	0.05
	Remolino	4	2	1.74	2.79	0.45	0.23
<i>Q. obtusata</i>	Uruapan	7	3	3.08	4.28	0.70	0.66
	Umécuaro	4	1	1.24	1.76	0.20	0.10
	Cuanajo	3	3	1.44	2.00	0.32	0.16
	SMM	7	4	1.90	4.14	0.49	0.31
	Atécuaro	8	4	4.04	5.57	0.78	2.11

5.3 Correlaciones de la diversidad de encinos en las comunidades, las variables climáticas y los estimadores de diversidad genética con los caracteres funcionales.

5.3.1 *Quercus crassipes*

No se encontraron correlaciones significativas entre los CV de los caracteres funcionales evaluados y ninguno de los índices de riqueza y diversidad de especies de encinos en las comunidades locales. Por otra parte se encontraron correlaciones significativas entre el CV del grosor foliar y la temperatura media anual y la temperatura mínima del mes más frío ($R^2 = 0.83$; $P = 0.031$ y $R^2 = 0.88$; $P = 0.018$, respectivamente), así como entre el CV del CP1 y la estacionalidad de la precipitación ($R^2 = 0.93$; $P = 0.008$), y el CV del CP2 y la isothermalidad ($R^2 = 0.87$; $P = 0.021$) (Figura 6a-6d).

Por otra parte, se encontraron relaciones negativas significativas entre el índice de diversidad de Shannon de los encinos blancos (sección *Quercus*) presentes en las comunidades y el número de haplotipos ($R^2 = 0.94$; $P = 0.007$), el número de haplotipos privados ($R^2 = 0.87$; $P = 0.021$), el número efectivo de haplotipos ($R^2 = 0.91$; $P = 0.011$), la riqueza haplotípica ($R^2 = 0.78$; $P = 0.046$), y el índice de diversidad genética ($R^2 = 0.88$; $P = 0.018$) (Figura 7a-7e). En otras palabras, entre mayor sea la diversidad de especies de encinos blancos en las comunidades, las poblaciones de *Q. crassipes* presentan menor diversidad genética.

Finalmente, se encontraron relaciones negativas significativas entre la riqueza haplotípica y el CV del peso seco foliar ($R^2 = 0.86$; $P = 0.023$), y el CV del área foliar ($R^2 = 0.99$; $P = 0.0003$), así como entre el índice de diversidad genética y el CV del área foliar ($R^2 = 0.91$; $P = 0.012$), y entre la distancia genética media entre los individuos y el CV del peso seco foliar ($R^2 = 0.83$; $P = 0.030$) (Figura 8a-8d).

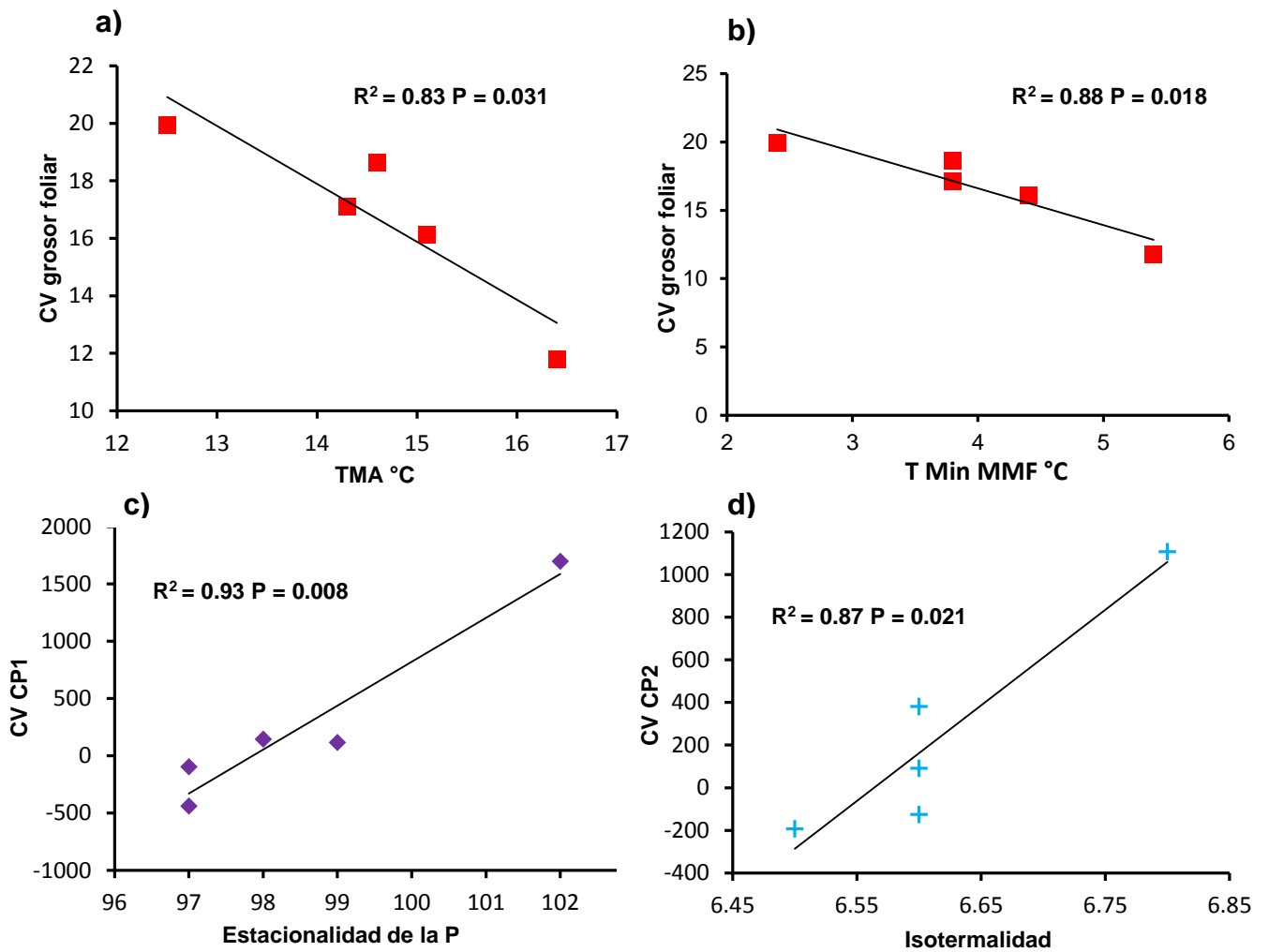


Figura 6. Variación de caracteres funcionales relacionados con variables climáticas de las poblaciones de *Q. crassipes*: **a)** coeficiente de variación del grosor foliar y la temperatura media anual **b)** coeficiente de variación del grosor foliar y la temperatura mínima del mes más frío **c)** coeficiente de variación del componente principal uno y la estacionalidad de la precipitación **d)** coeficiente de variación del componente principal dos y la isotermalidad.

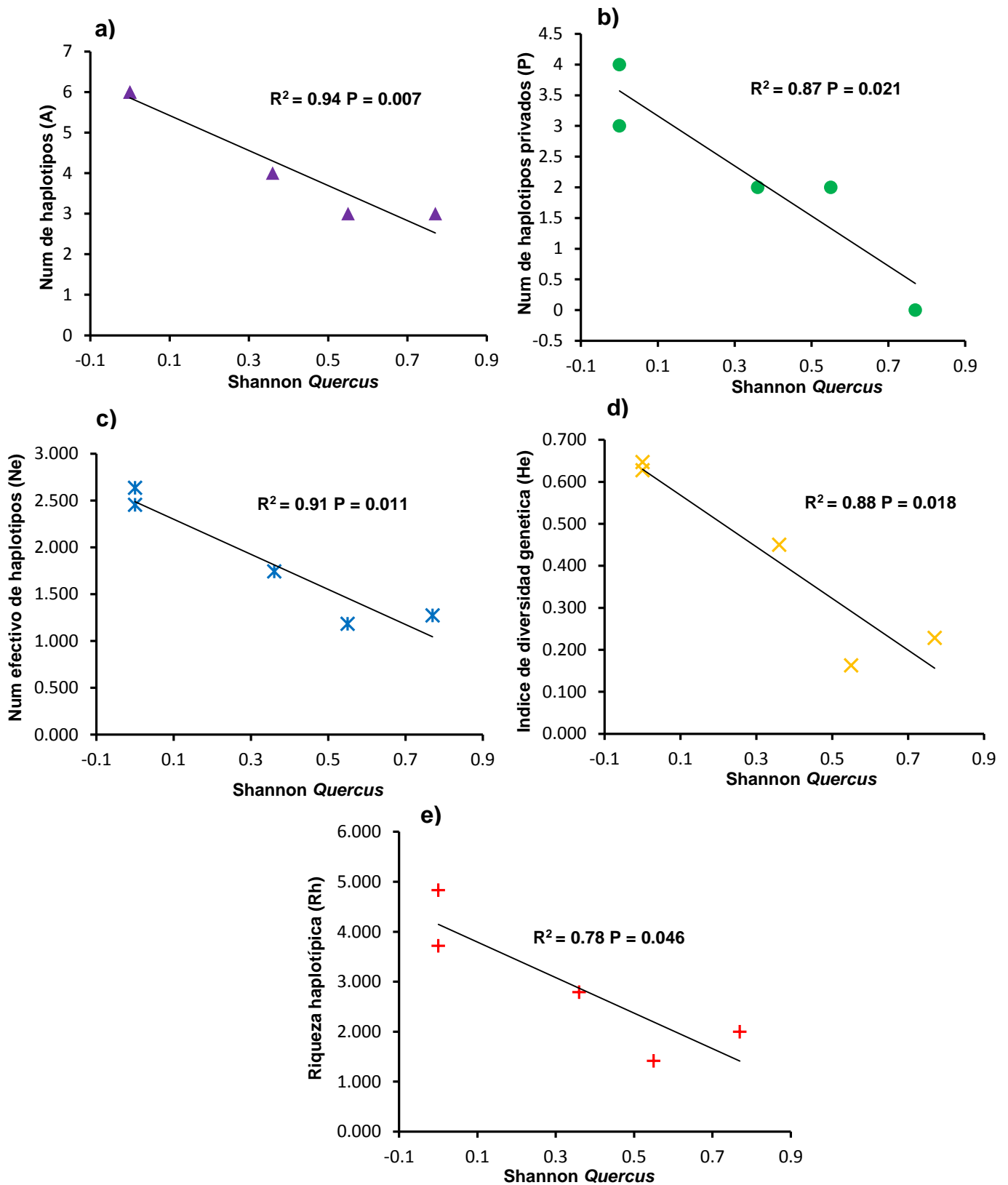


Figura 7. Estimadores de la diversidad genética relacionados con la estructura de la comunidad de las poblaciones de *Q. crassipes*: **a)** número de haplotipos y el índice de Shannon sección *Quercus* **b)** número de haplotipos privados y el índice de Shannon sección *Quercus* **c)** número efectivo de haplotipos y el índice de Shannon sección *Quercus* **d)** índice de diversidad genética y el índice de Shannon sección *Quercus* **e)** riqueza haplotípica rarefacción y el índice de Shannon sección *Quercus*.

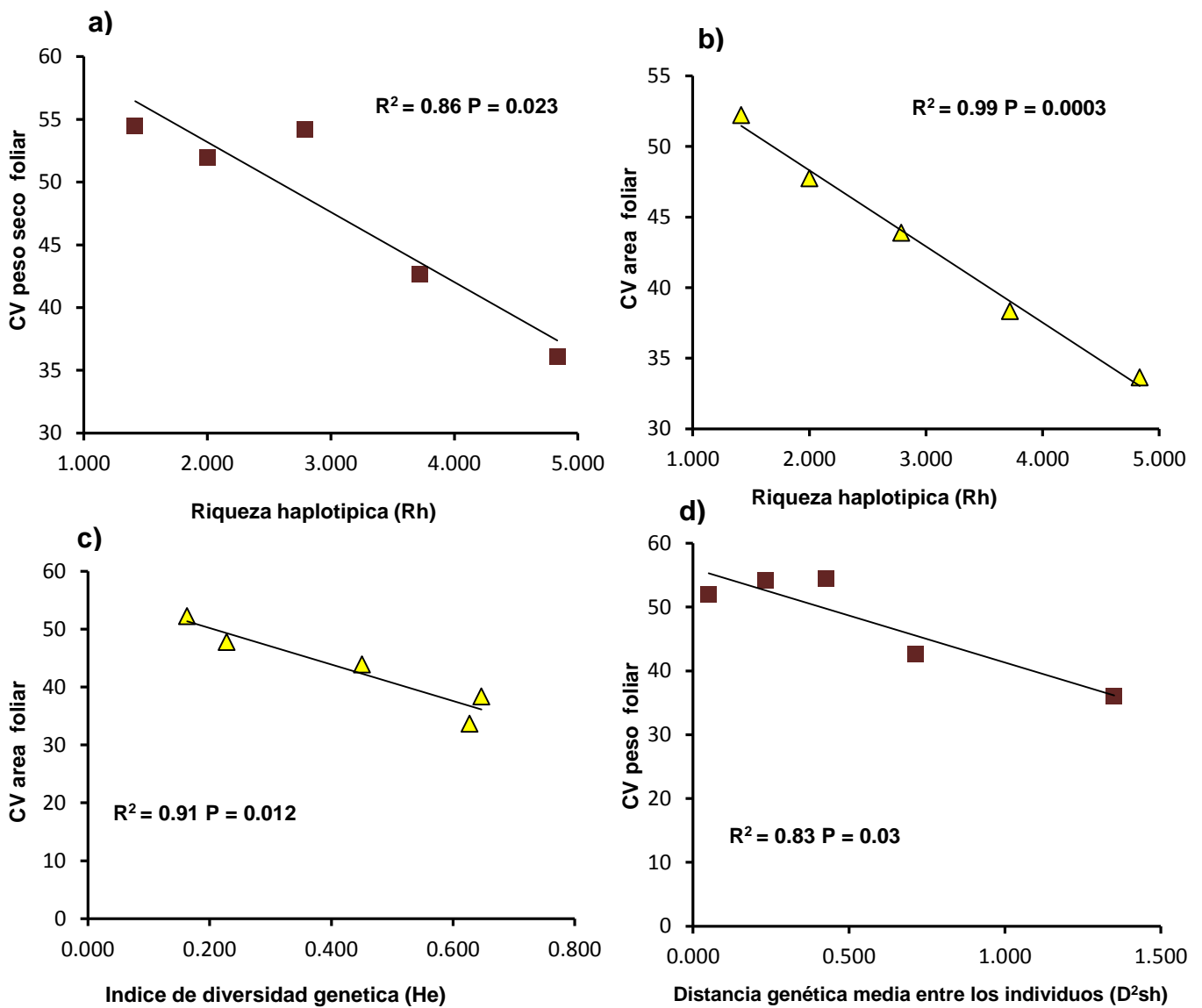


Figura 8. Variación de caracteres funcionales relacionados con los estimadores de la diversidad genética de las poblaciones de *Q. crassipes*: **a)** coeficiente de variación del peso seco foliar y la riqueza haplotípica **b)** coeficiente de variación del área foliar y la riqueza haplotípica **c)** coeficiente de variación del área foliar y el índice de diversidad genética **d)** coeficiente de variación del peso seco foliar y la D²sh.

5.3.2 *Quercus obtusata*

Los resultados no mostraron correlaciones significativas entre los CV de los caracteres funcionales evaluados y ninguno de los índices de riqueza y diversidad de especies de encinos en las comunidades locales. Se encontraron correlaciones significativas entre el CV del CP3 y la temperatura mínima del mes más frío ($R^2 = 0.90$; $P = 0.012$), entre el CV del CP1 y la precipitación del trimestre más húmedo ($R^2 = 0.95$; $P = 0.004$), entre la estacionalidad de la precipitación y el CV del peso seco foliar ($R^2 = 0.88$; $P = 0.018$) y el CV del área foliar ($R^2 = 0.90$; $P = 0.013$), y entre el CV de la densidad foliar y el intervalo de temperatura media diurna (variación de la temperatura que ocurre de la máxima a la mínima a lo largo de un día) ($R^2 = 0.82$; $P = 0.036$) (Figura 9a- 9e).

Por su parte, se encontró una relación significativa positiva entre el número de haplotipos privados y el CV del CP2 ($R^2 = 0.88$; $P = 0.018$) (Figura 10).

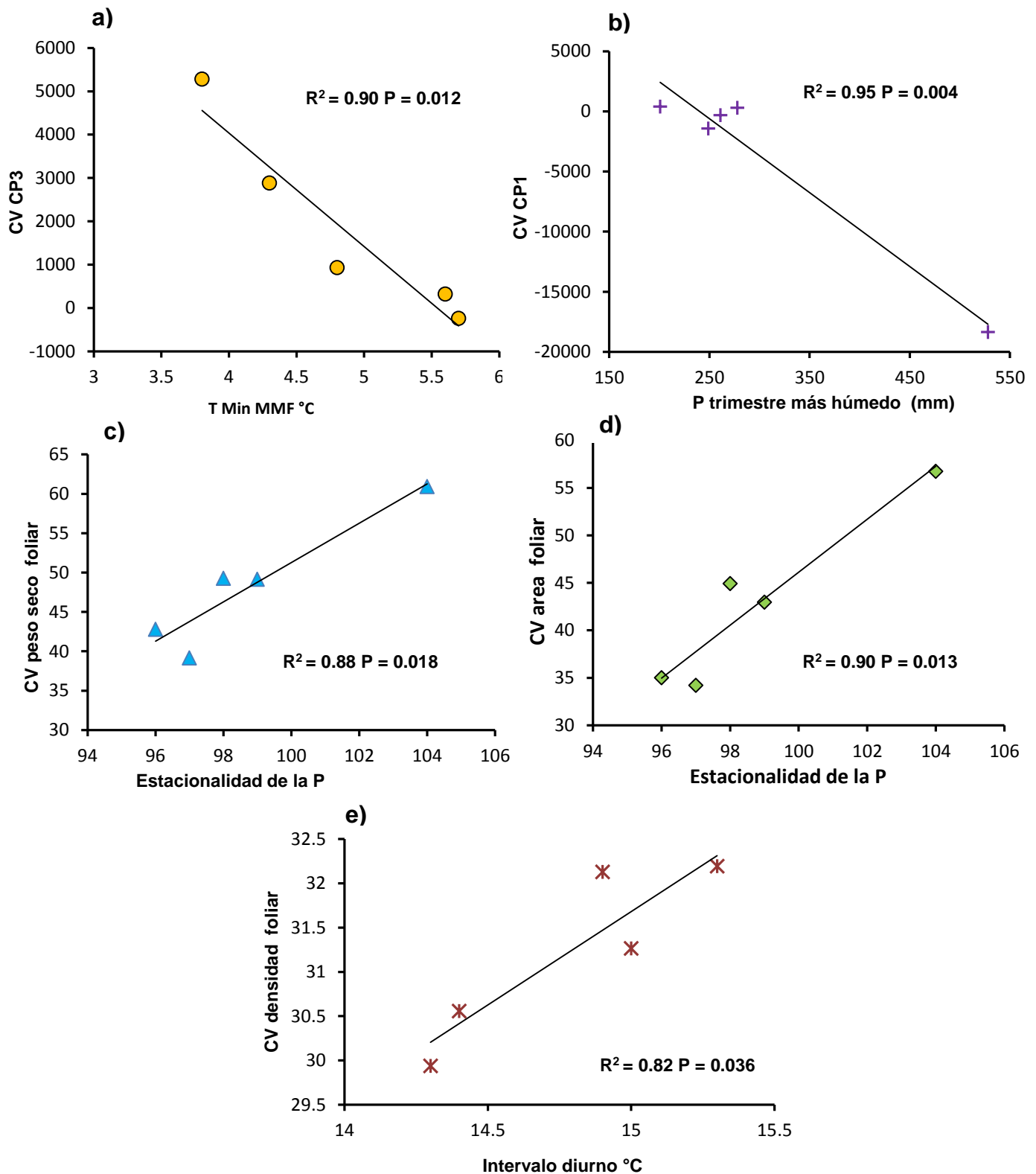


Figura 9. Variación de caracteres funcionales relacionados con variables climáticas de las poblaciones de *Q. obtusata*: **a)** coeficiente de variación del componente principal tres y la temperatura mínima del mes más frío **b)** coeficiente de variación del componente principal uno y la precipitación del trimestre más húmedo **c)** coeficiente de variación del peso seco foliar y la estacionalidad de la precipitación **d)** coeficiente de variación del área foliar y la estacionalidad de la precipitación **e)** coeficiente de variación de la densidad foliar y el intervalo diario.

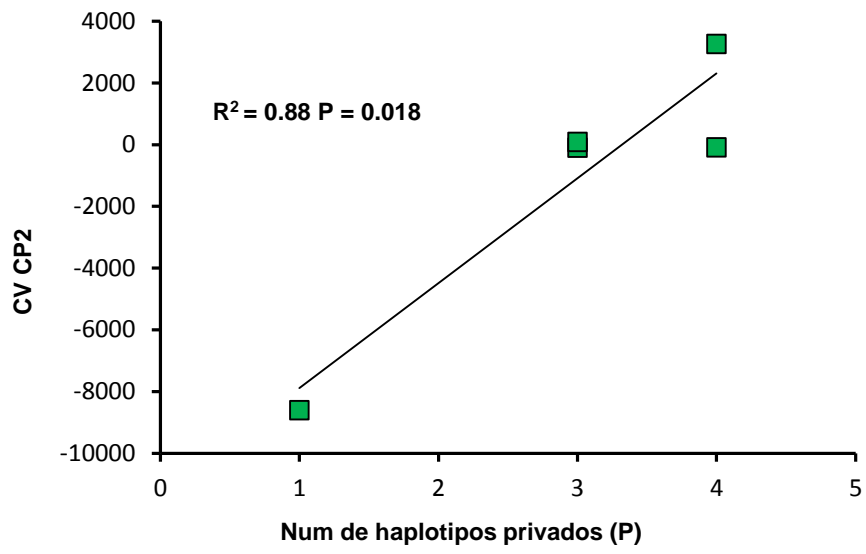


Figura 10. Relación entre el coeficiente de variación del componente principal dos de los caracteres funcionales y el número de haplotipos privados de las poblaciones de *Q. obtusata*.

6. DISCUSIÓN

Las especies del género *Quercus* son parte importante del paisaje de los bosques en Michoacán, estado en el que se registran aproximadamente 30 especies (Arizaga et al. 2009). Las comunidades de encinos elegidas en este estudio presentaron una riqueza que osciló entre 2 y 6 especies coexistiendo, a escala local. Esto contrasta con el número de especies que indican los modelos de distribución potencial (Figura 3). La distribución espacial de las especies no es aleatoria, sino que obedece a la capacidad de tolerancia que cada especie tiene a factores ambientales, tales como altitud, posición topográfica, temperatura, humedad y precipitación; que en conjunto definen la amplitud ecológica, o perfil bioclimático de cada especie (Fischer et al. 2001, Villaseñor y Téllez-Valdez 2004, Leal et al. 2012). La altitud es un factor físico que influye sobre las condiciones climáticas a través de variables como la temperatura y la precipitación, que tienen a su vez un efecto directo sobre el crecimiento vegetal y están correlacionadas de forma específica en cada sitio (Barton 1994), por lo cual cada especie tiene un rango óptimo de distribución altitudinal.

A escala local se observó menor riqueza de especies que las predicciones del modelo de distribución potencial; ya que en los modelos se asume que la población está en equilibrio o pseudoequilibrio con las condiciones ambientales (Araújo y Pearson 2005). Eso supone que la distribución de la especie es estable en el tiempo y el espacio, no se toma en cuenta la reducción de su área original causada principalmente por la deforestación. La distribución de las especies responde a procesos complejos donde las relaciones bióticas tienen una gran influencia. La competencia por ejemplo puede llevar a que las especies no ocupen más que una parte del área de distribución potencial (Anderson et al. 2002, Pearson y Dawson 2003). Algunos autores consideran que las interacciones bióticas tienen un efecto importante a escala local y a resolución detallada (Whittaker et al. 2001, Pearson y Dawson 2004, Guisan y Thuiller 2005). Los modelos de distribución de especies son fotografías fijas de un instante y no reflejan ningún proceso histórico, ni pueden contemplarlo en sus reglas ni en sus clasificadores. Por este motivo, no es posible considerar los factores históricos, como eventos

geológicos, antropogénicos o climáticos que han sucedido en el pasado, como glaciaciones o aparición de barreras biogeográficas (Guisan y Zimmermann 2000, Svenning y Skov 2006).

En los sitios de colecta se identificaron nueve especies de encinos: *Q. candicans*, *Q. castanea*, *Q. conspersa*, *Q. crassipes*, *Q. deserticola*, *Q. laeta*, *Q. magnoliifolia*, *Q. obtusata* y *Q. rugosa* (cuatro pertenecientes a la sección *Lobatae* y cinco a la sección *Quercus*; en ese orden). Estas especies (a excepción de *Q. conspersa*) han sido reportadas como abundantes para el estado de Michoacán por diversos autores (Espinosa y Rodríguez 1995, Carranza 2005, Cué-Bär et al. 2006). *Quercus castanea* fue la especie que se encontró en la mayoría de los sitios y con una alta abundancia de individuos; por su parte, *Q. conspersa* solo se encontró en un sitio de muestreo (La Paloma) y en baja abundancia.

El ajuste de los atributos morfo-funcionales de las plantas les permite alcanzar un mayor éxito reproductivo (Sandquist y Ehleringer 1997). Se ha documentado que los caracteres funcionales de una misma especie, como el área foliar específica, el grosor de las hojas, la densidad estomática y el contenido de pigmentos, pueden variar en el espacio (Körner y Cochrane 1985; Reich et al. 1997, Filella y Peñuelas 1999), y en el tiempo (Ehleringer 1982, Abrams et al. 1994, Wagner et al. 2004). En las poblaciones de las especies focales (*Q. crassipes* y *Q. obtusata*) los caracteres con el mayor coeficiente de variación (CV) fueron el peso seco foliar y el área foliar; por su parte, los caracteres con menor CV fueron la cantidad de clorofila y la densidad promedio de estomas. Los valores de la cantidad de clorofila en las especies focales no fueron muy variables entre las poblaciones de *Q. crassipes* (44.37-48.78 unidades SPAD) y *Q. obtusata* (41.68-45.01 unidades SPAD). Estos valores se pueden comparar con un estudio de restauración en el que analizaron la supervivencia y el crecimiento de 17 especies leñosas, incluyendo a *Quercus ilex* subsp. *ballota*, en el cual realizaron mediciones del área foliar específica y el contenido de clorofila de las distintas especies, se reportaron valores de clorofila muy variables entre individuos y entre especies, *Olea europea* var. *sylvestris* y *Nerium oleander* fueron las especies que presentaron valores de clorofila comparativamente altos y de amplia variabilidad (desde 50 a 85

unidades SPAD); por su parte, *Fraxinus angustifolia*, *Salix atrocinerea* y *Populus alba* mostraron valores relativamente bajos y de menor variabilidad, en el caso del encino *Quercus ilex* subsp. *ballota* sus valores de la cantidad de clorofila presentaron mayor variación (41-53 unidades SPAD) (Domínguez et al. 2004) en comparación con los valores reportados para la especies focales. Los individuos con mayor contenido de clorofila en sus hojas son capaces de tener tasas más altas de fotosíntesis, una mayor ganancia de carbono y como resultado final un mayor crecimiento. Por su parte, la densidad estomática presenta un gran componente de variación ambiental, por lo que puede diferir entre individuos de la misma especie, entre hojas del mismo individuo y entre sectores de una misma hoja (Filella y Peñuelas 1999). Sin embargo, se encontraron valores bajos del CV del promedio de la densidad estomática entre las poblaciones muestreadas de *Q. crassipes* y *Q. obtusata*.

Por otra parte, la morfología foliar está determinada inicialmente por una base genética, pero las intensas presiones ambientales a las que están sometidas las hojas dan como resultado diferentes fenotipos dependientes del ambiente en el que se desarrollan, observándose un amplio intervalo de formas y tamaños foliares (Bacilieri et al. 1995, Aguilar et al. 2000). Los patrones de variación morfológica en poblaciones naturales son producto del flujo de genes, la selección natural, la plasticidad fenotípica y la deriva genética, entre otros factores. Existen trabajos que han identificado la variación en las características fenotípicas como resultado de estos factores (Dobzhansky et al. 1993, Borazan y Babaç 2003, González-Rodríguez y Oyama 2005). De forma particular, en las especies de encinos la hibridación podría estar jugando un papel importante en la variación de rasgos funcionales, debido a que la hibridación favorece el flujo génico interespecífico, provocando el intercambio de genes entre diferentes especies y de forma potencial incrementado la diversidad genética en estas comunidades. Sin embargo, en las especies focales (*Q. crassipes* y *Q. obtusata*) no se encontraron correlaciones significativas entre los CV de los caracteres funcionales evaluados y ninguno de los índices de riqueza y diversidad de especies de encinos en las comunidades locales.

La evolución requiere de variación genética en las poblaciones (Juenger 2013). La importante diversidad de especies en el género *Quercus* es tal vez consecuencia de la propia diversidad genética intra-específica, y que ha permitido la evolución de poblaciones con adaptaciones a unas particulares condiciones locales. Los encinos pueden presentar una amplia variación genética intra-poblacional, debido a que presentan ciclos de vida largos, polinización anemógama y entrecruzamiento (Bacilieri et al. 1995). Este aspecto concurre con otros procesos evolutivos como una alta capacidad de hibridación entre individuos pertenecientes incluso a linajes diferentes, o la propia convergencia evolutiva en rasgos morfo-funcionales en regiones de alta diversidad específica (Cavender-Bares et al. 2004). El estudio de la variación intra-específica en rasgos morfo-funcionales en *Quercus* es extremadamente complejo.

La literatura generalmente señala que hay relaciones consistentes entre varios atributos foliares y los factores ambientales (especialmente la precipitación, la temperatura y la disponibilidad de nutrimentos). Esto concuerda con nuestros resultados en los cuales se encontró una relación de algunas variables climáticas con la variación de los caracteres funcionales, encontrándose para *Q. crassipes* una relación entre el CV del grosor foliar y la temperatura media anual y la temperatura mínima del mes más frío, así como una relación entre el CV del CP1 y la estacionalidad de la precipitación y finalmente, entre el CV del CP2 y la isothermalidad. Para *Q. obtusata* se encontró relación del CV del CP1 con la precipitación del trimestre más húmedo, del CV del CP3 con la temperatura mínima del mes más frío, del CV del peso seco foliar y del CV del área foliar con la estacionalidad de la precipitación y del CV de la densidad foliar con el intervalo diurno. Diversos estudios han mostrado que las plantas modifican su morfología para mitigar las condiciones climáticas limitantes (Filella y Peñuelas 1999, Körner 2003). Dentro de estas modificaciones, las más comunes son: 1) las estructurales internas, que incluyen la variación en las características del tejido meristemático y la variación en el tamaño celular (Prock y Körner 1996), 2) las estructurales externas, como la variación del área foliar, la estatura del individuo y la densidad de estomas (Sandquist y Ehleringer 1997, Cavieres 2000, Körner

2003). Las diferencias de la respuesta al ambiente entre poblaciones proporcionan el material para los procesos de diferenciación y especiación dentro y entre especies (Ellison 2004); al mismo tiempo, la interfaz entre la variación intra e interespecífica provee un enlace crítico para definir los procesos microevolutivos al interior de dichas poblaciones (Görür 2001, González-Rodríguez et al. 2004). La plasticidad fenotípica juega un papel importante en la especiación y evolución de las poblaciones, actuando como un factor de diversidad y diferenciación, que contribuye al origen de nuevas características (Görür 2001).

Por otro lado, se analizó la variación genética mediante microsatélites del ADN de cloroplasto en cinco sitios para las especies focales. Se obtuvieron un total de 16 y 22 haplotipos en *Q. crassipes* y *Q. obtusata*, respectivamente. Los resultados indicaron que las poblaciones de *Q. crassipes* con mayor diversidad genética fueron el Ejido San Lázaro y La Paloma. Destaca que en estos sitios *Q. crassipes* fue la especie con mayor abundancia de individuos en las comunidades muestreadas y que en La Paloma se encontró también el mayor número de especies de encinos rojos coexistiendo (cuatro). Para las poblaciones de *Q. obtusata* fue el sitio de Atécuaro donde se encontró mayor diversidad genética, este presentó la mayor riqueza de especies de encinos blancos coexistiendo (cuatro). Un factor importante en determinar la cantidad de variación genética en las plantas es la densidad poblacional, ya que la transferencia de polen y semillas a menudo depende de la densidad de las poblaciones (Knapp 2001). Se sabe que el flujo génico es la principal fuerza de homogenización de la variación genética entre poblaciones cuando no existen barreras o factores que limiten el movimiento de polen y/o semillas (Dutech 2005). En nuestro caso, estudiamos la variación en el ADN de cloroplasto, por lo que el flujo génico relevante es aquel que se da a través de la dispersión de semillas. Valencia-Cuevas et al. (2014) estudiaron comunidades con distinta riqueza de especies de encinos rojos en simpatria y analizaron la variación genética de *Q. castanea*. Este estudio apoyó la hipótesis de que existe una relación positiva significativa entre la diversidad genética de *Q. castanea* y la riqueza de especies de encinos rojos que se encuentran en simpatria. Lo que contrasta con nuestros resultados, ya que no encontramos esa relación en las

especies estudiadas. Sin embargo, en las poblaciones de *Q. crassipes* se observó una relación negativa significativa entre los estimadores de diversidad genética y el índice de diversidad de Shannon de la sección *Quercus* (encinos blancos). Se sugiere un efecto indirecto de las especies de encinos blancos sobre los individuos de *Q. crassipes*, ya que entre mayor sea la diversidad de especies de encinos blancos en las comunidades, las poblaciones de *Q. crassipes* presentaron menor diversidad genética. Una posible explicación al efecto indirecto es debido a la competencia interespecífica en las comunidades locales.

Por lo tanto, se sugiere que para evaluar la relación positiva significativa entre la diversidad genética y la riqueza de especies de encinos que se encuentran en simpatria, se deben tomar en cuenta otros factores que influyen en dicha relación, como son, la condición del hábitat (Williams y Ehleringer 2000, Williams et al. 2001, Himrane et al. 2004), la abundancia relativa de las especies, ya que afecta las tasas de flujo génico que promueven la hibridación; la identidad de las especies (Lepais et al. 2009), la estructura espacial de las especies (Salvini et al. 2009), la afinidad genética entre las especies como resultado de las distancias filogenéticas (Jiménez et al. 2004), las diferentes tasas del flujo de genes (Curtu et al. 2007), la proporción de polen de la misma especie y la densidad de individuos disponibles para el apareamiento (Lagache et al. 2013), así como las especies progenitoras, dependiendo de la especie que actúa como materna y la paterna (Curtu et al. 2007, Jensen et al. 2009, Lepais et al. 2009). Por ejemplo, Valbuena-Carabaña et al. (2007) encontró que del 6-22% de la hibridación entre *Q. petraea* y *Q. pyrenaica* depende de las condiciones ambientales en el sitio. Además, Curtu et al. (2007) reconoció que del 2-16% de la tasa de hibridación depende de la pareja parental de las especies analizadas (*Q. robur*, *Q. petraea*, *Q. pubescens*, y *Q. frainetto*).

Por otra parte, algunos estimadores de la diversidad genética de las poblaciones de *Q. crassipes* se relacionaron negativamente con la variación del peso seco foliar y el área foliar (caracteres que presentaron mayor variación entre las poblaciones), mientras que en las poblaciones de *Q. obtusata* se encontró una relación positiva significativa entre el CV del CP2 y el número de haplotipos privados. Nicoli et al. (2006) mencionan que bajo condiciones de

crecimiento semejantes, diferentes genotipos de *Q. robur* mostraron variación significativa en las características foliares, lo cual sugiere que las diferencias son principalmente de origen genético.

Algunos estudios con marcadores moleculares revelan que existe baja diferenciación poblacional en algunas especies de encinos, lo que sugiere un elevado flujo génico (vía polen) entre poblaciones (Petit et al. 2003, González-Rodríguez y Oyama 2005). Esto implica que una gran proporción de la variación genética total de la especie puede encontrarse dentro de cualquier población y por esta razón, puede esperarse un amplio intervalo de variación fenotípica con base genética entre individuos, aun cuando las características morfológicas puedan estar sujetas a restricciones del desarrollo y del ambiente (Bruschi et al. 2004, Ponton et al. 2004). En nuestro estudio se utilizó el ADN de cloroplasto, se sugiere analizar el ADN nuclear de las poblaciones así como identificar genes candidatos relacionados directamente a la expresión de los rasgos funcionales de las plantas. Son pocos los estudios relacionados con la variación de caracteres funcionales utilizando el enfoque de genes candidatos. Por ejemplo, Petrone (2013) caracterizó la variación fenotípica y genotípica intra- e inter-poblacional relacionada con tolerancia a estrés salino en poblaciones silvestres de *Gossypium hirsutum* (algodón), exploró la diversidad genética en tres genes que codifican factores de transcripción, y detectó variación considerable en los genes regulatorios, detectó la huella de la selección natural en GhDREB y GhNAC4. Como conclusión de este estudio se considera que la salinidad ha sido y será un régimen de selección fuerte e importante a lo largo de la distribución de poblaciones naturales de *G. hirsutum*. La contribución de elementos regulatorios a la evolución de caracteres adaptativos en especies de plantas ha sido muy poco explorada (Martin et al. 2010). Para el estudio de la variación en caracteres funcionales es necesario integrar los componentes genómicos, fenotípicos y ambientales (Eckert y Dyer 2012). Conocer la distribución de la variación genética permitirá comprender la forma en que las plantas se adaptan a su ambiente, pero además contribuirá en la toma de decisiones para conservación de recursos genéticos sobre todo frente a escenarios de cambio climático (Manel et al. 2003).

7. CONCLUSIONES

- Para *Quercus crassipes* y *Quercus obtusata* los caracteres más variables entre las poblaciones estudiadas fueron el peso foliar y el área foliar. Los caracteres con menor variabilidad entre las poblaciones fueron la cantidad de clorofila y la densidad de estomas.
- La riqueza de especies en las comunidades locales no es el mejor factor que explique la variación funcional y genética en *Q. crassipes* y *Q. obtusata*.
- En las poblaciones muestreadas de *Q. crassipes* y *Q. obtusata* se encontraron correlaciones entre las variables morfo-funcionales y las variables climáticas.

8. LITERATURA CITADA

- Abrams M. Kubiske M. Mostoller S. 1994. Relating wet and dry year ecophysiology to leaf structure in contrasting temperate tree species. *Ecology* 75: 123-133.
- Ackerly D. D. and Knight C. A. et al. 2002. Leaf size, specific leaf area and microhabitat distribution of chaparral woody plants: contrasting patterns in species level and community level analyses. *Oecologia*, 130, 449–457
- Ackerly D. D. et al. 2000. The evolution of plant ecophysiological traits: Recent advances and future directions. *Bio. Science* 50: 979 – 995
- Afzal-Raffi Z. Dodd R. 2007. Chloroplast DNA supports a hypothesis of glacial refugia over postglacial recolonization in disjunct populations of black pine (*Pinus nigra*) in western Europe. *Mol. Ecol.* 16: 723-736
- Aguiar M. O. de Moraes R. R da C. Araújo R. Skatulla M. and Preisinger H. 2000. Morphological traits and ecological behavior of selected secondary forest tree. En: Lieberei, R., H-K Bianchi, V. Boehm C. Reisdorff (Eds.). 2002. Species in the Central Amazon. German-Brazilian Workshop on Neotropical Ecosystems 3(8):965-968.
- Aldrich P. R. Jagtap M. Michler C. H. Romero-Severson J. 2003. Amplification of North American red oak microsatellite markers in European white oaks and Chinese chestnut. *Silvae Genet* 52:176–179
- Amos W. and Harwood J. 1998. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 177-186 pp.
- Anderson R. P. Gómez-Laverde M. Peterson A. T. 2002. Geographical distributions of spiny pocket mice in South America: Insights from predictive models. *Global Ecology and Biogeography* 11: 131-141.
- Araújo M. B. Pearson R. G. Thuiller W. Erhard M. 2005. Validation of species-climate impact models under climate change. *Global Change Biology* 11: 1504-1513.
- Arizaga S. Martínez-Cruz J. Salcedo-Cabrales M. and Bello-González M. A. 2009. Manual de la biodiversidad de encinos michoacanos. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México, D. F.
- Arnold M. L. 1997. Natural hybridization and evolution. Oxford: Oxford University Press.
- Bacilieri R. Ducouso A. Kremer A. 1995. Genetic, morphological, ecological and phenological differentiation between *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L. in a mixed stand of northwest of France. *Silvae Genet* 44: 1-10.

- Barton A. M. 1994. Gradient analysis of relationships among fire, environment, and vegetation in a southwestern USA mountain range. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 121: 251-265
- Bongers F. and J. Popma. 1990. Leaf characteristics of the tropical rain forest flora of Los Tuxtlas, México. *Bot. Gaz.*15:354-365.
- Borazan A. Babac M. T. 2003. Morphometric leaf variation in oaks (*Quercus*) of Bolu, Turkey. *Annales Botanici Fennici* 40: 233-242.
- Borgardt S. J. and Pigg K. B. 1999. Anatomical and developmental study of petrified *Quercus* (Fagaceae) fruits from the Middle Miocene, Yakima Canyon, Washington, USA. *American journal of Botany* 86:307-325.
- Bossema I. 1979. Jays and oaks: An eco-ethological study of a symbiosis. Zoological Laboratory, University of Groningen, The Netherlands, Acc. III-1979.
- Bruschi P. Grossoni P. Bussotti F. 2004. Within and among tree variation in leaf morphology of *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. Natural populations. *Trees* 17: 164-172.
- Bruschi P. Vendramin G. G. Bussotti F. Grossoni P. 2003. Morphological and molecular diversity among Italian populations of *Quercus petraea* (Fagaceae). *Annals of Botany* 91: 707- 716.
- Burczyk J. and Chybicki J. I. 2004. Cautions on direct gene flow estimation in plant populations. *Evolution*. 58 (5) 956-963.
- Burgarella C. Lorenzo Z. Jabbour-Zahab R. Lumaret R. Guichoux E. Petit R. J. Soto A. Gil L. 2009. Detection of hybrids in nature: application to oaks (*Quercus suber* and *Q. ilex*). *Journal of Heredity*.02:442–452.
- Carranza E. 2005. Angiospermas. La biodiversidad en Michoacán. Estudio de Estado. Villaseñor, L.E. (Ed.). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Gobierno del Estado de Michoacán. Secretaría de Urbanismo y Medio Ambiente. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo
- Cavender-Bares J. Kitajima K. Bazzaz F.A. 2004. Multiple trait associations in relation to habitat differentiation among 17 Floridian oak species. *Ecological Monographs* 74:635–662
- Cavieres L.A. 2000. Variación morfológica de *Phacelia secunda* J.F. GMEL. (Hydrophyllaceae) a lo largo de un gradiente altitudinal en Chile central. *Gayana Botánica* 57: 89-96.
- Cué-Bär E.M. Villaseñor J.L. Arredondo Amezcua L. Cornejo-Tenorio, M.G. and Ibarra-Manríquez, G. 2006. La flora arbórea de Michoacán, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. Núm. 78
- Curtu A. L. Gailing O. Finkeldey R. 2007. Evidence for hybridization and introgression within a species-rich oak (*Quercus* spp.) community. *BMC Evolutionary Biology* 7: 218-223.

- Deguilloux M. F. S. Dumolin-Lapègue L. Gielly D. Grivet and R.J. Petit. 2003. A set of primer for the amplification of chloroplast microsatellites in *Quercus*. *Molecular Ecology Notes*, 3, 24-27.
- Díaz S. et al. 2004. The plant traits that drive ecosystems: Evidence from three continents. *Journal of Vegetation Science* 15:295–304
- Dobzhansky T. Ayala F. J. Ledyard S. G. Valentine J. W. 1993. *Evolución*. Editorial Omega. Barcelona, España. 574 p.
- Dodd R. S. Afzal-Rafii Z. 2004. Selection and dispersal in a multispecies oak hybrid zone. *Evolution* 58: 261-269.
- Domínguez M. T. Teodoro Marañón Murillo J. M. Hidalgo J. A. y Madejón P. 2004. Crecimiento y morfología foliar de especies leñosas en las reforestaciones del corredor verde del Guadiamar (Sevilla). *Cuad. Soc. Esp. Cienc. For.* 20: 173-179.
- Dumolin-Lapègue S. Demesure B. and Petit R.J. 1995. Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculated oak investigated with an efficient PCR method. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 1253-1256.
- Dumolin-Lapègue S. Demesure B. Fineschi S. Le Corre V. Petit R.J. 1997. Phylogeographic structure of White oaks throughout the European continent. *Genetics* 146: 1475-1487.
- Dumolin-Lapègue S. Kremer A. Petit R.J. 1999. Are chloroplast and mitochondrial DNA variation species independent in oaks? *Evolution* 53: 1406-1413.
- Dutech C. Sork V. L. Irwin A. J. Smouse P. E. Davis F. W. 2005. Gene flow and fine-scale genetic structure in a wind pollinated tree species, *Quercus lobata* (Fagaceae). *American Journal of Botany* 92: 252-261.
- Eckert J. A. Dyer R. J. 2012. Defining the landscape of adaptive genetic diversity. *Molecular Ecology* 21: 2836-2838.
- Ehleringer J. 1982. The influence of water stress and temperature on leaf pubescence development in *Encelia farinosa*. *American Journal of Botany* 69: 670-675.
- Eliades N.G. and Eliades D. G. 2009. "Haplotype Analysis: Software for Analysis of Haplotype Data". Distributed by the authors. Forest Genetics and Forest Tree Breeding, Georg-Augst University Goettingen, Germany
- Ellison A. M. Buckley H. L. Miller T. E. y Gotelli N. J. 2004. Morphological variation in *Sarracenia purupurea* (Sarraceniaceae): Geographic, environmental, and taxonomic correlates. *American Journal of Botany* 91(11): 1930-1935.
- Espinosa G. J. y L.S. Rodríguez, J. 1995 Listado florístico del estado de Michoacán. Sección IV (Angiospermae: Fagaceae, Gramineae, Krameriaceae, Leguminosae). *Flora del Bajío y de Regiones*

- Adyacentes. Fascículo complementario XII. Instituto de Ecología A.C. Centro Regional del Bajío. Pátzcuaro, Michoacán. México. 271 pp
- Ferrusquía-Villafranca I. 1998. Geología de México: una sinopsis. In: Ramamoorthy T. P., Bye R., Lot A., Fa J. (eds.) Diversidad biológica de México: orígenes y distribución. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- Filella I. Peñuelas J. 1999. Altitudinal differences in UV absorbance, UV reflectance and related morphological traits of *Quercus ilex* and *Rhododendron ferrugineum* in the Mediterranean region. *Plant Ecology* 145: 157-165.
- Fischer J. Lindenmayer D. B. Nix H. A. Stein J. L. Stein J. A. 2001. Climate and animal distribution: a climatic analysis of the Australian marsupial *Trichosurus caninus*. *Journal of Biogeography* 28:293-304.
- Fonseca C. R. Overton J. M. C. Collins B. and Westoby M. 2000. Shifts in trait-combinations along rainfall and phosphorus gradients, *J. Ecol.*, 88, 964–977
- Fyllas N. M. et al. 2009. Basin-wide variations in foliar properties of Amazonian forest: phylogeny, soils and climate. *Biogeosciences* 6, 2677–2708
- Garnier E. 2007. Let the concept of trait be functional. *Oikos*. 116 (5): 882– 892.
- González-Rodríguez A. Arias D. M. Oyama K. 2005. Genetic variation and differentiation of populations within the *Quercus affinis-Quercus laurina* (Fagaceae) complex analyzed with RAPD markers. *Canadian Journal of Botany* 83: 153-162 pp.
- González-Rodríguez A. Arias D. M. Valencia S. and Oyama K. 2004. Morphological and RAPD analysis of hybridization between *Quercus affinis* and *Quercus laurina* (Fagaceae) two Mexican red oaks. *American Journal of Botany*, 91: 401-409 pp.
- Görür G. 2001. The role of phenotypic plasticity in host RACE formation and sympatric speciation in phytophagous insects, particularly in Aphids. *Turk Journal Zoology* 24: 63-68.
- Grivet D. Sork V. L. Westfall R. D. and Davis F. W. 2008. Conserving the evolutionary potential of California valley oak (*Quercus lobata* Née): a multivariate genetic approach to conservation planning. *Molecular Ecology* 17:139-156.
- Guisan A. Thuiller W. 2005. Predicting species distribution: Offering more than simple habitat models. *Ecology Letters* 8: 993-1009.
- Guisan A. Zimmermann N. E. 2000. Predictive habitat distribution models in ecology. *Ecological Modelling* 135: 147-186.
- Hardin J.W. 1975. Hybridization and introgression in *Quercus alba*. *Journal of the Arnold Arboretum* 56: 336-363

- Harrison R. G. 1993. Hybrids and hybrid zones: historical perspective. En R. G. Harrison [ed.], Hybrid zones and the evolutionary process, 3–12. Oxford University Press, Oxford, UK.
- He T. Lamont B. B. Krauss S. L. Enright N. J. Miller B. P. 2008. Covariation between intraspecific genetic diversity and species diversity within a plant functional group. *Journal of Ecology*. 96: 956-961.
- Hedrick P. W. 2011. *Genetics of Populations*. Cuarta edición. Jones and Barlett. Estados Unidos, 659 pp.
- Hijmans R. J. Cameron S. E. Parra J. L. Jones P. G. and Jarvis A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25: 1965-1978
- Himrane H. Camarero J. J. Gil-Pelegrín E. 2004. Morphological and ecophysiological variation of the hybrid oak *Quercus subpyrenaica* (*Q. faginea* x *Q. pubescens*). *Trees* 18: 566-575.
- Jensen J. Larsen A. Nielsen L. R. Cottrell J. 2009. Hybridization between *Quercus robur* and *Q. petraea* in a mixed oak stand in Denmark. *Ann Forest Sci* 66:706
- Juenger T. E. 2013. Natural variation and genetic constraints on drought tolerance. *Plant. Biol.* 3: 274-281.
- Kashani N. Dodd R. S. 2002. Genetic differentiation of two California red oak species, *Quercus parvula* var. *Shreveii* and *Q. wislizeni*, based on AFLP genetic markers. *USDA For Serv Gen Tech Rep* 184:417–426
- Kattge J. et al. 2011. A global database of plant functional traits. *Glob. Change Biol.* 17,2905-2935
- Knapp E. E. Goedde M. A. Rice K.J. 2001. Pollen-limited reproduction in blue oak: implications for wind pollination in fragmented populations. *Oecologia*. 128: 28-55.
- Körner C. 2003. *Plant Alpine Life*. Springer-Verlag, Berlin.
- Körner C. Cochrane P. 1985. Stomatal responses and water relations of *Eucalyptus pauciflora* in summer along an elevational gradient. *Oecologia* 66: 443-455.
- Lagache L. Klein E. K. Guichoux E. Petit R. J. 2013. Fine-scale environment control of hybridization in oaks. *Molecular Ecology* 22: 423-436.
- Lamont B. B. Groom P. K. Cowling R. M. 2002. High leaf mass per area of related species assemblages may reflect low rainfall and carbon isotope discrimination rather than low phosphorus and nitrogen concentrations. *Functional Ecology* 16: 403-412.
- Leal-Nares O. Mendoza M. E. Pérez-Salicrup D. Davide Geneletti López-Granados E. y Carranza E. 2012. Distribución potencial del *Pinus*

martinezii: un modelo espacial basado en conocimiento ecológico y análisis multicriterio. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 83: 1152-1170.

- Lepais O. Petit R. J. Guichoux E. Lavabre J. E. Alberto F. Kremer A. Gerber S. 2009. Species relative abundance and direction of introgression in oaks. *Molecular Ecology* 18: 2228-2242.
- Lewington R. and Streeter D. 1993. La historia natural de los robles. Dorling-Kindersley, España.
- Manel S. Schwartz M. K. Luikart G. Taberlet P. 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 18 (4).
- Manos P. S. Doyle J. J. and Nixon K. C. 1999. Phylogeny, biogeography and processes of molecular differentiation in *Quercus* subgenus *Quercus* (Fagaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12: 333-349.
- Martin C. Ellis N. Rook F. 2010. Do transcription factors play special roles in adaptive variation? *Plant Physiology* 154: 506-511.
- Moran E. V. Willis J. Clark J. S. 2012. Genetic evidence for hybridization in red oaks (*Quercus* sect. *Lobatae*, Fagaceae). *American Journal of Botany*. 99:92-100
- Navascués M. and Emerson B. C. 2005. Chloroplast microsatellites: measures of genetic diversity and the effect of homoplasy. *Mol. Ecol.* 14(5): 1333-1341
- Nicoli C. Krstic N. P. Pajevic B. D. Orlovic S. S. 2006. Variability of leaf characteristics in different pedunculated oak genotypes (*Quercus robur* L.). *Proceedings for Natural Sciences, Matica Srpska Novi Sad* 110: 95-105.
- Nixon K. C. 1993. The genus *Quercus* in Mexico. En: Ramamoorthy T.P., Bye R., Lot A. y Fa J. (Eds.). *Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution*. Pp 397-420. Oxford University Press, New York.
- Nixon K. C. 1998. El género *Quercus* en México. In: Ramamoorthy, T.P., Bye, R., Lot, A. y Fa. J. eds. *Diversidad Biológica de México: orígenes y distribución*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., 447-458 pp.
- Pearson R. G. Dawson T. P. 2003. Preceding the impacts of climate change on the distribution of species: Are bioclimate envelope models useful? *Global Ecology and Biogeography* 12: 361-371.
- Pearson R. G. Dawson T. P. 2004. Bioclimate envelope models: What they detect and what they hide - response to Hampe (2004). *Global Ecology and Biogeography* 13: 469-476.
- Peñaloza-Ramírez. J. M. González-Rodríguez A. Mendoza-Cuenca L. Caron H. Kremer A. and Oyama K. 2010. Interspecific gene flow in a multispecies

oak hybrid zone in the Sierra Tarahumara of Mexico. *Annals of Botany* 1-11 pp.

- Petit R. J. Bodenes C. Ducouso A. Roussel G. Kremer A. 2003. Hybridization as a mechanism of invasion in oaks. *New Phytologist* 161:151-164.
- Petit R. J. Brewer S. Bordacs S. Burg K. Cheddadi R. Coart E. Cottrell J. Csai Kl U. M vam Dam B. Deans J. D. Espinel S. Fineschi S. Finkeldey R. Glaz I. Goicoechea P. G. Jensen J.S Konig A. O. Lowe A. J. Madsen S. F. Matias G. Munro R. C. Popescu F. Slade D. Tabbener H. de Vries S. G. M. Ziegenhagen B. de Beaulieu J. L. Kremer A. 2002. Identification of refugia and post-glacial colonization routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecology and Management* 156, 49-74.
- Petrone S. 2013. Variación funcional relacionada con la tolerancia al estrés salino de *Gossypium hirsutum* en México. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. Pp 104.
- Ponton S. Dupoguey J. Dreyer E. 2004. Leaf morphology as species indicator in seedlings of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl.: modulation by irradiance and growth flush. *Annals of Forest Science* 61: 73-80.
- Prock S. Körner C. 1996. A cross-continental comparison of phenology, leaf dynamics and dry matter allocation in arctic and temperate zone herbaceous plant from contrasting altitudes. *Ecological Bulletins* 45: 93-103.
- Rasband W. S. 2007. ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EE.UU., <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2016 USA
- Reich P. Walters M. Ellsworth D. 1997. From tropics to tundra. Global convergence in plant functioning. *Proceedings of the USA National Academy of Science* 94: 13730-13734.
- Rieseberg L. H. and N. C. Ellstrand. 1993. What can morphological and molecular markers tell us about plant hybridization? *Critical Reviews in Plant Sciences*. 12:213–241
- Rieseberg L. H. Archer M. A. Wayne R. K .1999. Transgressive segregation, adaptation, and speciation. *Journal of Heredity* 83:363–372
- Rieseberg LH .1995. The role of hybridization in evolution: Old wine in new skins. *American Journal of Botany*. 82:944–953
- Rodríguez I. S. y Romero S. 2007. Arquitectura Foliar de diez especies de encino (*Quercus*, Fagaceae) de México. *Acta Botánica Mexicana*. 81:9-34 pp.
- Rodríguez-Correa H. González-Rodríguez A. Letelier L. García-Oliva F. Reducción de las áreas con alta riqueza de especies del género *Quercus* bajo escenarios de cambio climático global. En prensa.

- Rozendaal D. M. A. Hurtado V. H. et al. 2006. Plasticity in leaf traits of 38 tropical tree species in response to light; relationships with light demand and adult stature. *Funct. Ecol.*, 20, 207–216.
- Rzedowski J. 1978. *Vegetación de México*. Limusa, México, D. F. 482 p.
- Salvini D. Bruschi P. Fineschi S. Grossoni P. Kjær E. D. Vendramin G. G. 2009. Natural hybridization between *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus pubescens* Willd. Within an Italian stand as revealed by microsatellite fingerprinting. *Journal of Plant Biology* 11:758–765
- Sandquist D. Ehleringer J. 1997. Intraspecific variation of leaf pubescence and drought response in *Encelia farinosa* associated with contrasting desert environments. *New Phytologist* 135: 635-644.
- SAS Institute Inc. 2005. JMP: A Business Unit of SAS. Version 9.0 by Statistical Analysis System, Institute Inc. Cary, NC, USA.
- Schwarzbach AE, Donovan LA, Rieseberg LH .2001. Transgressive character expression in a hybrid sunflower species. *American Journal of Botany*. 88:270–277
- Sebastiani F. Carnevale S. Vendramin G. G. 2004. A new set of mono- and dinucleotide chloroplast microsatellites in Fagaceae. *Molecular Ecology Notes* 4: 259–261.
- Svenning J. C. SKOV S. N. F. 2006. Range filling in European trees. *Journal of Biogeography* 33: 2018-2021.
- Tovar-Sánchez E. and Oyama K. 2004. Natural hybridization and hybrid zones between *Quercus crassifolia* and *Quercus crassipes* (Fagaceae) in México: Morphological and molecular evidence. *American Journal of Botany* 91(9): 1352–1363 pp.
- Tovar-Sánchez E. Mussali-Galante P. Esteban-Jiménez R. Piñero D. Arias D. M. Dorado O. Oyama K. 2008. Chloroplast DNA polymorphism reveals geographic structure and introgression in the *Quercus crassifolia* x *Quercus crassipes* hybrid complex in México. *Botany* 86: 228-239.
- Valbuena-Carabana M. González-Martínez S. C. Hardy O. J. Gil L. 2007. Fine-scale spatial genetic structure in mixed oak stands with different levels of hybridization. *Molec. Ecol.* 16:1207–1219
- Valencia S. 2004. Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 75: 33-53 pp.
- Valencia-Cuevas L. Mussali-Galante P. Piñero D. Castillo-Mendoza E. Rangel-Altamirano G. Tovar-Sánchez E. 2015. Hybridization of *Quercus castanea* (Fagaceae) across a red oak species gradient in México. *Plant Syst Evol.* 301: 1085-1097
- Valencia-Cuevas L. Piñero D. Mussali-Galante P. Valencia-Avalos S. Tovar-Sánchez E. 2014. Effect of a red oak species gradient on genetic

- structure and diversity of *Quercus castanea* (Fagaceae) in Mexico. *Tree Genet Genomes* 10:641–652
- Villaseñor J. L. Téllez-Valdéz O. 2004. Distribución potencial del género *Jefea* (Asteraceae) en México. *Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica* 75:205-220.
- Wagner G. Wang E. Shepherd R. 2004. New approaches for studying and exploiting an old protuberance, the plant trichome. *Annals of Botany* 93: 3-11.
- Warren Ch. R. Tausz M. Adams M. A. 2005. Does rainfall explain variation in leaf morphology and physiology among populations of red ironbark (*Eucalyptus sideroxylon* subsp. *tricarpa*) grown in a common garden?
- Wehenkel C. Bergmann F. Gregorius H. 2006. Is there a trade-off between species diversity and genetic diversity in forest tree communities? *Plant Ecology*. 185: 151-161.
- Westoby M. Falster D. S. et al. 2002. Plant ecological strategies: some leading dimensions of variation between species. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 33, 125–159
- Whittaker R.J. Willis K. J. FIELD R. 2001. Scale and species richness: Towards a general, hierarchical theory of species diversity. *Journal of Biogeography* 28: 453-470.
- Whittemore A. T. Schaal B. A. 1991. Interspecific gene flow in sympatric oaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88: 2540-2544.
- Williams D. G Ehleringer J. R. 2000. Carbon isotope discrimination and water relations of oak hybrid populations in Southwestern Utah. *Western North American Naturalist* 60: 121-129.
- Williams J. H. Boecklen W. J. Howard D. J. 2001. Reproductive processes in two oak (*Quercus*) contact zones with different levels of hybridization. *Journal of Heredity*. 87:680–690
- Wright I. J. Reich P. B. et al. 2004. The worldwide leaf economics spectrum. *Nature*. 428: 821–827.