



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO

DOCTORADO INSTITUCIONAL EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

OPCIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS Y
FORESTALES

VARIACIÓN MORFOLÓGICA Y ESTRUCTURA
GENÉTICA EN POBLACIONES NATURALES DE
Quercus rugosa Née (Fagaceae) EN MÉXICO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

M. C. MARÍA DOLORES URIBE SALAS

DIRECTOR DE TESIS: DR. CUAUHTÉMOC SÁENZ ROMERO
CO-DIRECTOR DE TESIS: DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA

MORELIA, MICH.

MAYO, 2009.



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

Programa Institucional de
Doctorado en Ciencias Biológicas

DR. JAVIER PONCE SAAVEDRA
COORDINADOR GENERAL DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DE
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E

Por este conducto nos permitimos comunicarle que después de haber revisado el manuscrito final de la Tesis Titulada: "VARIACIÓN MORFOLÓGICA Y ESTRUCTURA GENÉTICA EN POBLACIONES NATURALES DE *Quercus rugosa* Née (Fagaceae) EN MÉXICO" presentado por la M.C. MARÍA DOLORES URIBES SALAS, consideramos que reúne los requisitos suficientes para ser publicado y defendido en Examen de Grado de Doctor en Ciencias.

Sin otro particular por el momento, reiteramos a usted un cordial saludo.

ATENTAMENTE

Morelia, Michoacán, 22 de abril de 2009

MIEMBROS DE LA COMISIÓN REVISORA

Dr. Cuauhtémoc Sáenz Romero
Director de Tesis

Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa
Co Director de Tesis

Dr. Sergio Zamudio Ruiz
Vocal

Dra. Sabina Irene Lara Cabrera
Vocal

Dr. Horacio Cano Camacho
Vocal

Dra. Irene Ávila Díaz
Vocal

Dr. Nahum Modesto Sánchez Vargas
Vocal

Coordinación de Posgrado de la Facultad de Biología. Edif. "R" Planta Baja. Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán.
CP 58060. Tel/Fax. (443) 3167412. Email: plili_10@yahoo.com o pcerritosbarriga@gmail.com
Laboratorio de Entomología "Biol. Sócrates Cisneros Paz". Edificio B4 2º. Piso. Ciudad Universitaria. Morelia, Michoacán.
Email: javierpon@gmail.com

AGRADECIMIENTOS

A las personas que contribuyeron con mi formación y con la realización del presente trabajo

Al Dr. Ken Oyama, con estimación y mi total agradecimiento por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su grupo de estudiantes, por su invaluable apoyo y sus valiosas enseñanzas, por su ejemplo.

Al Dr. Cuauhtémoc Sáenz, por haberme dado la oportunidad de continuar con mis estudios de doctorado, por sus valiosas observaciones al trabajo durante su desarrollo, por su buena disposición.

Al Dr. Sergio Zamudio, miembro de mi comité tutorial por su amabilidad, la paciencia y su tiempo así como sus comentarios y observaciones siempre valiosos.

A los Drs. Sabina Lara y Horacio Cano, miembros de mi comité tutorial por sus comentarios y sugerencias valiosos durante el desarrollo de este trabajo.

A los Drs. Irene Ávila y Dr. Nahum Sánchez por la revisión del manuscrito, su amabilidad y sus comentarios a la tesis.

A los Drs. Jeanette Bayuelo y Jorge Fonseca coordinador saliente y entrante respectivamente, de la opción en Ciencias Agrícolas del Instituto de Investigaciones Agrícolas y Forestales, por su diligencia y amabilidad.

Al Dr. Víctor Rocha Ramírez por su apoyo en el trabajo de campo y de laboratorio.

A la Sra. Dolores Lugo por su apoyo en el laboratorio.

A mis compañeros de laboratorio de Ecología Genética y Molecular, los de antes y los de ahora, por su compañía durante las horas de trabajo, por los momentos agradables. Toño, Rosaura, Pablo, Sofía, Omar, Efraín, Irene, Miki, Solanch, Luisa, Jenny, Mara, Nidia, Enrique, Selene, Juan, Ana, Hermilo, Felipe, Pacheco, Víctor, Erasto, Roberto, Chucho, Yurixi, Lorena, Esmeralda, Paulina, Ernesto.

A las Instituciones que participaron

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por darme la oportunidad de continuar y concluir mis estudios de doctorado.

Al Instituto de Investigaciones Agrícolas y Forestales por haberme recibido con los brazos abiertos.

Mi reconocimiento al Centro de Investigaciones en Ecosistemas (CIEco-UNAM) por brindarme la oportunidad de desarrollar una parte importante de este trabajo en sus aulas.

Este trabajo fue apoyado por CONACYT (38550-V a K.O.), DGAPA-PAPIIT, UNAM (IN229803 a K.O.), SEMARNAT-CONACYT (2004-C01-97 y 2006-23728 a K.O.) y una beca doctoral de CONACYT a D.U.S. (reg. 61675).

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

Mercedes Salas Morales y Carlos Uribe García , con profundo amor y agradecimiento

A MIS HIJOS:

Marco, David y Héctor, mi inspiración más grande y el principal motor de mi vida

A Víctor de manera especial, por su gran amor y apoyo incondicional

A MIS HERMANOS:

Carmen, Mercedes, Alejandro, Alfredo, Juan y Felipe, por su cariño y apoyo de siempre

A la Memoria del Dr. Luis Enrique Sosa Luna, al maestro... al amigo

CONTENIDO

I. RESUMEN GENERAL.....	1
II. ABSTRACT.....	3
III. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	5
Descripción y clasificación del género <i>Quercus</i>	5
Biogeografía de <i>Quercus</i>	6
Encinos mexicanos.....	8
Estudios de variación morfológica en encinos.....	9
Descripción de <i>Quercus rugosa</i>	10
Zonificación para el movimiento de semilla.....	12
Importancia de los estudios de ecología molecular.....	14
Estudios de ecología molecular en encinos.....	16
IV. HIPÓTESIS.....	19
V. OBJETIVOS.....	20
VI. RESULTADOS.....	21
CAPÍTULO 1. Foliar morphological variation in the white oak <i>Quercus rugosa</i> Née (Fagaceae) along a latitudinal gradient in Mexico: Potential implications for management and conservation.	21
Resumen.....	21
Abstract.....	23
Introduction.....	23
Materials and Methods.....	24
Sample collection and morphological data.....	24
Climate variables.....	24
Statistical analysis.....	25
Results.....	25
Discussion	26
Acknowledgements	27
References.....	27

CAPÍTULO 2. High genetic diversity revealed by chloroplast microsatellites in natural populations of <i>Quercus rugosa</i> Neé (Fagaceae) in Mexico.....	29
Resumen.....	29
Abstract.....	30
Introduction.....	31
Materials and Methods.....	34
Sampling.....	34
Laboratory methods.....	35
Statistical analysis.....	37
Results.....	38
Genetic variation in <i>Q. rugosa</i>	38
Diversity within populations and differentiation among populations.....	39
Geographic distribution of haplotypes.....	40
Genealogical relationships among haplotypes.....	40
Spatial structure of the genetic diversity.....	41
Discussion.....	42
Brief historical background.....	42
Allelic and haplotypic richness.....	43
cpDNA diversity and geographic structure.....	45
Conclusions.....	48
Acknowledgements.....	49
References.....	49
Appendix A.....	55
VII. DISCUSIÓN GENERAL.....	58
Análisis morfológico.....	58
Análisis molecular.....	61
Aportaciones del estudio morfológico y molecular de esta tesis.....	63
Predicción de la distribución geográfica potencial de <i>Quercus</i>	

<i>rugosa</i> bajo condiciones de cambio climático.....	67
Conclusiones.....	71
VIII. PERSPECTIVAS.....	72
IX. REFERENCIAS GENERALES.....	74

I. RESUMEN GENERAL

México es un centro importante de diversificación del género *Quercus* con 161 especies, de más de 500 especies descritas para el género, distribuidas en las principales regiones montañosas del país. En esta tesis se presenta un análisis morfológico y genético de las poblaciones de *Quercus rugosa* a través de su distribución natural en México (Sierra Madre Oriental, Sierra Madre Occidental, Sierra Madre del Sur, Sierra de Los Altos de Chiapas y Eje Volcánico Transversal).

El objetivo de esta investigación fue entender la estructuración geográfica de la variación morfológica y genética de *Q. rugosa*, e inferir su historia evolutiva mediante el análisis de la variación y diferenciación morfológica y genética de sus poblaciones. En este estudio se incluyeron 25 poblaciones de la especie en el intervalo geográfico de los 16° 16' a los 30° 24' de Latitud Norte y de los 92° 38' a los 109° 00' de Longitud Oeste. El análisis morfológico de diez atributos de la morfología foliar de cada uno de 241 individuos fue desarrollado mediante un análisis de Componentes Principales (CP), obteniéndose cuatro componentes que explicaron el 76.4 % de la variación total. Un análisis de varianza anidado (ANOVA) reveló diferencias significativas entre poblaciones (29.2 %), entre individuos dentro de poblaciones (39.2 %), y dentro de los individuos (31.6 %). El CP1 (variables relacionadas con el tamaño de hoja) explicó el 52.1 % de las diferencias entre poblaciones. Esta variación estuvo correlacionada negativamente con la latitud ($r = -0.86$; $P < 0.0001$), indicando un patrón de reducción clinal de sur a norte en el tamaño de la hoja. La precipitación media anual disminuyó y el índice anual de aridez (cociente de grados día $> 5^{\circ}\text{C}$ dividido por la precipitación anual), incrementó con la latitud. Lo anterior sugiere que este patrón clinal de variación morfológica es el resultado de respuestas adaptativas a condiciones ambientales. Adicionalmente, con la información morfológica fue estimada la diferencia mínima significativa entre poblaciones para el CP1, que fue convertida a una delineación preliminar de seis zonas latitudinales (cada una de 2° 30') para el movimiento de semillas de *Q. rugosa*, con propósitos de manejo y conservación.

El objetivo del análisis genético consistió en determinar la estructura genética de las poblaciones de *Quercus rugosa* a lo largo de su distribución geográfica en

México. Para esto se utilizaron seis microsatélites de cloroplasto altamente polimórfico de herencia materna. En una muestra de 205 individuos fueron encontrados 80 haplotipos, 42 de los cuales fueron encontrados en una sola copia en poblaciones únicas; del número total de haplotipos, solamente 22 fueron compartidos entre individuos de 20 poblaciones. La diversidad genética total (h_T) fue alta 0.987. La diversidad genética promedio dentro de las poblaciones (h_s) fue de 0.765, pero la diferenciación entre poblaciones fue baja ($G_{ST} = 0.225$). El valor de R_{ST} 0.296 fue no significativo, indicando ausencia de estructura filogeográfica. La distribución de los haplotipos en esta especie no mostró una clara estructuración geográfica y las poblaciones fueron distinguidas entre sí por la composición de sus haplotipos. Estos hallazgos podrían ser el resultado de procesos asociados con periodos de cambio climático tales como contracción y expansión de las poblaciones que habrían permitido colonizar nuevos ambientes a través de procesos de migración. Estos procesos pudieron ir acompañados de divergencia genética y posterior aislamiento. Los niveles de diversidad genética y su estructuración estarían a su vez reflejando eventos históricos acumulados en poblaciones que habrían permanecido a través del tiempo.

Los resultados de esta investigación en *Q. rugosa* muestran la falta de correlación entre los caracteres morfológicos y los genéticos, e indican que las características morfológicas de las hojas no son indicativos de los haplotipos identificados en las poblaciones. En otras palabras, los resultados del análisis morfológico indican la existencia de una clina morfológica asociada a un gradiente latitudinal, en respuesta principalmente a un gradiente climático (precipitación media anual e índice de aridez), y no a posibles eventos históricos evidenciados por los datos moleculares.

II. ABSTRACT

Mexico is a major center for diversification of the genus *Quercus*, with 161 species, of more than 500 described species for the genus, distributed in major mountain regions of the country. This thesis presents a morphological and genetic analysis of populations of *Quercus rugosa* throughout its natural range in Mexico (Sierra Madre Oriental, Sierra Madre Occidental, Sierra Madre del Sur, Sierra de Los Altos de Chiapas and Eje Volcánico Transversal).

The aim of this study was to understand the geographic structure of the morphological and genetic variation, and to infer its evolutionary history through to examine of the morphological and genetics variation and differentiation of *Q. rugosa* populations. This study included 25 natural populations of the species along a geographical gradient from the 16° 16' to 30° 24' North Latitude and from the 92° 38' to 109° 00' West Longitude. The morphological analysis of ten foliar characters for each individuals of 241, was developed through an analysis of Principal Component (PC), four components explained the 76.4% of the total variation. A nested analysis of variance (ANOVA) revealed significant differences among populations (29.2% average contribution to total variance for the four PCs), among individuals within populations (39.2%) and 31.6% was due to intra-individual variation. For PC1 (related to leaf size), 52.1% resulted from among populations differences. This variation was negatively correlated with latitude ($r = -0.86$, $P < 0.0001$), indicating a steep clinal reduction in leaf size from south to north. Mean annual precipitation and an annual aridity index (ratio of degree days $> 5^{\circ}\text{C}$ to annual precipitation) also significantly decreased and increased with latitude, respectively. It is suggested that the morphological cline is the result of plastic and / or adaptive responses to environmental conditions. Additionally, with the morphological information was estimated the magnitude of the least significant difference among populations for the CP1 and translated it into a preliminary delineation of six latitudinal zones (each with a width of $2^{\circ} 30'$) for the movement of *Q. rugosa* seeds with conservation and management purposes.

The goal of genetic analysis was to determine the genetic structure of populations of *Quercus rugosa* along their geographical distribution in Mexico. For this were used six highly polymorphic microsatellite regions of maternal inheritance (of chloroplast). In a sample of 205 individuals a total of 80 haplotypes

were detected, 42 of which were found only once in the total sample, of the total number of haplotypes, only 22 were shared between individuals from 20 populations. Total genetic diversity (h_T) was high 0.987. Mean genetic diversity within populations (h_s) was 0.765, but the differentiation among populations was low ($G_{ST} = 0.225$). The value of R_{ST} 0.296 was not significant, indicating the absence of phylogeographical structure. The distribution of the haplotypes in this species did not show a clear geographic structure and the populations were distinguished from each other by the composition of their haplotypes. These findings may result from processes associated with periods of climate change such as expansion and contraction of populations to be allowed to colonize new environments through processes of migration. These processes were accompanied by isolation and subsequent genetic divergence. The levels of genetic diversity and its structure would reflect historical events accumulated in populations that have would remained through time.

The results of this research in *Q.rugosa* shows the lack of correlation between morphological and genetic characters, and indicate that the morphological characteristics of the leaves are not indicative of the haplotypes identified in populations. In other words, the results of morphological analysis indicated the existence of a morphological cline associated with a latitudinal gradient, apparently in response to a climatic gradient (mean annual precipitation and aridity index), and not to possible historical events evidenced by molecular data.

III. INTRODUCCIÓN GENERAL

Descripción y clasificación del género Quercus

El género *Quercus* (encinos o robles) pertenece a la familia Fagaceae, orden Fagales; incluye unas 500 especies de árboles y arbustos localizadas principalmente en el hemisferio norte (Nixon, 1993; Manos *et al.*, 1999). Con frecuencia las especies del género dominan en bosques templados, subtropicales, tropicales, mesófilos y también se les encuentra en áreas xéricas (Rzedowski, 1986; Nixon, 1993; Manos *et al.*, 1999). Los estudios taxonómicos y filogenéticos de este género lo dividen en dos subgéneros, *Cyclobalanopsis* y *Quercus* (Nixon, 1993; Manos *et al.*, 1999). Este último, a su vez se subdivide en cuatro secciones: *Cerris*, *Lobatae* (encinos rojos), *Protobalanus* (encinos intermedios) y *Quercus* (encinos blancos). Las especies del subgénero *Cyclobalanopsis* se distribuyen en el sureste Asiático. Por su parte, la sección *Cerris* tiene una distribución Euroasiática y en el norte de África, en tanto que *Lobatae* se encuentra distribuida en Norteamérica. *Protobalanus* tiene una distribución limitada al oeste de Norteamérica y la sección *Quercus* se distribuye en Europa, Norteamérica y norte de África (Nixon, 1993; Manos *et al.*, 1999) (Fig. 1).

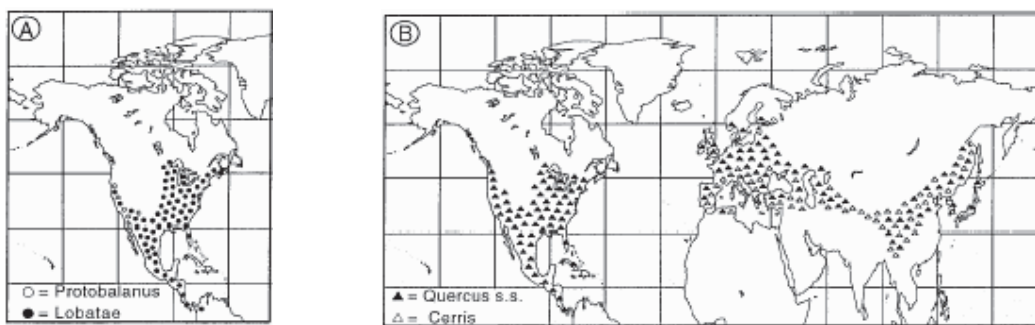


Fig. 1. Distribución general del subgénero *Quercus*. A) Secciones *Protobalanus* y *Lobatae*. B) Secciones *Quercus* y *Cerris*. Tomado de Manos *et al.* (1999).

El género *Quercus* incluye árboles y arbustos perenes y deciduos, que varían en tamaño de acuerdo a su historia de vida; los árboles maduros llegan a medir de 3 a 60 m de altura, los arbustos alcanzan de 0.3 a 5 m (Valencia y

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

Es un género con gran importancia económica, siendo intensamente utilizado a nivel local como fuente de leña, carbón, corcho y alimento, así como para la construcción de casas, barricas, muebles y herramientas, entre otros objetos (Zavala, 1990; Nixon, 1993; Valencia y Nixon, 2004). Además, en términos de su relevancia ecológica, la presencia de encinos reduce la erosión del suelo, participan en el mantenimiento del microclima, el reciclaje de nutrientes, en el balance hídrico; y biológicamente se asocian con una gran variedad de especies de bacterias, hongos, plantas, insectos, aves y mamíferos (Lewington y Streeter, 1993).

Biogeografía de Quercus

México es diverso en flora de origen templado por ubicarse en la porción sur de la región Neártica, lo cual favoreció la inmigración de elementos templados provenientes del norte (e.g. *Abies*, *Alnus*, *Fagus*, *Picea*, *Liquidambar*, *Pinus*, *Populus*, *Quercus*, *Ulmus*) (Rzedowski, 1965) durante el Mioceno (hace 24 millones de años), haciéndose más abundantes durante el Plioceno (hace 5 millones de años) y llegando hasta Centroamérica en una proporción decreciente de especies (Graham, 1999). Tales eventos de migración se vieron favorecidos significativamente por los cambios climáticos recurrentes del Terciario y Cuaternario (Graham, 1993). Sin embargo, las evidencias de polen y hojas fósiles de *Quercus* del Oligoceno inferior (hace 38 millones de años) de Puebla y Chiapas, indican que la historia de este género en México es aún más antigua (Valencia y Nixon, 2004).

Para el caso específico del género *Quercus*, Axelrod (1975) basado en evidencias fósiles, sugiere la existencia de relaciones evolutivas entre varias especies de *Quercus* que durante el Mioceno habitaron la región del suroeste de Estados Unidos y la región noreste de México. En el Cuadro 1 se enlistan las especies de encinos fósiles que habitaron California durante el Mioceno, de los que actualmente existen taxa relacionados en el suroeste de Estados Unidos y noreste y otras regiones de México. Así mismo, Axelrod (1975) hace consideraciones sobre los bosques de vegetación esclerófila, sugiriendo que estos se extendieron durante el Mioceno, desde California en Estados Unidos, hasta el este de México y que ahora son interrumpidos por las regiones desérticas de Mohave y Sonora, las cuales se fueron extendiendo después de cada periodo interglaciar. Estas evidencias señalan la cercanía filogenética entre algunas especies que habitan la región suroeste de los Estados Unidos y el norte de México.

Cuadro 1. Especies fósiles del género *Quercus* que habitaron en California, E.U. durante el Mioceno y taxa actuales con los que están relacionados (Axelrod, 1975).

California	SO de EU	NE de México	Otras regiones de México
<i>Q. mohavensis</i>		<i>Q. fusiformis</i>	
No descrita			<i>Q. brandegeei</i> (Baja California)
No descrita	<i>Q. emoryi</i>	<i>Q. emoryi</i>	
<i>Q. turneri</i>	<i>Q. grisea</i>		<i>Q. grisea</i> (Zacatecas)
No descrita		<i>Q. potosina</i>	

Los estudios paleo-palinológicos de la flora del territorio mexicano se circunscriben a las cuencas de México y Zacapu (Lozano-García y Xelhuantzi-López, 1997) y a Simojovel, Chiapas y Paraje Solo, Veracruz (Graham, 1999). Estos estudios registran la primera aparición de polen de encino en sedimentos lacustres, así como en estratos correspondientes al Mioceno. En los primeros, es

posible registrar los cambios climáticos, la actividad tectónica y volcánica, así como el impacto humano, siendo posible estimar en estos sitios la abundancia palinológica en función de los factores antes mencionados, durante las diferentes épocas geológicas de la Tierra. Estos bosques de pino-encino fueron característicos de las comunidades de plantas de las regiones montañosas de México durante el periodo Cuaternario, como es revelado por la presencia de grandes depósitos de polen de encino en los sedimentos lacustres (Lozano-García y Xelhuantzi-López, 1997). Así mismo, el registro de Chalco (cuenca de México), que data del final del Pleistoceno, sugiere la expansión de los bosques de pino y encino (Caballero-Miranda, 1997).

Encinos mexicanos

Actualmente el género *Quercus* en México, incluye un grupo de árboles y arbustos que habitan principalmente las zonas de climas templados y semihúmedos en las principales cadenas montañosas del país (Rzedowski, 1986; Nixon, 1993), formando bosques de *Quercus* y más comúnmente, bosques de *Pinus-Quercus*. Con frecuencia, varias especies de encino son encontradas localmente, no obstante, algunas de ellas pueden presentarse en grandes áreas como especies dominantes, e incluso formando bosques monoespecíficos. Cuando las poblaciones naturales de especies de la misma sección del género *Quercus* son encontradas en simpatría, con frecuencia hibridan (Manos *et al.*, 1999), lo que puede suceder aún entre especies morfológicamente diferentes (Spellenberg, 1995; Dumolin Lapégue *et al.*, 1999; Herrera-Arroyo, 2005), siendo posible observar la ocurrencia de individuos híbridos entre dos o más especies cuando la fenología de las especies se sobrepone en una misma zona de hibridación (Whittemore y Schaal, 1991; Dumolin Lapégue *et al.*, 1999; González-Rodríguez *et al.*, 2004a; Tovar y Oyama, 2004; Curtu *et al.*, 2007; Albarrán-Lara *et al.*, en preparación; Peñaloza-Ramírez *et al.*, en revisión), Estos individuos híbridos bajo condiciones específicas pueden permanecer y potencialmente retrocruzarse con las especies parentales aumentando la diversidad genética de éstas (Rieseberg, 1995; Arnold, 1997; Dumolin Lapégue *et al.*, 1999).

La geografía de México ha sufrido grandes cambios a través de su historia geológica, representando una gran riqueza de escenarios (Ferrusquía-Villafranca, 1993) donde ha transcurrido una parte importante de la historia evolutiva del

género *Quercus*. A nivel mundial, México ha sido reconocido como un centro importante de diversificación para este género por poseer el mayor número de especies de encinos (Rzedowski, 1986, Nixon, 1993). Se han reportado 161 especies de las cuales 76 especies pertenecen a la sección *Lobatae*, 81 especies a la sección *Quercus* y 4 especies a la sección *Protobalanus*; además, del total de especies, 109 son endémicas (Valencia, 2004). Un número importante de estas últimas no muestran relaciones filogenéticas cercanas con las especies distribuidas en el Este de los Estados Unidos (Nixon, 1993), por lo tanto, es posible que la mayoría de las especies mexicanas hayan evolucionado en territorio mexicano.

Estudios de variación morfológica en encinos

El estudio de las especies del género *Quercus* ofrece un interés particular por tratarse de un grupo taxonómicamente complejo, que muestra una gran variación morfológica intraespecífica, causada por factores físicos y bióticos, haciéndolo un grupo taxonómicamente complicado (Manos *et al.*, 1999; Bruschi *et al.*, 2003a; González-Rodríguez *et al.*, 2004b). Los encinos se caracterizan por presentar altos niveles de variación morfológica foliar entre las poblaciones de una especie (Bruschi *et al.*, 2003b); también es posible observar esta variación, entre árboles de la misma población y aún dentro del mismo individuo (Bruschi *et al.*, 2003a); en este último caso, la variación mostrada se da como una función de la posición de las hojas con respecto al factor luz-sombra. Así por ejemplo, en poblaciones italianas de *Quercus petraea*, las hojas más pequeñas pero más gruesas estuvieron en la parte superior externa del árbol, y las más grandes y delgadas en la parte sombreada más interna. Además, el tamaño y la forma de las hojas, son parámetros que difieren en plantas que crecen en diferentes ambientes en un gradiente geográfico (Bruschi *et al.*, 2003a). De igual manera, ha sido posible detectar un patrón de variación en el tamaño foliar como una respuesta a la altitud en *Quercus aquifolioides* (Li *et al.*, 2006), influenciado por la concentración de CO₂ atmosférico, sugiriendo que existe una zona altitudinal óptima para el crecimiento y desarrollo de la especie.

En general, se considera que los patrones de variación morfológica foliar en gradientes ambientales, son tanto el resultado de respuestas ecológicas como de diferenciación genética adaptativa entre y dentro de poblaciones (Gurevitch,

1992; Denk *et al.*, 2002; Bruschi *et al.*, 2003a, b; Himrane *et al.*, 2004; Jensen y Deans, 2004; Warren *et al.*, 2005; Hovanden y Vander Schoor, 2006). Estos patrones de variación son útiles para la planificación de programas de restauración ecológica y conservación, en ausencia de resultados de ensayos de procedencia.

Descripción de Quercus rugosa Née

Quercus rugosa es una especie arbórea o arbustiva de la sección *Quercus*, serie *Reticulatae* (Fig. 2), con la más amplia distribución geográfica del género en la República Mexicana (González, 1993). Se distribuye principalmente en la Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental, Sierra Madre del Sur, Sierra de los Altos de Chiapas y el Eje Volcánico Transversal (Fig. 3). Su distribución actual abarca desde el suroeste de los Estados Unidos, hasta Guatemala y Honduras en Centro América. En México, sus poblaciones se encuentran en el intervalo altitudinal de 1,700 hasta 3,550 m, según los datos de colecta de ejemplares de la especie depositados en el Herbario Nacional (MEXU, Universidad Nacional Autónoma de México) y en el herbario del Centro Regional del Bajío del Instituto de Ecología A.C. (IEB). Sus comunidades viven en ambientes con una variedad de climas (de 7.5° C a 24.8° C en temperatura media anual y de 317 mm a 2494 mm en precipitación anual) y de suelos (CONABIO, 2009). En primavera, las flores femeninas son polinizadas por el viento, las bellotas maduran en otoño y son dispersadas por gravedad así como por mamíferos pequeños, principalmente ardillas (*Spermophilus variegatus*) y ratones (*Peromyscus gratus*) (Bonfil y Soberón, 1999) y posiblemente algunas aves. El Cuadro 2 muestra los principales caracteres morfológicos de la especie *Quercus rugosa*.

Al ser una especie de amplia distribución geográfica en México, es un sujeto de estudio de interés por la riqueza de ambientes contrastantes en los que habita, así como por vivir en regiones geográficas con historias diferentes. Por lo tanto, esta especie es útil para explorar las causas de los patrones de variación morfológica y las dinámicas evolutivas espaciales y temporales dentro y entre poblaciones, así como para entender la historia reciente de sus poblaciones. No existen registros fósiles de *Q. rugosa* que pudieran ser útiles para conocer su área de distribución en el pasado; sin embargo, el registro fósil del género indica que su migración sucedió de las latitudes medias de Norteamérica hacia México y

Centroamérica durante el Mioceno (hace 24 millones de años), principalmente favorecida por los cambios climáticos (Graham, 1999). Este hecho hace razonable esperar que las poblaciones ancestrales en especies que se distribuyen desde el suroeste de E.U. hacia México, sean las del norte de su distribución actual.



Fig. 2. Ejemplar de herbario de la especie *Quercus rugosa*

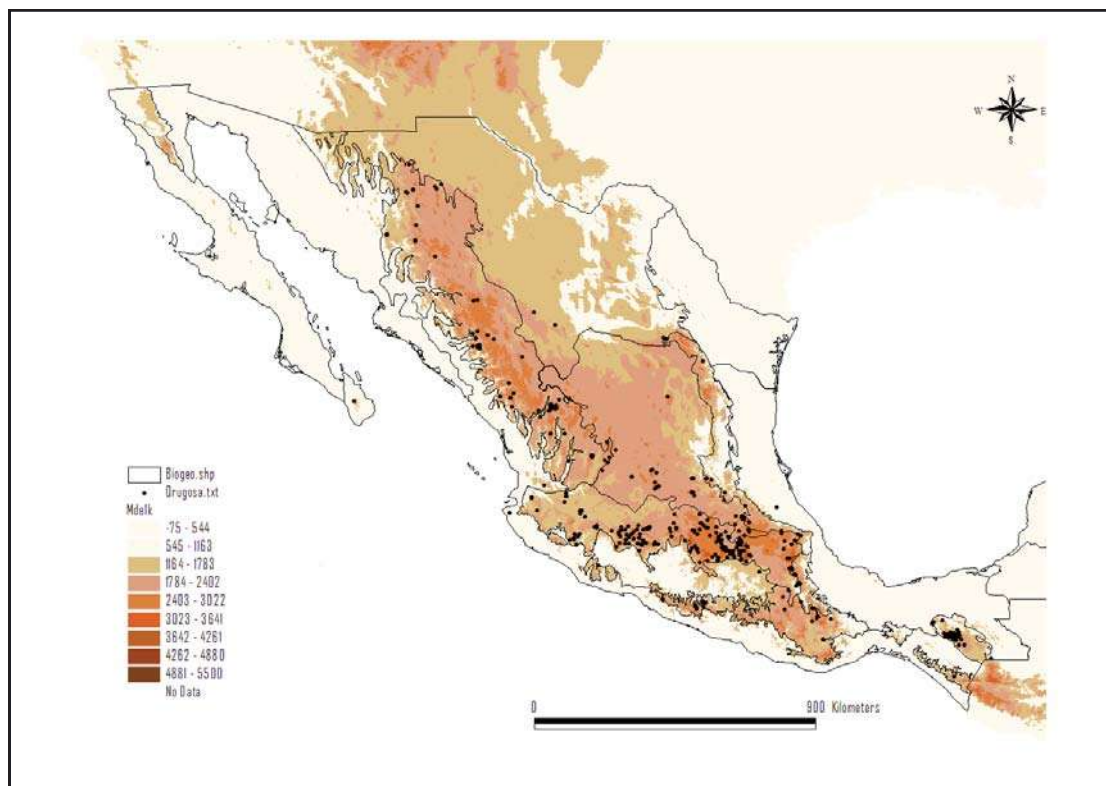


Fig. 3. Modelo altitudinal de México con la distribución de *Quercus rugosa* basado en datos de colecta depositados en la base de datos de la Comisión Nacional para el estudio y uso de la Biodiversidad (CONABIO).

Cuadro 2. Principales caracteres morfológicos que distinguen a la especie *Quercus rugosa* (McVaugh, 1974).

Carácter	Descripción
Ramillas	De 2 a 4 mm de grosor; las ramillas jóvenes son glandulares y tomentosas
Yemas	De 2 a 4 mm de longitud, ovoides e inconspicuas
Hojas maduras	Gruesas, rígidas, generalmente cóncavas, fuertemente rugosas, obovadas a elíptico obovadas o casi suborbiculares. De (5-) 8 a 15 (20) cm de largo y de (3-) 5 a 8 (-13) cm de ancho, 1.3 a 2 veces más largo que ancho. Son ampliamente obtusas o redondeadas en el ápice, irregularmente denticulado o serrado, dientes 5-15 en cada lado, algunos o todos portando mucrones de 1mm de largo. La superficie superior es lustrosa y glabra, y el envés muy piloso y glandular
Venas secundarias	De 8-12 en cada lado
Curso de las venas secundarias	Ascendentes pasando cada una directamente a un diente, o bifurcando y pasando a dientes adyacentes
Glándulas	En el envés, pelos glandulares rojizos, muy cortos
Nervaduras	Primaria y secundarias elevadas casi todo su diámetro sobre la superficie del envés, las terciarias formando redes
Tricomas	Ramificados hasta 1 mm de largo
Bellotas	Ovoides, frecuentemente angostas y puntiagudas, (10-) (15-25) mm de largo, 8-12 (-15) mm de diámetro

Zonificación para el movimiento de semilla

La deforestación es una causa importante de las pérdidas en la biodiversidad y en la diversidad genética dentro de las especies, lo que puede tener consecuencias severas en la conservación de los bosques (Sáenz-Romero

et al., 2003). No se tiene un registro de la magnitud de la superficie de distribución de la mayoría de las especies de encino, pero se presume que algunas tienen una distribución limitada (Rzedowski, 1986), haciéndolas altamente susceptibles de extinguirse ante un incremento en las tasas de deforestación. La fragmentación de los bosques a gran escala ocasiona la eliminación de poblaciones adaptadas localmente, causando la pérdida de diversidad genética dentro de las especies y reduciendo sus oportunidades para adaptarse a cambios futuros en el ambiente, como el calentamiento global (Sáenz-Romero *et al.*, 2003). Se ha demostrado que las poblaciones de coníferas se diferencian genéticamente a lo largo de gradientes ambientales, como resultado de presiones diferenciales de selección (Rehfeldt, 1991); por lo tanto, es razonable suponer que ocurre lo mismo con las poblaciones de encinos.

El manejo ecológico de los bosques de árboles templados requieren del entendimiento de sus patrones de variación adaptativa de las especies dominantes como se ha demostrado en *Picea glauca* (Moench) Voss. (Lesser y Parker, 2004), en varias especies de pinos (Rehfeldt, 1991; Sáenz-Romero *et al.*, 2003), en *Araucaria angustifolia* (Bert). (Sebbenn *et al.*, 2003) y en *Quercus robur* L. (Bogdan *et al.*, 2004). Estos estudios son necesarios para comprender cómo las poblaciones se adaptan a las diferentes condiciones ambientales de los sitios en donde crecen bajo la perspectiva actual del cambio climático.

Bajo este contexto, un aspecto importante para proponer adecuados programas de restauración de áreas degradadas mediante la reforestación de bosques en México, es la delimitación de zonas de producción y movimiento de semillas que define la distancia a la que puede llevarse la semilla de una especie o procedencia a plantación en donde tendría amplias expectativas de sobrevivencia, sin perder su nivel de productividad (Nienstaedt *et al.*, 1990). Tales zonas pueden delimitarse de manera preliminar con base en factores ambientales como son factores climáticos (temperatura y precipitación), edafológicos (características del suelo), topográficos (gradiente altitudinal) y de similitudes en la vegetación (Nienstaedt *et al.*, 1990; Sáenz-Romero y Clausen, 1991; Sáenz-Romero, 2004 a, b). En este trabajo exploramos un nuevo método de delimitación preliminar de zonas de producción y movimiento de semillas, basado en la información obtenida mediante el análisis de los atributos morfológico-foliares de la especie *Quercus rugosa* bajo el supuesto de que una proporción de la variación

morfológica entre poblaciones está relacionada con la variación genética adaptativa (Capítulo 1).

Posteriormente, y en estudios futuros, las zonas se deberán delimitar de manera definitiva a partir de resultados de ensayos de especies y de procedencias, que permiten separar el efecto ambiental del genético. Una vez establecidos y evaluados los ensayos de procedencia, los resultados obtenidos serán el criterio para aprobar o descartar la zonificación provisional previa. Estos ensayos son la prueba definitiva para aportar información indispensable para un desarrollo eficiente de los programas de conservación de los recursos genéticos de las poblaciones y/o especies, así como para el mejoramiento genético de especies forestales, tanto con fines de restauración ecológica como con fines de manejo de plantaciones comerciales.

Particularmente, la conservación de la diversidad genética de poblaciones naturales de encinos debe ser prioritario ya que es un género de árboles ecológicamente importante en las comunidades vegetales templadas de México (Rzedowski, 1986), con una alta riqueza de especies (Valencia, 2004); y cuyas poblaciones adaptadas localmente están siendo severamente afectadas por el cambio de uso del suelo y por la deforestación con fines de uso de la madera para la obtención de carbón y leña (Zavala, 1990). Por lo tanto, es apremiante que se lleven a cabo programas de conservación y manejo de bosques para contrarrestar la alta tasa de deforestación actual y disminuir el riesgo de pérdida de los recursos genéticos forestales (Sáenz-Romero *et al.*, 2003).

Importancia de los estudios de ecología molecular

El desarrollo de la Genética y de la Biología Molecular en las últimas décadas, abrió una amplia gama de posibilidades de escrutinio genético del mundo biológico, favoreciendo un incremento importante en el conocimiento de los procesos evolutivos que operan en los organismos vivos. Los estudios moleculares han revelado una cantidad ilimitada de variabilidad genética en los organismos, y esta ha sido muy útil para entender los procesos macroevolutivos que gobiernan la evolución de los grandes grupos (sobre el nivel de especie), así como los procesos microevolutivos (flujo de genes, deriva génica, mutación, selección natural) involucrados en la evolución de las poblaciones de una especie (Avice, 2000). El entendimiento preciso de los cambios en la secuencia de ADN a

través de la historia de los linajes genéticos, ha dado la pauta para conocer la historia de las poblaciones y su asociación a eventos geográficos, geológicos y climáticos históricos (Dumolin-Lapegue *et al.*, 1997; Soltis *et al.*, 1997; King y Ferris, 1998; Tremblay y Schoen, 1999; Petit *et al.*, 2002b). Específicamente, el estudio de los procesos microevolutivos de especies de animales y de plantas, ha tomado auge con el conocimiento del ADN mitocondrial (ADNmit) y de cloroplasto (ADNcp) (Avice, 1987; Avice, 2000), poniendo énfasis en los aspectos históricos de la distribución geográfica contemporánea de los linajes de genes, a partir de la estimación de los niveles de flujo de genes entre poblaciones e inferir sus niveles de conectividad, como una consecuencia del entorno ambiental histórico de las poblaciones de las especies.

En plantas, los marcadores moleculares útiles por mostrar los polimorfismos intraespecíficos, son la longitud de los fragmentos de restricción a partir de fragmentos de ADNcp amplificados por el método de reacción en cadena de la polimerasa, de sus siglas en inglés RFLP-PCR, las regiones microsatélite de cloroplasto, así como las secuencias de regiones específicas del ADNcp (Petit *et al.*, 2002a). Estas metodologías detectan variación en la secuencia de nucleótidos, denominándose haplotipo a las combinaciones particulares de RFLPs, de loci de microsatélites (Lewin, 1994), o a la variación de al menos un nucleótido en la secuencia de nucleótidos. Actualmente, existe un gran número de iniciadores de regiones de interés del ADNcp diseñados con base en la secuencia genómica de varias especies de plantas angiospermas (Weising y Gardner, 1999; Deguilloux *et al.*, 2003; Sebastiani *et al.*, 2004).

La variación geográfica de los haplotipos de origen citoplásmico junto con la aplicación de la teoría de la coalescencia, favorecieron el surgimiento y el desarrollo de la Filogeografía. Esta área de estudio analiza la distribución geográfica de los linajes de genes y sus relaciones genealógicas dentro y entre especies muy relacionadas (Avice, 2000). Tales genealogías representan la secuencia histórica de los eventos mutacionales que acompañan la diferenciación de los linajes maternos (Avice, 1987). Esta historia puede conformar patrones filogeográficos que se identifican por poblaciones emparentadas que muestran congruencia en su distribución geográfica; de igual manera, el estudio filogeográfico implica la interpretación de la falta de congruencia entre la

distribución geográfica de los haplotipos y sus relaciones genealógicas (Schaal *et al.*, 1998).

Las características de los marcadores citoplásmicos que los hacen útiles para estudios filogeográficos de plantas son: 1) herencia materna del genoma de cloroplasto en angiospermas (Dumolin *et al.*, 1995), 2) ausencia de recombinación sexual, haciendo posible construir filogenias de linajes genéticos (Schaal *et al.*, 1998), y 3) forma de dispersión, útil para identificar la dispersión de semillas y su dirección, al quedar registradas en el tiempo y en el espacio, aportando información para la inferencia de las dinámicas de migración y colonización en el pasado de las poblaciones (Petit *et al.*, 1997). Este punto es de particular importancia para identificar la dispersión de semillas y su dirección, al quedar registradas en el tiempo y en el espacio, aportando información para la inferencia de las dinámicas de migración y colonización en el pasado de las poblaciones (Petit *et al.*, 1997). Una particularidad del ADNcp es su tasa baja de evolución (Palmer, 1985), favoreciendo la identificación de los patrones de estructura de las poblaciones que reflejan la historia de dispersión de semillas de la especie sobre largos periodos de tiempo (Cavers *et al.*, 2003).

Estudios de ecología molecular en encinos

Son varias las especies del género *Quercus* de Europa y Norteamérica que han sido estudiadas bajo el enfoque filogeográfico (Petit *et al.*, 2002 b Magni *et al.*, 2005; Grivet *et al.*, 2006). De igual manera, cuatro encinos rojos mexicanos de dos complejos híbridos, también han sido analizados (González-Rodríguez *et al.*, 2004b; Tovar-Sánchez *et al.*, 2008). Estos estudios revelan que el género *Quercus* se caracteriza por presentar bajos niveles de diversidad de ADNcp dentro de las poblaciones (h_S), altos niveles de diversidad total (h_T) e índices altos de diferenciación genética entre todas las poblaciones (G_{ST}) (modelo de alelos infinitos) y (N_{ST}) (modelo de mutación stepwise). La comparación de estos coeficientes de diferenciación genética indicó que los valores de N_{ST} fueron significativamente mayores que los valores de G_{ST} , al menos en seis especies estudiadas en Europa y en las especies de Norteamérica. Estos resultados señalan la existencia de estructura filogeográfica, indicando que la diferenciación genética entre regiones geográficas es debida a la divergencia entre haplotipos (Petit *et al.*, 2002 b Magni *et al.*, 2005; Grivet *et al.*, 2006). Sin embargo, las

proporciones que guardan entre sí los índices de diferenciación genética entre todas las poblaciones (G_{ST} y N_{ST}), así como los niveles de diversidad total y diversidad dentro de poblaciones, van variando siguiendo un fuerte patrón latitudinal, señalando a esta variable geográfica como un componente importante en la historia evolutiva de las poblaciones.

La información de las relaciones filogenéticas de los haplotipos y su distribución espacial corroboraron la existencia y localización de refugios, así como de las rutas de recolonización postglacial en el continente europeo, propuestos primeramente con base en los registros de polen fósil. En varios de los trabajos mencionados, el análisis filogenético entre haplotipos ha permitido discernir el número de linajes genéticos involucrados en la migración y recolonización del territorio al final del último máximo glacial (Petit *et al.*, 2002a; Magni *et al.*, 2005).

Los estudios disponibles sobre las poblaciones de árboles de origen templado de latitudes medias indican un efecto menos severo de los cambios climáticos del Pleistoceno sobre estas comunidades, sin evidencias de confinamiento en sitios específicos (Cannon y Manos, 2003; González-Rodríguez *et al.*, 2004b) o de grandes extinciones, en comparación con lo ocurrido a las poblaciones de otras especies de mayores latitudes. Las evidencias palinológicas de fluctuación altitudinal de las comunidades de plantas en la región central de México, indican que éstas migraron hacia menores altitudes (Lozano-García *et al.*, 2005) ante el avance del glacial en el Nevado de Toluca durante el Pleistoceno (hace 2 millones de años a 10 000 años), mientras que durante los periodos cálidos la migración pareció ocurrir hacia mayores altitudes (Toledo, 1982; S. Zamudio, comunicación personal). Por consiguiente, se espera que la diferenciación genética en estos casos, refleje el resultado de los periodos de migración, expansión y retracción recurrentes, así como de los cambios en la magnitud del flujo de genes dentro y entre poblaciones. La suma de los eventos espaciales y temporales que operaron bajo este escenario se desconoce. Hacen falta estudios encaminados a entender con mayor aproximación, el impacto de la historia climática sobre las comunidades de plantas de latitudes medias.

Esta tesis doctoral está formada por dos capítulos.

En el capítulo 1: “Foliar morphological variation in the white oak *Quercus rugosa* Née (Fagaceae) along a latitudinal gradient in Mexico: Potential implications for management and conservation”, se presenta un análisis de la variación morfológica de caracteres foliares haciendo énfasis a nivel de población para identificar patrones de variación a lo largo del gradiente latitudinal de su distribución natural en México; así mismo, se analizó la asociación de esta variación a variables climáticas. La variación morfológica está relacionada a factores ambientales, principalmente de índole climático y la comprensión de cómo está distribuida entre poblaciones puede ayudar a dilucidar los factores que la causan. Finalmente, los datos fueron utilizados para desarrollar provisionalmente una zonificación para el movimiento de semillas.

El capítulo 2: “High genetic diversity revealed by chloroplast microsatellites in natural populations of *Quercus rugosa* Neé (Fagaceae) in Mexico”, se refiere a un análisis de genética de poblaciones, utilizando 6 regiones microsatélite de herencia materna. Se estimaron los niveles de diversidad genética y el índice de diferenciación genética entre las poblaciones de *Q. rugosa* y se determinó la estructura filogeográfica, como una primera aproximación en el entendimiento de la historia de las poblaciones de esta especie de encinos.

IV. HIPÓTESIS

1. Se espera que *Quercus rugosa* exhiba niveles altos de variación fenotípica foliar, debido a la amplitud de su distribución geográfica y a los ambientes diversos en los que habitan sus poblaciones.
2. *Quercus rugosa* presentará niveles altos de diversidad genética que reflejarán los efectos acumulados de los cambios climáticos del Pleistoceno. La distribución de la diversidad no evidenciará contracción reciente de sus poblaciones a alguna región geográfica.

V. OBJETIVOS

Objetivo general:

El objetivo general de la tesis es identificar, describir y explicar el patrón de variación geográfica de caracteres morfológicos foliares y moleculares de *Quercus rugosa* Née a través de su distribución natural en México.

Objetivos particulares:

1) Contribuir al conocimiento de la variación morfológica foliar entre y dentro de poblaciones de *Q. rugosa* y su asociación a gradientes latitudinales y climáticos.

2) Desarrollar una zonificación provisional para la producción y colecta de semillas para las poblaciones de *Q. rugosa*, como una herramienta para planificar la colecta y movimiento de semillas en programas de restauración ecológica y conservación.

3) Describir la diversidad genética de las poblaciones de *Q. rugosa* con marcadores moleculares de herencia materna a lo largo de su distribución geográfica.

4) Determinar la estructura filogeográfica con el fin de entender el impacto de los eventos históricos sobre la cantidad y la distribución de la diversidad genética de *Q. rugosa* en México.

VI. RESULTADOS

CAPÍTULO 1

Foliar morphological variation in the white oak *Quercus rugosa* Née
(Fagaceae) along a latitudinal gradient in Mexico: Potential
implications for management and conservation.¹

Dolores Uribe-Salas, Cuauhtémoc Sáenz-Romero, Antonio González-
Rodríguez, Oswaldo Téllez-Valdéz and Ken Oyama

Resumen

Quercus rugosa Née (sección *Quercus*) se distribuye desde el suroeste de Estados Unidos hasta Honduras. Este estudio caracteriza la variación de la hoja a través de la distribución de la especie en México. Diez caracteres morfológicos fueron analizados en cada uno de los 241 individuos de 25 localidades. Un análisis de componentes principales resolvió cuatro componentes principales (CP) que explicaron el 76.4% de la variación total. Un análisis de varianza anidado reveló diferencias significativas entre poblaciones (29.2 de contribución promedio a la varianza total para los cuatro CP) y entre árboles dentro de poblaciones (39.2%), mientras que el 31.6% fue debido a la variación dentro del individuo. Para el CP1 (relacionado al tamaño de hoja), 52.1% resultó de diferencias entre poblaciones. Esta variación estuvo negativamente correlacionada con la latitud ($r = -0.86$; $P < 0.0001$), indicando una reducción clinal en el tamaño de la hoja de sur a norte. La precipitación media anual y un índice de aridez decreció e incrementó significativamente con la latitud, respectivamente. Lo anterior sugiere que la clina morfológica es el resultado de respuestas plásticas y/o adaptativas a

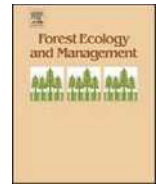
¹ Este capítulo fue publicado como artículo científico en la revista *Forest Ecology and Management* 256: 2121-2126 (2008).

las condiciones ambientales, y es indicativo de diferencias latitudinales ecofisiológicas adicionales entre las poblaciones de *Q. rugosa*. Adicionalmente, estimamos la magnitud de la diferencia mínima significativa entre poblaciones para el CP1 para ser traducida a una delimitación de seis zonas latitudinales (cada una con un intervalo de 2° 30'), a ser consideradas como zonas preliminares para el movimiento de semillas de *Q. rugosa* con propósitos de manejo y conservación, incluyendo manejo en respuesta al calentamiento global.



Contents lists available at ScienceDirect

Forest Ecology and Management

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

Foliar morphological variation in the white oak *Quercus rugosa* Née (Fagaceae) along a latitudinal gradient in Mexico: Potential implications for management and conservation

Dolores Uribe-Salas^{a,b}, Cuauhtémoc Sáenz-Romero^b, Antonio González-Rodríguez^a,
Oswaldo Téllez-Valdéz^c, Ken Oyama^{a,*}

^a Centro de Investigaciones en Ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Antigua carretera a Pátzcuaro No. 8701, col. ExHacienda de San José de la Huerta, Morelia, C.P. 58190, Michoacán, Mexico

^b Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Km. 9.5 Carr. Morelia-Zinapécuaro, Tarímbaro, C.P. 58880, Michoacán, Mexico

^c Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Av. De los Barrios 1, col. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, C.P. 54090, Estado de México, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 January 2008

Received in revised form 1 August 2008

Accepted 4 August 2008

Keywords:

Quercus rugosa

Foliar morphological variation

Leaf size

Phenotypic cline

Annual moisture index

Seed zoning

ABSTRACT

Quercus rugosa Née (section *Quercus*) has a distribution from the southern United States to Honduras. This study characterized leaf variation across the whole distribution of the species in Mexico. Ten foliar morphometric characters were scored in each of 241 individuals from 25 localities. A principal component analysis resolved four principal components (PCs) that explained 76.4% of the total variation. A nested analysis of variance revealed significant differences among populations (29.2% average contribution to total variance for the four PCs) and among-trees within populations (39.2%), while 31.6% was due to intra-individual variation. For the first PC (related to leaf size), 52.1% resulted from among population differences. This variation was negatively correlated with latitude ($r = -0.86$; $P < 0.0001$), indicating a steep clinal reduction in leaf size from south to north. Mean annual precipitation and an annual aridity index also significantly decreased and increased with latitude, respectively. It is suggested that the morphological cline is the result of plastic and/or adaptive responses to environmental conditions, and indicative of further ecophysiological latitudinal differences among *Q. rugosa* populations. Additionally, we estimated the magnitude of the least significant difference among populations for the first PC and translated it into a delineation of six latitudinal zones (each with a width of $2^{\circ}30'$), to be considered as preliminary zones for the movement of *Q. rugosa* seeds with management and conservation purposes, including management in response to global warming.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The characterization of geographical patterns of phenotypic variation in natural plant populations is a fundamental first step towards suggesting hypotheses about possible patterns of genetic variation, adaptive significance of specific characters, and plastic responses to environmental gradients (Hedrick, 2006; Ohsawa and Ide, 2007). In several tree species, significant correlations between variation in foliar attributes and specific environmental factors have been shown (Balaguer et al., 2001; Sisó et al., 2001; Corcuera et al., 2002; Bruschi et al., 2003a; Cardillo and Bernal, 2006; Li et al.,

2006; Sack et al., 2006). Such correlations help to understand what are the key environmental factors that influence plant physiology and morphology (Traiser et al., 2005), and in several cases are consistent enough to be used as the basis for paleoclimate reconstructions from leaf fossil remains (Royer and Wilf, 2006; Martinetto et al., 2007; Uhl et al., 2007).

The genus *Quercus* is a group of great importance for understanding the factors that determine foliar morphological variation, due to its particularly high levels of variation at different levels: among species, among populations, among-trees and within-individuals (Bruschi et al., 2003a,b; González-Rodríguez and Oyama, 2005; Himrane et al., 2004; Li et al., 2006; Sack et al., 2006; Tovar-Sánchez and Oyama, 2004). It is in general considered that such associations between the variation in morphological characters and the environmental variation result from plastic

* Corresponding author. Tel.: +52 443 322 2704; fax: +52 443 322 2719.
E-mail address: akoyama@oikos.unam.mx (K. Oyama).

responses (phenotypic plasticity) and/or from adaptive genetic differentiation among and within plant populations (Gurevitch, 1992; Balaguer et al., 2001; Denk et al., 2002; Bruschi et al., 2003a,b; Himrane et al., 2004; Warren et al., 2005; Hovenden and Vander Schoor, 2006).

Quercus rugosa Née is a white oak that has a great ecological importance in Mexico, because it is one of the dominant species in many mountainous regions (Rzedowski, 1986), at altitudes that fluctuate in a wide range between 1700 and 3550 m. Its latitudinal distribution ranges from approximately 15° LN (Guatemala and Honduras, in Central America) to 31° LN (southern United States) (Valencia, 2004). Throughout its area of distribution the species exhibits ample variation in the shape and size of the leaves. In comparison with other oaks with more restricted distributions, *Q. rugosa* can be expected to exhibit greater levels of genetic and phenotypic variation, due to the amplitude of its distribution and to the diverse environments in which it lives. At least a part of the observed morphological variation could be associated to variation in environmental factors, as a result of plastic responses and/or adaptive differentiation.

For the development of appropriate management and conservation programs that include reforestation operations, it is recommendable to define zones for seed production, collection and movement, aimed to appropriately match the genotypes with the environments (e.g., Matyas and Yeatman, 1992; Savva et al., 2007). The expected future uncoupling between plant populations and the environments to which they are adapted, as result of climate change (Ledig and Kitzmiller, 1992; Téllez-Valdéz and Dávila-Aranda, 2003; Thomas et al., 2004), makes it even more urgent to understand the patterning of genetic variation among-tree populations and to delineate seed zones (Sáenz-Romero et al., 2003, 2006). However, since there are not available results from provenances tests for most of Mexican forest tree species (including *Q. rugosa*), an alternative could be a provisional delineation of seed zones based on phenotypic variation, based on the premise that at least part of the phenotypic variation among populations is related to the adaptive genetic variation (Gurevitch, 1992; Denk et al., 2002; Jensen and Deans, 2004; Tilki and Alptekin,

2005; Warren et al., 2005; Hovenden and Vander Schoor, 2006), and that a provisional zoning is better than the absence of criteria for seed movement (Sáenz-Romero et al., 2006).

In this study, we aimed at contributing to the knowledge of the foliar morphological variation among and within populations of *Q. rugosa*, and its association to latitudinal and climatic gradients. Additionally, the results of this study were used to make a preliminary delineation of latitudinal seed zones, as a temporary planning tool for seed collection and seed movement in management and conservation programs.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection and morphological data

Twenty-five populations were sampled, mostly covering the north–south entire range of the distribution of *Q. rugosa* in Mexico. Geographical coordinates, altitude, mean annual temperature and mean annual precipitation corresponding to each collection site are presented in Table 1. A total of 241 adult trees were sampled.

Ten foliar morphological variables were measured in 10 leaves chosen at random in each one of the collected individuals: petiole length (PL), petiole diameter (PD), lamina length (LL), width at a third of the leaf from the apex (WHA), distance from the base of the leaf to the first mucro (BFM), number of mucros (NM), number of veins on the left side of the lamina (LNV) and diameter of the mid vein (DMV). In addition, two ratios between variables were calculated (MW/LL and PL/LL), since ratios relate to shape rather than size variation and may thus provide additional information (Framptom and Ward, 1990).

2.2. Climate variables

Climate variables for the 25 collection sites were obtained using the approach of bioclimatic modeling implemented in the ANUCLIM program (Houlder et al., 2000; Hutchinson and Gessler, 1994). Climate surfaces (coefficients of monthly averages of the climate variables at fixed points within the region) were obtained

Table 1

Locality number and name, state, code name, altitude, geographical coordinates, mean annual temperature (MAT) and mean annual precipitation (MAP) for the collecting sites

Locality	State	Code	Altitude (m)	Lat N	Long W	MAT (°C)	MAP (mm)
1 Tlalpujahua	Michoacan	TlalMich	2617	19°46'	100°12'	13.4	778.3
2 Jilotepec	Mexico	JilotMex	2754	19°59'	99°36'	13.8	686.7
3 Real del Monte	Hidalgo	RealMHgo	2776	20°08'	98°40'	12.5	592.5
4 Ignacio Zaragoza	Puebla	IZaraPue	2615	19°42'	97°35'	13.3	495.0
5 Perote	Veracruz	PerotVer	2556	19°23'	97°15'	12.2	421.0
6 Terrenate	Tlaxcala	TerrTlax	2750	19°30'	97°54'	12.9	604.2
7 Amanalco	Mexico	AmanaMex	2616	19°13'	100°03'	14.4	919.2
8 Joquicingo	Mexico	JoquiMex	2516	19°01'	99°33'	14.4	883.3
9 Distrito Federal	DF	DFSur	2751	19°13'	99°08'	13.7	845.0
10 Tecoltepec	Puebla	TecolPue	2550	18°19'	97°03'	13.8	1103.3
11 Mariano Escobedo	Veracruz	MaEscVer	2660	18°56'	97°12'	12.3	745.0
12 Corral de Piedras	Oaxaca	CoPieOax	2724	17°19'	97°54'	17.9	817.5
13 S. J. Mixtepec	Oaxaca	SJMixOax	2230	16°16'	96°18'	14.9	931.7
14 San Cristóbal	Chiapas	SCriChis	2200	16°44'	92°38'	14.6	1003.3
15 Santa Rosa	Guanajuato	SRosaGto	2650	21°05'	101°11'	13.3	664.2
16 Erongarícuaro	Michoacan	EronMich	2050	19°13'	101°42'	18.7	955.8
17 Bolaños	Jalisco	BolanJal	2150	21°41'	103°48'	17.1	574.2
18 Papasquiario	Durango	PapasDgo	2450	25°02'	105°25'	13	511.7
19 Cusarare	Chihuahua	CusaChih	2250	27°38'	107°33'	11.7	599.2
20 Basaseachic	Chihuahua	BasaChih	1980	28°10'	108°13'	14.5	743.3
21 Yécora	Sonora	YecorSon	1700	28°27'	109°00'	13.4	699.2
22 Ignacio Zaragoza	Chihuahua	IZarChih	1975	29°46'	107°39'	13.6	329.2
23 Casas Grandes	Chihuahua	CaGrChih	2225	30°24'	108°23'	12.3	366.0
24 Saltillo	Coahuila	SaltCoah	2292	25°20'	100°57'	14.5	388.3
25 Caborachic	Chihuahua	CabChih	2350	26°49'	106°52'	13.6	424.2

from long-term monthly averages of minimum and maximum temperatures and precipitation registered in more than 6200 standard weather stations of Mexico. The estimated average errors for the surfaces were between 8% and 13% for precipitation and 0.4–0.5 °C for temperature; similar to the instruments of standard weather stations (Nix, 1986). From the monthly surfaces of average temperature and precipitation we generated surfaces for 19 climatic parameters with biological meaning. Values for the 25 sampled localities were obtained for mean annual temperature (MAT) (°C), mean monthly temperature (MMT) (°C) and mean annual precipitation (MAP) (mm) (Table 1). Then, we estimated degree days >5 °C (DD5) from the average monthly temperatures (mean, maximum and minimum) using regression models previously developed by Rehfeldt (2006). Finally, we estimated an annual aridity index (AAI), as the ratio of degree days >5 °C to the mean annual precipitation (AAI = DD5/MAP). Smaller values of AAI index mean moist and cold sites, and larger values mean dry and warm sites. The climatic parameters MAT, MAP, DD5 and AAI are among those that have the largest influence on plant distribution (Tuhkanen, 1980; Rehfeldt et al., 2003; Rehfeldt, 2006).

2.3. Statistical analysis

A principal component analysis (PCA) was performed with the 10 morphological variables. Variance in leaf morphology among populations and among individuals within populations was determined using as synthetic morphological variables the first four principal components (PC1 to PC4) that resulted from the PCA, by conducting an analysis of variance for a statistical model with individuals (trees) nested in populations and leaves nested in individuals. *F*-tests for each source of variation were conducted using the appropriate error terms, considering populations and individuals as random effects. Linear regression analyses were used to investigate the degree of association between the synthetic variables and latitude, between the synthetic variables and the climatic variables, and between the climatic variables and latitude.

Finally, we estimated the least significant difference (LSD) among populations for the first principal component (PC1) scores, since this synthetic variable was the most meaningful. Then, the previously obtained linear regression model between latitude and the PC1 scores was used to translate the LSD value into latitudinal intervals. In other words, we estimated the latitudinal interval that must separate populations before one can be reasonably certain of significant differentiation between populations (Rehfeldt et al., 1999; Sáenz-Romero et al., 2006). Such difference was used to preliminarily delineate latitudinal zones for seed production, collection and movement. The statistical analyses were made with SAS (1999).

3. Results

The PCA resolved four principal components (PC) which explained 76.4% of the total variance (Table 2). The values of the eigenvectors showed that the higher positive loadings on the first PC (PC1) corresponded to several variables related to leaf size (lamina length, distance to first mucro, petiole diameter, vein diameter, and width at one third from the leaf base, Table 2). The PC2 was related to petiole length, the PC3 to leaf width, and the PC4 to the number of mucros and veins (Table 2). The analysis of variance made on the scores of these four principal components showed that there are significant differences in the foliar morphology among populations and among-trees within populations for the four principal components examined (Table 3). The partitioning of the variance, expressed as average contribution to the total variance, was 29.2%

Table 2

Principal component analysis for ten foliar morphological characters in *Q. rugosa*

	PC1	PC2	PC3	PC4
Eigenvalues	3.1	1.8	1.6	1.1
Percent (%)	30.1	18.2	16.2	11.1
Cumulative percent (%)	30.1	49.1	65.3	76.4
Foliar trait	Eigenvectors			
Lamina length	0.506	−0.006	0.026	0.125
Petiole length	0.099	0.682	0.172	0.193
Distance from leaf base to first mucro	0.365	0.172	0.067	− 0.462
Petiole diameter	0.404	0.001	−0.002	0.235
Mid vein diameter	0.395	−0.026	−0.127	0.099
Width at 1/3 from the leaf base	0.371	−0.110	0.510	0.062
Number of mucros	−0.212	−0.209	0.198	0.678
Number of veins	0.226	0.072	− 0.450	0.437
Maximal width/Lamina length	−0.026	−0.151	0.652	0.034
Petiole length/Lamina length	−0.218	0.649	0.149	0.113

Variables with high loadings on each of the principal components are indicated boldfaced.

among populations, 39.2% among-trees within populations and 31.6% within trees (also the error term). The greatest proportion of variance in the PC1 was explained by differences among populations (52.1%), followed by among-tree variation within populations (26.7%). In contrast, the greatest proportion of variance in the PC2 and PC3 (47.1% and 45.1%, respectively) was accounted for by among-tree variation within populations. Finally, the PC4 showed slightly more variability at the within-individual level (39.6%) than at the among-tree level (38%).

Regression analysis of morphological variables against geographic and climatic variables indicated that there is a highly significant negative correlation between the population average score values of the first principal component (PC1) and the latitude of the population ($r = -0.86$; $P < 0.0001$, Fig. 1A), suggesting a steep pattern of south–north clinal variation for the leaf morphological variables synthesized in the PC1, according to which populations from the south of Mexico would have larger leaf size than northern populations. PC1 was also significantly correlated to the climatic variables annual aridity index ($r = -0.59$; $P = 0.002$; Fig. 1B) and mean annual precipitation ($r = 0.56$; $P = 0.0035$, Fig. 1C).

Regression analyses between climatic and geographic variables indicate that annual precipitation and annual aridity index varied significantly with latitude ($r = -0.66$, $P = 0.0003$ and $r = 0.60$, $P = 0.0016$, respectively), indicating less precipitation and more aridity in northern regions. Interestingly, degree days ($r = -0.23$; $P = 0.27$) and mean annual temperature ($r = -0.11$; $P = 0.58$) did not change significantly along the latitudinal gradient, perhaps in part because there is a negative correlation between the localities' latitude and altitude ($r = -0.60$; $P = 0.0015$), which may balance temperature related variables.

Table 3

Partitioning of variance (as percentage) by hierarchical level for the first four principal components of foliar morphological variation in *Q. rugosa*

Trait	Population		Individual (population)		Error
	%	P	%	P	
PC1	52.1	0.0001	26.7	0.0001	21.2
PC2	19.3	0.0001	47.1	0.0001	33.6
PC3	22.9	0.0001	45.1	0.0001	32.0
PC4	22.5	0.0001	38.0	0.0001	39.6
Average	29.2		39.2		31.6

Variance components and significance levels (*P*) were determined with a nested ANOVA.

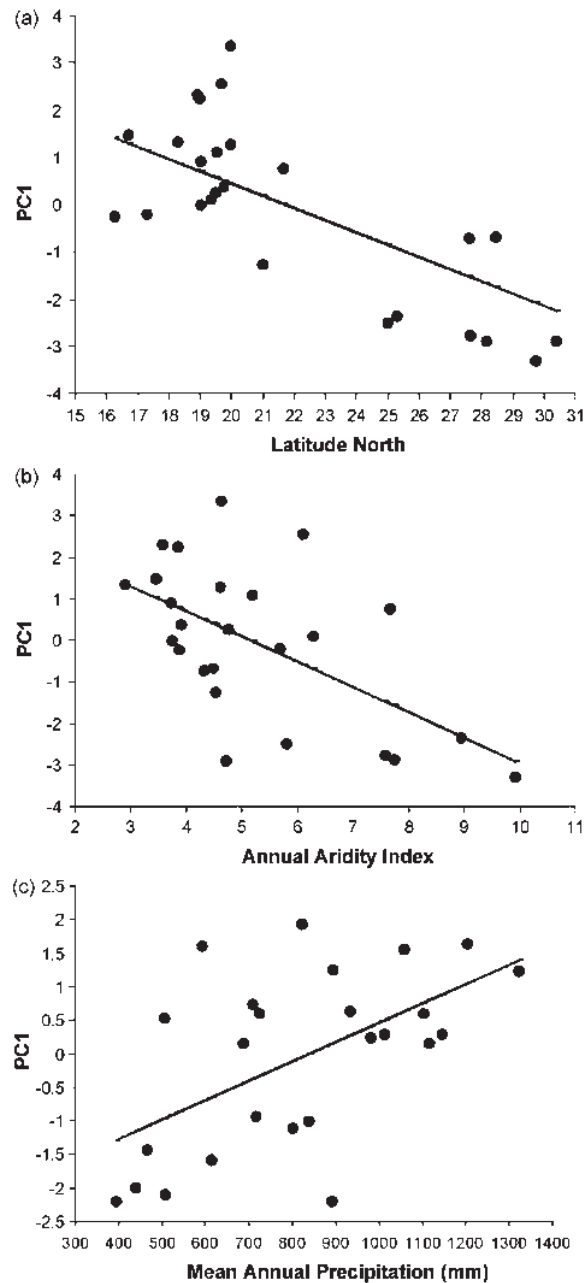


Fig. 1. (A) Linear regression between population averages of individual scores on the first principal component (PC1) and latitude. (B) Linear regression between population averages of individual scores on the first principal component and annual aridity index values. (C) Linear regression between population averages of individual scores on the first principal component and mean annual precipitation.

Since the PC1 showed a strong correlation with latitude and climate, a preliminary delimitation of seed zones for *Q. rugosa* was made based on the foliar morphological variation synthesized by this variable. The LSD value ($\alpha = 0.2$) for the PC1 was determined to be 0.57; it was translated to a value of $2^{\circ}12'$ of interval of latitude, and then it was extended to $2^{\circ}30'$ for simplicity and so determined as the width for each latitudinal zone of seed movement for *Q. rugosa*. The six zones along the distribution of the species in Mexico that resulted from this analysis are shown in Fig. 2.

4. Discussion

The pronounced north–south latitudinal clinal pattern of morphological foliar variation indicates a strong phenotypic differentiation among populations, likely in response to environmental gradients of moisture. Two relevant climatic variables, mean annual precipitation and the annual aridity index were shown to change significantly along the geographical gradient. The annual aridity index, for example, showed a very broad array of values along the north–south distribution (values from 3 to almost 10, Fig. 1B). Significant variation in mean annual temperature was also expected, even though this was not observed, probably at least in part because *Q. rugosa* populations occur at progressively lower altitudes as the latitude increases, potentially reflecting some degree of conservatism of the species with respect to temperature or other environmental variables associated with it.

The pattern of morphological variation indicates that the leaf size is larger at southern, more moist and less arid sites, whereas leaf size is gradually smaller towards northward more dry and arid sites. A similar south to north reduction in leaf size has been observed in Mexico for other oak species (i.e., *Quercus oleoides*, A. González-Rodríguez, unpublished data) and also reported for *Rhizophora mangle* (Rico-Gray and Palacios-Ríos, 1996), which in the latter case was explained as a result of decreasing temperature and precipitation with latitude. More generally, leaf area and specific leaf area (ratio of leaf area to leaf dry mass) are among the foliar characteristics that more often have been observed to co-vary with precipitation and/or temperature in several plant species and regions of the world (Sokal et al., 1986; Jonas and Geber, 1999; Royer et al., 2005; Calagari et al., 2006; Li et al., 2006). In comparison with previous studies conducted on other oak species (Bruschi et al., 2003a,b; González-Rodríguez and Oyama, 2005), our results revealed a stronger differentiation among populations (52.1% of the total variation) for the morphological variation synthesized by the PC1. This large differentiation could result from plastic responses to the diverse environments that populations of *Q. rugosa* occupy along their natural distribution in Mexico, but it may also entail some degree of adaptive genetic differentiation among populations. In other words, it is likely that the reduction in leaf size towards the northern areas of distribution is a mechanism of adaptation of *Q. rugosa* populations to sites with increasing aridity; such mechanism could be either a phenotypic plastic response (Parkhurst and Loucks, 1972; Hoff and Rambal, 2003), or result from adaptive genetic differentiation among populations (Ducousso et al., 1996; Jensen, 2000; Jensen and Deans, 2004; Jensen and Hansen, 2008). Unfortunately, our study cannot distinguish the amount of variation due to phenotypic plastic responses from that due to genetic differentiation, since provenance test results would be needed to do so.

Nevertheless, the large variation found among populations might also suggest that there could be other factors influencing the pattern of phenotypic variation in *Q. rugosa*, besides the climatic variables that we considered. In particular, the correlation between the PC1 and latitude was much stronger than between the PC1 and mean annual precipitation, or PC1 and annual aridity index. Interestingly, in the study of *R. mangle* (Rico-Gray and Palacios-Ríos, 1996) the correlation between leaf area and latitude was also stronger than among leaf area and total annual precipitation. Clinal variation may not only result from selection along environmental gradients, but can also be influenced by patterns of gene flow among populations (Endler, 1977). For example, high rates of gene flow among populations situated in geographical proximity would contribute to a stronger phenotypic similarity than what would be observed from the influence of environmental variation alone.

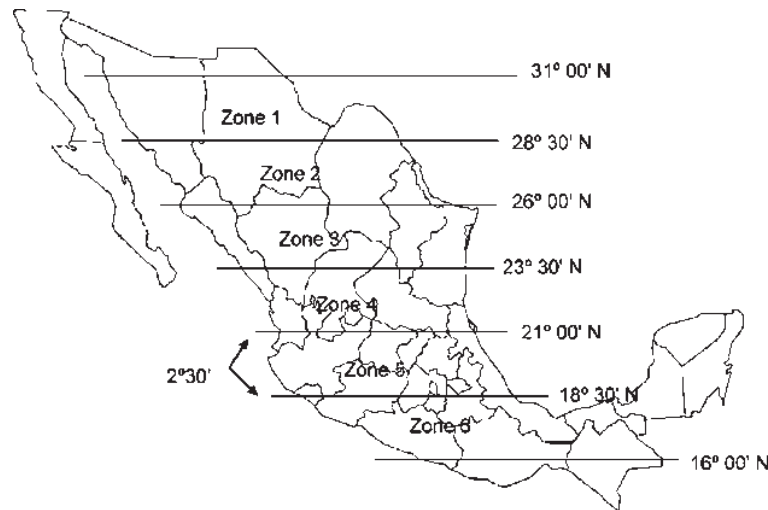


Fig. 2. Map of México showing the preliminary latitudinal seed zones for *Q. rugosa*, based on least significant differences among populations for the first principal component of morphological variation.

Moreover, clines can also be the product of historical isolation and divergence of populations with subsequent expansion and contact (Endler, 1977). The results of ongoing population genetic and phylogeographic studies of *Q. rugosa* using nuclear and chloroplast DNA microsatellites may help to discern between these alternatives (D. Uribe-Salas, unpublished data).

The seed zones herein delineated need to be viewed strictly as a provisional management tool and remain to be formally endorsed by future provenance test results, since they assume that part of the observed morphological variation results from among-population adaptive genetic differentiation. In the meantime, however, we suggest that the proposed seed zones should be used as follows: (a) For ecological restoration and biological conservation purposes, seeds collected from every seed zone should be used to produce seedlings to be planted in the same seed zone; or alternatively, to be planted in sites distant a maximum of $\pm 1^{\circ}15'$ of latitude from the seed collection site (1/2 of the seed zone width) (similar to altitudinal zones proposed by Sáenz-Romero et al., 2006). (b) For tree breeding purposes, under the plausible assumption that larger leaves could indicate higher growth potential (see for example Donahue and Lopez-Upton, 1996; Dvorak et al., 1996; Lopez-Upton et al., 2004; Li et al., 2006), seed collected in a given zone could be used in the northern-neighbor seed zone. (c) For amelioration of potential effects of global warming, seeds collected in a given zone could be used in a southern-neighbor seed zone, assuming that zones will be more arid in the near future, and northward populations at present are more adapted to arid conditions than southern populations (St Clair and Howe, 2007).

There is not doubt that outlined management guidelines, partially based on plausible assumptions, imply some risks. However, we believe they are justified under the pragmatic approach that using them is better than the current situation in Mexico, where there are no guidelines at all for *Q. rugosa* seed and seedling movement in reforestation programs, and that no management action regarding global warming might imply even larger risks of population extinctions in the future (McLachlan et al., 2007). From a practical point of view, it is clear that it will be virtually impossible to conduct formal provenance studies for all tree species that require informed management and conservation in highly diverse regions like Mexico. Under this perspective the search for less resource and time consuming alternatives may be justified.

Acknowledgements

The authors thank N. Pérez-Nasser, V. Rocha-Ramírez and L. Herrera-Arroyo for technical support and field assistance; S. Zamudio-Ruiz for taxonomic advice; S. Lara-Cabrera and H. Cano-Camacho for valuable comments. An anonymous reviewer helped to significantly improve the manuscript. Economic support was provided by the Mexican Council of Science and Technology (CONACYT) (38550-V to K.O.) and SEMARNAT-CONACYT (2006-23728 to K.O.). D.U.S. was granted with a scholarship from CONACYT.

References

- Balaguer, L., Martínez-Ferri, E., Valladares, F., Pérez-Corona, M.E., Baquedano, F.J., Castillo, F.J., Manrique, E., 2001. Population divergence in the plasticity of the response of *Quercus coccifera* to the light environment. *Funct. Ecol.* 15, 124–135.
- Bruschi, P., Grossoni, P., Bussotti, F., 2003a. 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., 2003b. Morphological and molecular diversity among Italian populations of *Quercus petraea* (Fagaceae). *Ann. Bot.* 91, 707–716.
- Calagari, M., Modirrahmati, A.R., Asadi, F., 2006. Morphological variation in leaf traits of *Populus euphratica* Oliv. natural populations. *Int. J. Agric. Biol.* 8, 754–758.
- Cardillo, E., Bernal, C.J., 2006. Morphological response and growth of cork oak (*Quercus suber* L.) seedlings at different shade levels. *For. Ecol. Manage.* 222, 296–301.
- Corcuera, L., Camarero, J.J., Gil-Pelegrin, E., 2002. Functional groups in *Quercus* species derived from the analysis of pressure-volume curves. *Trees* 16, 465–472.
- Denk, T., Grimm, G., Stogerer, K., Langer, M., Hemleben, V., 2002. The evolutionary history of *Fagus* in western Eurasia: evidence from genes, morphology and the fossil record. *Plant Syst. Evol.* 232, 213–236.
- Donahue, J.K., Lopez-Upton, J., 1996. Geographic variation in leaf, cone and seed morphology of *Pinus greggii* in native forests. *For. Ecol. Manage.* 82, 145–157.
- Ducousso, A., Guyon, J.P., Kremer, A., 1996. Latitudinal and altitudinal variation of bud burst in western populations of sessile oak (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl.). *Ann. Sci. Forest* 53, 775–782.
- Dvorak, W.S., Kietzka, J.E., Donahue, J.K., 1996. Three-year survival and growth of provenances of *Pinus greggii* in the tropics and subtropics. *For. Ecol. Manage.* 83, 123–131.
- Endler, J.A., 1977. *Geographic Variation, Speciation and Clines*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Frampton, C.M., Ward, J.M., 1990. The use of ratio variables in systematics. *Taxon* 39, 586–592.
- González-Rodríguez, A., Oyama, K., 2005. Leaf morphometric variation in *Quercus affinis* and *Q. laurina* (Fagaceae), two hybridizing Mexican red oaks. *Bot. J. Linn. Soc.* 147, 427–435.
- Gurevitch, J., 1992. Sources of variation in leaf shape among two populations of *Achillea lanulosa*. *Genet. Soc. Am.* 130, 385–394.
- Hedrick, P.W., 2006. Genetic polymorphism in heterogeneous environments: The age of genomics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 37, 67–93.

- Himrane, H., Camarero, J.J., Gil-Pelegrín, E., 2004. Morphological and ecophysiological variation of the hybrid oak *Quercus subpyrenaica* (*Q. faginea* × *Q. pubescens*). *Trees–Struct. Funct.* 18, 566–575.
- Hoff, C., Rambal, S., 2003. An examination of the interaction between climate, soil and leaf area index in a *Quercus ilex* ecosystem. *Ann. For. Sci.* 60, 153–161.
- Houlder, D., Hutchinson, M.F., Nix, H.A., McMahon, J.P., Ord, K.D., 2000. ANUCLIM User's Guide. The Australian National University, Canberra.
- Hovenden, M.J., Vander Schoor, J.K., 2006. The response of leaf morphology to irradiance depends on altitude of origin in *Nothofagus cunninghamii*. *New Phytol.* 169, 291–297.
- Hutchinson, M.F., Gessler, P.E., 1994. Splines—more than just a smooth interpolator. *Geoderma* 62, 45–67.
- Jensen, J.S., 2000. Provenance variation in phenotypic traits in *Quercus robur* and *Quercus petraea* in Danish provenance trials. *Scand. J. For. Res.* 15, 297–308.
- Jensen, J.S., Deans, J.D., 2004. Late autumn frost resistance of twelve North European provenances of *Quercus* species. *Scand. J. For. Res.* 19, 390–399.
- Jensen, J.S., Hansen, J.K., 2008. Geographical variation in phenology of *Quercus petraea* (Matt.) Liebl and *Quercus robur* L. oak grown in a greenhouse. *Scand. J. For. Res.* 23, 179–188.
- Jonas, C.S., Geber, M.A., 1999. Variation among populations of *Clarkia unguiculata* (Onagraceae) along altitudinal and latitudinal gradients. *Am. J. Bot.* 86, 333–343.
- Ledig, T.F., Kitzmiller, J.H., 1992. Genetic strategies for reforestation in the face of global climate change. *For. Ecol. Manage.* 50, 153–169.
- Li, C., Zhang, X., Liu, X., Luukkanen, O., Berninger, F., 2006. Leaf morphological and physiological responses of *Quercus aquifolioides* along an altitudinal gradient. *Silva Fenn.* 40, 5–13.
- Lopez-Upton, J., Ramirez-Herrera, C., Plascencia-Escalante, O., Jasso Mata, J., 2004. Variation in growth of different populations from the two varieties of *Pinus greggii*. *Agrociencia* 38, 457–464.
- McLachlan, J., Hellmann, J.J., Schwartz, M.W., 2007. A framework for debate of assisted migration in an era of climate change. *Conserv. Biol.* 21, 297–302.
- Martinetto, E., Uhl, D., Tarabra, E., 2007. Leaf physiognomic indications for a moist warm-temperate climate in NW Italy during the Messinian (Late Miocene). *Palaeogeogr. Palaeoclimatol.* 253, 41–55.
- Matyas, C., Yeatman, C.W., 1992. Effects of geographical transfer on growth and survival of jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.) populations. *Silvae Genet.* 43, 370–376.
- Nix, H.A., 1986. A biogeographic analysis of Australian elapid snakes. *Austr. Flora Fauna Ser.* 7, 4–19.
- Ohsawa, T., Ide, Y., 2007. Global patterns of genetic variation in plant species along vertical and horizontal gradients in mountains. *Global Ecol. Biogeogr.* 17, 152–163.
- Parkhurst, D.F., Loucks, O.L., 1972. Optimal leaf size in relation to environment. *J. Ecol.* 60, 505–537.
- Rehfeldt, G.E., Tchekakova, N.M., Barnhardt, L.K., 1999. Efficacy of climate transfer functions: introduction of Eurasian populations of *Larix* into Alberta. *Can. J. For. Res.* 29, 1660–1668.
- Rehfeldt, G.E., Tchekakova, N.M., Milyyutin, L.I., Parfenova, E.I., Wykoff, W.R., Kouzmina, N.A., 2003. Assessing population responses to climate in *Pinus sylvestris* and *Larix* spp. of Eurasia with climate-transfer models. *Eur. J. Forest Res.* 6, 83–98.
- Rehfeldt, G.E., 2006. A spline model of climate for the Western United States. *Gen. Tech. Rep. RMRS-GTR-165*. Forth Collins, Colorado, USA. USDA-Forest Service, Rocky Mountain Research Station, 21 p.
- Rico-Gray, V., Palacios-Rios, M., 1996. Leaf area variation in *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae) along a latitudinal gradient in Mexico. *Global Ecol. Biogeogr.* 5, 30–35.
- Royer, D.L., Wilf, P., Janesko, D.A., Kowalski, E.A., Dilcher, D.L., 2005. Correlations of climate and plant ecology to leaf size and shape: potential proxies for the fossil record. *Am. J. Bot.* 92, 1141–1151.
- Royer, D.L., Wilf, P., 2006. Why do toothed leaves correlate with cold climates? Gas exchange at leaf margins provides new insights into a classic paleotemperature proxy. *Int. J. Plant Sci.* 167, 11–18.
- Rzedowski, J., 1986. Vegetación de México. Limusa, Distrito Federal, México.
- Sack, L., Melcher, P.J., Liu, W.H., Middleton, E., Pardee, T., 2006. How strong is intracanalopy leaf plasticity in temperate deciduous trees? *Am. J. Bot.* 93, 829–839.
- Sáenz-Romero, C., Snively, A.E., Lindig-Cisneros, R., 2003. Conservation and restoration of pine forest genetic resources in Mexico. *Silvae Genet.* 52, 233–237.
- Sáenz-Romero, C., Guzmán-Reyna, R.R., Rehfeldt, G.E., 2006. Altitudinal genetic variation among *Pinus oocarpa* populations in Michoacan, Mexico. Implications for seed zoning, conservation, tree breeding and global warming. *For. Ecol. Manage.* 229, 340–350.
- SAS Institute Inc., 1999. SAS/STAT Computer Software. Release 8. SAS Institute Inc., North Carolina, 3 vol., 3809 p.
- Savva, I., Denneler, B., Koubaa, A., Tremblay, F., Bergeron, Y., Tjoelker, M.G., 2007. Seed transfer and climate change effects on radial growth of jack pine populations in a common garden in Petawawa, Ontario, Canada. *For. Ecol. Manage.* 242, 636–647.
- Sisó, S., Camarero, J.J., Gil-Pelegrín, E., 2001. Relationship between hydraulic resistance and leaf morphology in broadleaf *Quercus* species: a new interpretation of leaf lobation. *Trees* 15, 341–345.
- Sokal, R.R., Crovello, T.J., Unnasch, R.S., 1986. Geographic variation of vegetative characters of *Populus deltoides*. *Syst. Bot.* 11, 141–155.
- St Clair, J.D., Howe, G.T., 2007. Genetic maladaptation of coastal Douglas-fir seedlings to future climates. *Global Change Biol.* 13, 1441–1454.
- Téllez-Valdéz, O., Dávila-Aranda, P., 2003. Protected areas and climate change: a case study of the cacti in the Tehuacán-Cuicatlán biosphere reserve. *Mexico Conserv. Biol.* 17, 846–853.
- Thomas, C.D., Cameron, A., Green, R.E., Bakkenes, M., Beaumont, L.J., Collingham, Y.C., Erasmus, B.F.N., Ferreira de Siqueira, M., Grainger, A., Hannah, L., Hughes, L., Huntley, B., van Jaarsveld, A.S., Midgley, G.F., Miles, L., Ortega-Huerta, M.A., Townsend, P.A., Phillips, O.L., Williams, S.E., 2004. Extinction risk from climate change. *Nature* 427, 145–148.
- Tilki, F., Alptekin, C.U., 2005. Variation in acorn characteristics in three provenances of *Quercus aucheri* Jaub. et Spach and provenance, temperature and storage effects on acorn germination. *Seed Sci. Technol.* 33, 441–447.
- Tovar-Sánchez, E., Oyama, K., 2004. Natural hybridization and hybrid zones between *Quercus crassifolia* and *Quercus crassipes* (Fagaceae) in Mexico: morphological and molecular evidence. *Am. J. Bot.* 91, 1352–1363.
- Traiser, C., Klotz, S., Uhl, D., Mosbrugger, V., 2005. Environmental signals from leaves—a physiognomic analysis of European vegetation. *New Phytol.* 166, 465–484.
- Tuhkanen, S., 1980. Climatic parameters and indices in plant geography. *Acta Phytogeogr. Sue.* 67, 1–105.
- Uhl, D., Klotz, S., Traiser, C., Thiel, C., Utescher, T., Kowalski, E., Dilcher, D.L., 2007. Cenozoic paleotemperatures and leaf physiognomy—a European perspective. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol.* 248, 24–31.
- Valencia, S., 2004. Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. *Bol. Soc. Bot. Mex.* 75, 33–53.
- 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? *Tree Physiol.* 25, 1369–1378.

CAPÍTULO 2

High genetic diversity revealed by chloroplast microsatellites in natural populations of *Quercus rugosa* Neé (Fagaceae) in Mexico².

Dolores Uribe-Salas, Cuauhtémoc Sáenz-Romero, Víctor Rocha-Ramírez, Antonio González-Rodríguez and Ken Oyama

Resumen

La estructura genética de las poblaciones de *Quercus rugosa* Née fue estudiada utilizando seis loci microsatélites de ADN de cloroplasto heredado maternalmente para entender la influencia de la historia geofísica sobre la historia evolutiva de la especie. Esta especie tiene una gran variación morfológica. Un total de 44 alelos y 80 haplotipos fueron encontrados en 205 árboles de 25 poblaciones distribuidas a través del área de distribución natural de la especie en México. La diversidad genética total (h_T) fue alta 0.987. La diversidad genética promedio dentro de poblaciones (h_S) fue de 0.765, pero la diferenciación entre poblaciones fue baja ($G_{ST} = 0.225$). Las poblaciones se distinguieron unas de otras por la composición de sus haplotipos; Ningún haplotipo fue común en todas las poblaciones. R_{ST} 0.296 fue no significativo, indicando ausencia de estructura filogeográfica. Algunos factores importantes que pudieron haber causado la alta diversidad y la estructura en mosaico son: persistencia, migración, fragmentación, contracción, expansión y divergencia de las poblaciones asociado con periodos de cambio climático en un escenario orográfico heterogéneo. La estructura de la población puede estar reflejando eventos históricos acumulados. Este es el primer reporte sobre la diversidad genética molecular y la diferenciación entre poblaciones de esta especie.

² Manuscrito para ser sometido a una revista científica internacional indizada.

CAPÍTULO 2

High genetic diversity revealed by chloroplast microsatellites in natural populations of *Quercus rugosa* Neé (Fagaceae) in Mexico³.

Abstract

The genetic structure of populations on *Quercus rugosa* Née was studied using six loci of cpDNA microsatellites inherited maternally to understand the influence of the geophysical history on the evolutionary history of the species. This species has a large morphological variation. A total of 44 alleles and 80 haplotypes were found among 205 trees from 25 populations throughout its natural distribution range in Mexico. Total genetic diversity (h_T) was high 0.987. The mean genetic diversity within populations (h_s) was 0.765, but the differentiation among populations was relatively low ($G_{ST} = 0.225$). All the populations were distinguishable from each other by the composition of their haplotypes; not one haplotype was common to all the populations. R_{ST} 0.296 was not significant, indicating absence of phylogeographical structure. Some important factors that might have caused high diversity and the mosaic structure are: persistence, migration, fragmentation, contraction, expansion and divergence of populations associated with periods of climatic change in a heterogeneous orography scenario. The population structure might reflect accumulated historical events.

Keywords: chloroplast DNA, microsatellite loci, genetic differentiation, genetic diversity, *Quercus rugosa*.

³ Manuscrito para ser sometido a una revista científica internacional indizada.

Introduction

The studies of recent evolutionary history of natural populations of plants have been favored with the development and availability of molecular tools. The analysis of genetic variation within and among populations of plants as a result of underlying evolutionary processes (gene flow, genetic drift, natural selection and mutation), contribute to the knowledge of past history and provide valuable information to infer the processes that caused the present genetic structure (Riddle et al., 2000; Nason et al., 2002; Craft and Ashley, 2007) as well as to identify high-priority regions for the conservation of genetic resources (Moritz and Faith, 1998). With the aid of the phylogeographical approach, it is possible to know, in addition, the geographic distribution of the gene lineages at the intraspecific level as a fundamental step for the reconstruction of the dispersion routes/migration, the inference of the processes of expansion and contraction of populations (Avice, 2000; Gutiérrez et al., 2002), as well as to test the natural processes of evolution of populations such as disjunction, vicariance and hybridization (Riddle et al., 2000; Gutiérrez et al., 2002; Petit et al., 2002a, 2002b).

The current genetic footprint of populations of plants of temperate origin often make evident a geographic structure that reflects the dynamics of recolonization/migration, subsequent to the last climatic change of the Pleistocene, determining a decreasing genetic diversity, mainly throughout a longitudinal gradient (Sewell et al., 1996; Dumolin-Lapègue et al., 1997; Taberlet et al., 1998; Palmé and Vendramin, 2002; Petit et al., 2002a) or following a south-north direction in the northern region of the United States (Soltis et al., 1997; Magni et al., 2005), indicating the path of the migration from refuges where the climates remained within the limits of tolerance in order to maintain plant populations (Petit

et al., 2002a; Davis et al., 2005). Recently, there has been a growing interest focused on the understanding of the degree of impact of the climatic changes on the populations of plants of mid-latitudes, whose migration in comparison with species of northern latitudes, appear to occur in altitudinal gradients, causing high levels of diversity, suggesting limited migration that allowed the persistence of ancestral haplotypes currently more widely distributed, without evidences of significant latitudinal and/or longitudinal migration (Cannon y Manos, 2003; González-Rodríguez et al., 2004; Grivet et al., 2006).

Quercus rugosa Née is a species of great ecological and economic importance in Mexico, since it forms extensive wooded areas and is used as firewood and for the elaboration of charcoal. It is a species belonging to the *Quercus* section that grows like tree and/or shrub and having a large geographical distribution in Mexico (González, 1993). Its most northern distribution location is the southwest of the United States to the southern in Guatemala and Honduras. The species is mainly found in the main Mexican mountain systems: Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental, Sierra Madre del Sur, Sierra de los Altos de Chiapas and Eje Volcánico Transversal. *Quercus rugosa* occurs at altitudinal range from 1700 to 3500 m. Their communities live in environments with a variety of climates and soil (annual average temperature from 7.5° to 24.8° C and annual precipitation from 317 to 2494 mm). During spring time the female flowers are pollinated by the wind; the acorns ripen in autumn. *Q. rugosa* hybridizes with other species of the genus such as *Q. depressipes* (Spellenberg, 1995) and *Q. obtusata* (S. Zamudio personal communication). The magnitude and distribution of the genetic variation within and among populations of *Q. rugosa* is unknown, but by being a species of wide range geographic distribution and showing a high foliar

morphological differentiation among populations (Uribe-Salas et al., 2008), is reasonable to expect that this species possesses high levels of genetic diversity that reflect the accumulated effect of the recurrent climatic changes of the Pleistocene and of the geological history of the country.

For a better understanding of the evolutionary history of populations, the microsatellite markers of the chloroplast genome have proven to be useful by their maternal inheritance in angiosperms (Dumolin et al., 1995) and by lacking of sexual recombination (Schaal et al., 1998; Deguilloux, 2004). Furthermore, a particular feature of this genome is to show a low mutation rate (Palmer, 1985) making possible to observe the patterns of structure of the population (Deguilloux, 2004), that reflect the history of seed dispersion of the species over long periods of time (Cavers, 2003). From previous studies it is known that like chloroplast polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (cpRFLP-PCR), the chloroplast microsatellites were useful to show genetic patterns in populations of *Quercus petraea* and *Q. robur* in France (Deguilloux, 2004), *Q. lobata* in California, U.S.A., *Q. robur*, *Q. petraea*, *Q. canariensis*, *Q. faginea* and *Q. pyrenaica* in Spain and France (Grivet et al., 2006), of such form that the microsatellites of chloroplast have demonstrated to be useful to infer the evolutionary processes that have caused the current geographic structure of the populations of *Q. rugosa*. The aim of this study is to contribute to the knowledge of the evolution history of *Q. rugosa* through the characterization of its genetic and phylogeographic structure, based on chloroplast microsatellites markers.

In this work we have studied 25 populations of *Q. rugosa* distributed throughout the whole area of natural distribution in Mexico. The objectives are (1)

to describe the genetic diversity and structure of populations of *Q. rugosa* in Mexico, and (2) test for a phylogeographic structure. This information will be used to understand the impact of the historical events on current distribution of the genetic diversity of the *Quercus rugosa* populations.

Materials and Methods

Sampling

In this study we used fresh leaves of the same individual from 25 localities across the whole distribution range of *Q. rugosa* that had been included previously in an analysis of foliar morphologic variation of *Q. rugosa* (Uribe-Salas et al., 2008). Leaves from 5-10 individuals were used per population (average: 8.2) (Table 1). In all cases, within a locality sampled individuals were located at least 20 m apart. After the collection of several leaves of each individual, leaf tissue was stored at -70° C in liquid nitrogen until they could be stored in a freezer at -80° C for the later extraction of DNA.

Table 1. Locality number and name, state, altitude, geographical coordinates, number of individuals and within population genetic diversity (*hs*) for the collecting sites. Standar error (SE) is indicated in parenthesis.

Locality	State	Alt.(m)	LN	L W	N	<i>hs</i> (SE)
1 Casas Grandes	Chihuahua	2225	30°24'	108°23'	6	0.8000 (0.1721)
2 Ignacio Zaragoza	Chihuahua	1975	29°46'	107°39'	9	0.5833 (0.1833)
3 Yécora	Sonora	1700	28°27'	109°00'	8	0.9286 (0.0844)
4 Basaseachic	Chihuahua	1980	28°10'	108°13'	9	0.7500 (0.1121)
5 Cusareare	Chihuahua	2250	27°38'	107°33'	10	0.7556 (0.1295)
6 Caborachic	Chihuahua	2350	26°49'	106°52'	10	0.9111 (0.0773)
7 Saltillo	Coahuila	2292	25°20'	100°57'	10	0.7778 (0.0907)
8 Papasquiario	Durango	2450	25°02'	105°25'	9	0.6944 (0.1470)
9 Bolaños	Jalisco	2150	21°41'	103°48'	8	0.7857 (0.1127)
10 Santa Rosa	Guanajuato	2650	21°05'	101°11'	8	0.7857 (0.1508)
11 Real del Monte	Hidalgo	2776	20°08'	98°40'	10	0.3556 (0.1591)
12 Jilotepec	Mexico	2754	19°59'	99°36'	9	0.7778 (0.1100)
13 Tlalpujahua	Michoacan	2617	19°46'	100°12'	9	0.8056 (0.1196)
14 Ignacio Zaragoza	Puebla	2615	19°42'	97°35'	9	0.6944 (0.1470)
15 Terrenate	Tlaxcala	2750	19°30'	97°54'	5	0.4000 (0.2373)
16 Perote	Veracruz	2556	19°23'	97°15'	9	0.9722 (0.0640)
17 Erongarícuaro	Michoacan	2050	19°13'	101°42'	5	0.9000 (0.1610)
18 Amanalco	Mexico	2616	19°13'	100°03'	9	0.3889 (0.1644)
19 Distrito Federal	DF	2751	19°13'	99°08'	9	0.5556 (0.0902)
20 Joquicingo	Mexico	2516	19°01'	99°33'	9	0.8333 (0.0980)
21 Mariano Escobedo	Veracruz	2660	18°56'	97°12'	8	0.9643 (0.0772)
22 Tecoltepec	Puebla	2550	18°19'	97°03'	9	0.9167 (0.0725)
23 Corral de Piedras	Oaxaca	2724	17°19'	97°54'	5	1.0000 (0.1265)
24 San Cristóbal	Chiapas	2200	16°44'	92°38'	8	0.8929 (0.1113)
25 S. J. Mixtepec	Oaxaca	2230	16°16'	96°18'	5	0.9000 (0.1610)

Laboratory methods

Genomic DNA from each individual was extracted from 100 mg of frozen leaf tissue grinded in liquid nitrogen, following the protocol proposed by Lefort and Douglas (1999), with minor modifications consisting in the additional cleaning of

the DNA using solutions of 1:1 volumes/volumes of phenol and chloroform.

Microsatellites. An initial scrutiny with 26 pairs of designed primers to amplify microsatellite regions of the genome of chloroplast of *Nicotiana tabacum* (Weising and Gardner, 1999), *Quercus robur* (Deguilloux et al., 2003) *Castanea sativa*, *Fagus sylvatica* and *Quercus petraea* (Sebastiani et al., 2004) was developed. The election of the primers used in this study was made based in their polymorphism and ability to amplify a single product by means of the polymerase chain reaction (PCR) on genomic DNA of 10 individuals of *Q. rugosa*. Six loci microsatellites were chosen: Cmcs4, Cmcs5, Cmcs6, Cmcs7, Cmcs12 (Sebastiani et al., 2004) and Udt3 (Deguilloux et al., 2003). One of each pair of primers was labeled with fluorescence to use an automated sequencer. PCR reactions were performed in a thermal programmable controller using 2 µl reactions containing 10-50 ng/ µl of DNA, in accordance with the recommendations of the QIAGEN PCR Multiplex Kit. The PCR conditions were established according to the following profile: 4 min at 95 °C followed by 35 cycles 1 min denaturing at 94 °C, 1 min 30'' annealing at 60 °C, and 1 min of elongation time at 72 °C, with a final extension step of 7 min at 72 °C for loci Cmcs4, Cmcs5, Cmcs6, Cmcs7, Cmcs12, and 4 min at 95 °C followed by 35 cycles 1 min denaturing at 94 °C, 1 min 30'' annealing at 53 °C, and 1 min of elongation time at 72 °C, with a final extension step of 7 min at 72 °C for locus Udt3. After the amplification, the PCR products were runned in agarose gels at 2% to visualize the product and later to read the sample in a sequencer 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Length variants at each locus were combined into haplotypes, because of the non-recombinant nature of the chloroplast genome.

Statistical analysis

Rangewide survey of cpDNA diversity. Haplotypes frequencies were calculated and plotted for each population. The diversity within the populations (h_S) was estimated using the ARLEQUIN version 2.000 program (Schneider et al., 2000) according to the method of Nei (1987) based on haplotypes frequency (alleles not ordered). Total diversity (h_T), the coefficient of population differentiation (G_{ST}) (based only on haplotype frequencies), the estimation of v -type parameters (based on ordered alleles), as well as the coefficient of equivalent differentiation (R_{ST}), under a stepwise mutation model (SMM, which take into account the degree of mutational divergence between haplotypes) (Pons and Petit, 1996), were computed using the program PERMUT (<http://www.pierroton.inra.fr/genetics/labo/Software/>). This program was used also to test the existence of significant phylogeographic structure by comparing G_{ST} and R_{ST} against zero and between each other by means of a permutation test (Burban et al. 1999). A value of R_{ST} significantly higher than the G_{ST} value indicates that genealogically more closely related haplotypes are geographically nearer, indicating a phylogeographic structure in the distribution of haplotypes (Pons and Petit, 1996).

Space structure of the genetic diversity. The effect of spatial distance on the degree of genetic differentiation among populations was investigated. The spatial analysis was developed for genetic distances between pairs of the 25 populations for G_{ST} and R_{ST} values with DISTON program (<http://www.pierroton.inra.fr/genetics/labo/Software/Diston/index.html>), and plotting the means of these parameters against geographic distance classes. Mantel test

(Mantel, 1967) was tested to determine if the genetic divergence between populations is correlated with the geographic distances that separate them. The geographic distances were calculated for pairs of populations using a matrix of distances. The pairwise genetic distances between populations were estimated using the ARLEQUIN version 2.000 program (Schneider et al., 2000). Both matrices of distance were compared using TFPGA program (<http://www.marksgeneticsoftware.net>).

Genealogical relationships. Genealogical relationships between haplotypes was constructed using Network of the NETWORK 4.5.0.0 program, recovering the missing haplotypes and connecting all the haplotypes. Correction of ambiguities represented by reticulations was performed according to Crandall and Templeton (1993).

Results

Genetic variation in Q. rugosa

The scrutiny of the total sample of 205 individuals *Q. rugosa* showed that the 6 loci studied were highly polymorphic (Cmcs4, Cmcs5, Cmcs6, Cmcs12, Udt3 and Cmcs7). We found from 5 to 9 alleles per locus (average 7.3). A total of 44 alleles (variants in size) within 6 loci identified 80 haplotypes, of which 42 occurred in single individuals, 6 of these haplotypes are rare (frequencies per population < 0.005) and 16 were found in at least two individuals from the same population. Of the total haplotypes, only 22 were shared among individuals from 20 populations. The haplotypes more widely distributed were the named 34 and the named 19 that are shared by individuals in 4 locations, and haplotypes named 3, 17, 18, 38 and

40 that are shared by individuals from 3 locations. The haplotypes that were found most frequently are 19 (14 trees), 18 (13 trees) and 34 (12 trees) (Appendix A). All populations were polymorphic, but the most polymorphic were Perote, Veracruz, with 8 haplotypes and Mariano Escobedo, Veracruz, and Caborachic, Chihuahua, with 7 halotypes; the less polymorphic with only 2 haplotypes were Distrito Federal (DF), Amanalco, Estado de México, Real del Monte, Hidalgo, and Terrenate, Tlaxcala, (Appendix A).

Diversity within populations and differentiation among populations

The populations of *Q. rugosa* showed high genetic diversity within populations ($h_s = 0.765$) and even higher total genetic diversity ($h_T = 0.987$). The distribution of diversity among populations was: $G_{ST} = 0.225$ and $R_{ST} = 0.296$. The value of $R_{ST} - G_{ST}$ (0.071) was not significantly different from zero, indicating that to the geographical scale of this study, there was no evidence of association between the genealogical relationships between haplotypes and their geographical distribution (Table 2). The estimated values for the parameters v were $v_s = 0.762$ and $v_T = 0.991$.

Table 2. Genetic diversity index for *Quercus rugosa* populations across the whole natural range.

	Hpl	Pop.	G_{ST} (se)	R_{ST} (se)	h_s (se)	h_T (se)
All population	80	25	0.225	0.296	0.765	0.987
			(0.0356)	(NC)	(0.0365)	(0.0062)

Hpl : Number of haplotypes ; Pop : Number of populations; G_{ST} : coefficient of genetic differentiation over all populations (alleles no ordered); R_{ST} : coefficient of genetic differentiation over all populations (alleles ordered); h_s : within-population genetic diversity; h_T : total diversity; se: standar error (in parenthesis).

Geographic distribution of haplotypes

A relevant aspect of haplotypes distribution in the populations of *Q. rugosa* was its low geographical structure. It was evident that populations closest often have a different composition of haplotypes (Fig. 1), these appeared to have mainly distinct geographical distributions. This observation was based in the genealogical relationships among haplotypes (Fig. 2, Appendix A) and did not find evidence of a clinal distribution of them.

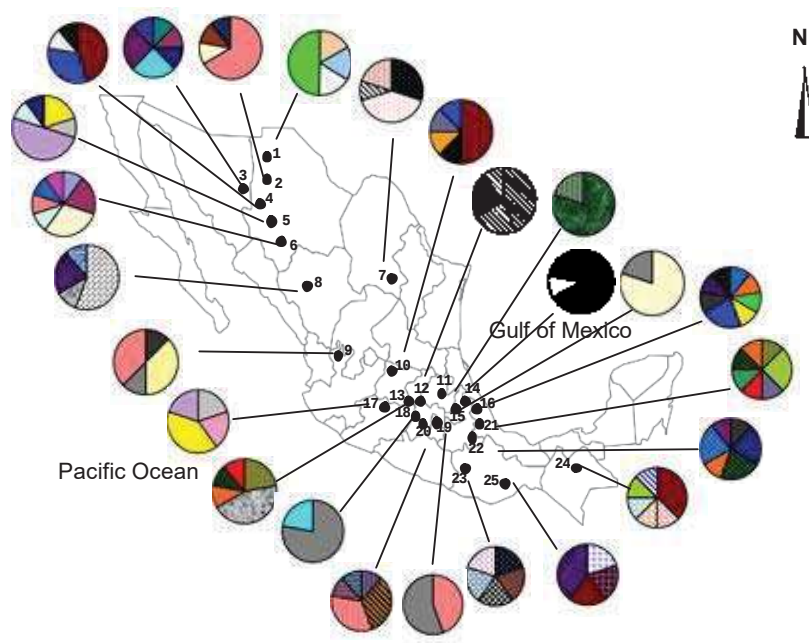


Fig. 1. Location of *Quercus rugosa* sampled populations of frequency of chloroplast microsatellite haplotypes per population. Population number codes keyed to Table 1.

Genealogical relationships among haplotypes

The network of haplotypes (Fig. 2) shows the genealogical relationships between them after maximum parsimony (Crandall and Templeton (1993), no true “central” haplotype. The size of the circles represents the frequency with which

they were presented in the sample set (Fig. 2). There were nine haplotypes inferred indicating that they are absent from the populations or not were collected.

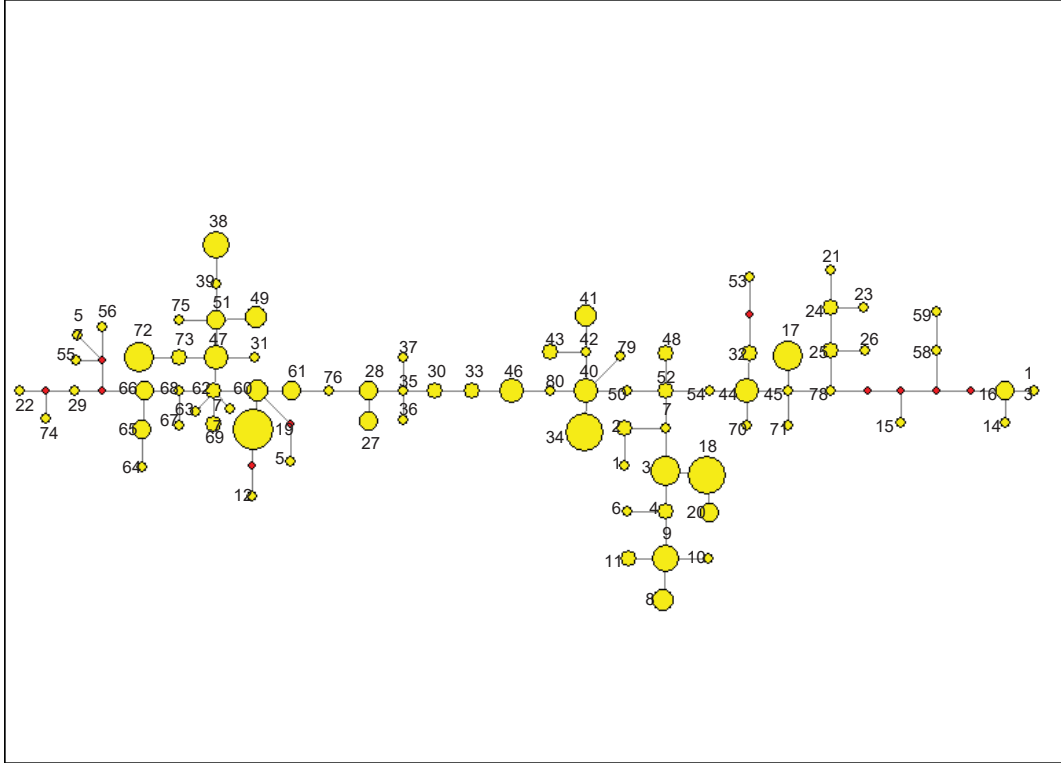


Fig. 2. Network of eighty haplotypes identified in population of *Quercus rugosa* using maximum parsimony according to Crandall and Templeton (1993). Each circle represents a single haplotype (small circles indicate a single individual, and larger circles indicate that the haplotype was sampled from multiple individuals), and circles connected by a line are 1 mutational step apart. The red squares represent inferred intermediate haplotypes. Each one haplotype is numbered according to Appendix A.

Spatial structure of genetic diversity

The plot of the mean pairwise differentiation measures vs. geographical distances (Fig. 3) indicated that in all kinds of geographical distance, R_{ST} is greater than G_{ST} . Both measures do not show an increase and / or decrease clear baseline in all classes away; on the contrary, there is a trend toward decline in genetic differentiation on a larger geographical distance. The Mantel test that was

used to prove the existence of geographic structure gave a value of $r = 0.0343$ ($P = 0.3820$), showing lack of correlation between genetic distance and the geographical distance. A similar aspect occurred when we determine the spatial structure of genetic diversity in the groups based on the potential distribution model: no significant spatial structure was identified within each group when using pairwise G_{ST} and R_{ST} analysis.

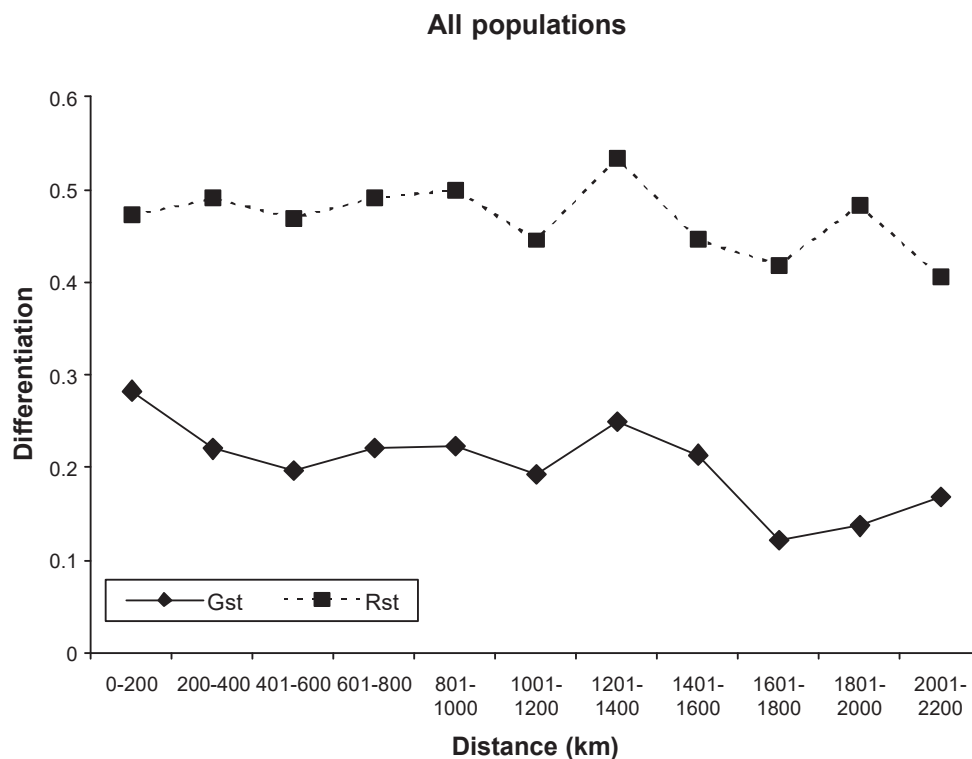


Fig. 3. Relationship of average pairwise G_{ST} y R_{ST} values with the geographical distances separating populations.

Discussion

Results indicate a surprisingly elevated genetic diversity among and within populations, and a lack of a clear geographical pattern.

Brief historical background

Examination of the fossil evidence indicated that temperate assemblage, including *Quercus*, migrated from United States of North America to colonize Mexico during late Oligocene (Oligocene: 38 million years ago) and/or Miocene (Miocene: 25 million years ago) (Graham, 1999; Valencia and Nixon, 2004). These migration events were significantly advantaged by recurring climate changes caused by drop in temperature coupled with conditions of low humidity throughout the Tertiary and Quaternary (Graham, 1993). Likewise, palynological evidence of altitudinal variation in the communities of temperate plants in the central region of Mexico, indicate that before the advance of glacial during the Pleistocene (Pleistocene: 1.8 Ma. to 10 000 years), they migrated to lower altitudes (Lozano-Garcia et al., 2005), suggested that the species must have survived Pleistocene glaciations in areas of favorable climate at low altitudes in the mountain major ranges of Mexico, while during warm periods would occur migration to higher altitudes (Toledo, 1982; Zamudio, S., personal communication). The early north-south migration, the multiple cycles of altitudinal migrations in the mountain major ranges of Mexico associated with Pleistocene glacial cycles and the high volcanic activity than uplifts the Sierra Madre Oriental, the Sierra Madre del Sur, the Sierra Madre Occidental and the Trans-Mexican Volcanic Belt (mountain major ranges from Mexico), from the early Eocene (Eocene: 59.4 million years ago) to Pleistocene (Rzedowski, 1986; Ferrusquía-Villafranca, 1993), must have undoubtedly influenced the levels and distribution of genetic diversity within *Quercus rugosa* species.

Allelic and haplotypic richness

The scrutiny of 6 loci chloroplast microsatellite identified 80 haplotypes,

one the highest numbers reported for a species within the genus. The mean number of alleles of all sampled populations of *Q. rugosa* (7.3) was highest than found in *Q. lobata* (3.67) and than in the European oaks (*Q. robur*, *Q. petraea*, *Q. canariensis*, *Q. faginea* and *Q. pyrenaica*) (3.33) (Grivet et al., 2006), being the locus Udt3 common in all three cases compared, with 4 alleles in *Q. lobata*, 4 in the complex European oaks and 8 in *Q. rugosa*. This latter species own a number of chloroplast microsatellite haplotypes (80), twice highest compared to those found in oaks from California (39) and more than 7 times that found in the complex European oaks (11). The high allelic and haplotypic richness of *Q. rugosa* constitute evidence suggesting that during the past climate changes, populations of this species were less affected than the populations of oaks in California and considerably less than those of Europe, implying rates of lowest extinction that allowed to maintain throughout time the ancestral genetic diversity and accumulate the more recently generated diversity. Likewise, the above is supported by the low number of inferred haplotypes represented in the network of haplotypes (Fig.2), meaning that most of them are present in the current populations of the species (Schaal et al., 1998). The available information indicates that communities of European oaks were exposed to diversity loss as a result of extinction, migration, bottlenecks and effects founders, consequently the ancestral genetic diversity decreased as result of distribution changes on large scale during the recolonization of the territory at the end of last climate change (Dumolin-Lapègue et al., 1997; Petit et al., 2002a and b; Grivet et al., 2006). In the case of North America, bioclimatic approximations data and fossil pollen records indicate that during the last glacial maximum (LGM) the northern boundary of the distribution of species of oak was found at the 35° LN (Jackson et al., 2000; Magni et al., 2005)

(approximate distribution of *Q. lobata*), this aspect would implicate that *Q. lobata* populations would be in the limits usable by vegetation, although without to suffer the severity of the effects of climate change as those on higher latitudes.

cpDNA diversity and geographic structure

As can be seen in Figure 1, the genetic diversity of *Q. rugosa* populations is distributed uniformly in a latitudinal plane through of all distribution range in Mexico. This species own high genetic diversity within populations (h_s) 0.765 and high total genetic diversity (h_T) 0.987. The low differentiation between populations (G_{ST}) 0.225 (lowest reported for this group of plants), lack of geographical structure (Mantel test $r = 0.0343$, $P = 0.3820$) and the absence of a phylogeographical organization of populations (R_{ST}) 0.296 ($P = 0.187$), is reflected in a mosaic of haplotypes, where their geographical distribution is not clearly defined and neighboring populations have distinct haplotypes composition and levels of diversity (Table 1). Likewise, in the analysis of genetic diversity throughout its distribution in Mexico, we found not evidence of clinal variation in levels of diversity and composition of haplotypes that suggests recent migration toward any geographical region or refuge consistent with the approach made by González-Rodríguez et al. (2004).

According to Petit et al. (2002b), “allelic richness high, $h_T = v_T$ is indicative of the mixing of haplotypes from several different lineages, resulting in many variants (high allelic richness) from different lineages ($h_T = v_T$)”. This similarity in *Q. rugosa* ($h_T = 0.987$ and $v_T = 0.990$), likely is the result of a complex evolutionary history where progressive migration in a plane latitudinal and / or longitudinal would have occurred in a context of recurrent episodes of climate change (Van Devender et

al., 1984; Van Devender and Burgess, 1985; Hewitt, 1996; Taberlet et al., 1998) and high volcanic activity. The findings of this study suggest the existence in the past of very complex dynamics of gene flow seed-mediated between populations over an extended period of time. Migration/colonization would have been given by local dispersal events combined with long-distance dispersal (stratified dispersal) in order to better preserve the overall diversity and maintain a mosaic of haplotypes (Dumolin-Lapègue et al., 1997; Petit et al., 2002a). The presence of same allele in distant populations may suggest long-distance seeds-dispersal (the 34 allele is present in trees from Basaseachic, Chihuahua -northern México- and San Cristóbal, Chiapas -southeastern México- separated geographically by 1,985 km). Alternatively, the genetic similarity between trees from such populations could be due to a recent common ancestor (through persistence and differential sorting of ancestral polymorphism) more than to processes of exchange genes at present (Schaal et al., 1998), which would be causing the observed inconsistency between geography and haplotypes network (Fig. 2, Appendix A). It is possible also that mutations have occurred independently in the two or more populations throughout homoplasy (Estoup et al., 2002); however, the long-distance dispersal (~ 2,000 km) and persistence of haplotypes (RFLPs) without additional mutations is possible (Petit et al., 2002a).

The available information from environments that predominated during the LGM in Mexico, suggests that in a geography with a complex topographical history reflected in a large heterogeneity orographic, the severe climate effects were limited to high elevations in the mountains (Toledo, 1982; Van Devender et al., 1984; Van Devender and Burgess, 1985; Metcalf et al., 2000); hence, the importance of orography in much of the areas, the climate changes could have

caused changes in the altitudinal interval usable for each species, inducing the displacement of populations within a altitudinal range (Gutierrez-Larena et al., 2002) and perhaps also through a limited latitudinal range (González Rodríguez et al., 2004). Therefore, it is reasonable to expect under this scenario, the permanence continued although decimated of *Q. rugosa* populations, possibly with recurrent changes in the altitudinal distribution ranges, coupled with fragmentations, contractions and expansions. These latter could be a causing pivotal of the divergence of the ancestral lineages, causing the high genetic diversity through of sudden growths of populations during area expansion reflected in the occurrence of 42 unique haplotypes (Le Corre et al., 1997; Navascués et al., 2006) registered in 18 populations of *Q. rugosa*. Likewise, according to Westfall and Millar (2004), the absence geographic structure may be mainly the consequence of cyclic, climatically driven seed dispersal.

An important aspect of this study was the lack of phylogeographical structure. Is possible that the phylogeographical pattern could have existed subsequent to initial migration (Oligocene and/or Miocene) of *Q. rugosa* into Mexico, which could has been blurred as consequence of recurrent fragmentations, contractions and expansions. Some authors have proposed that each historical episode of fragmentation, contraction and expansion associated with glacial cycles, could produce a phylogeographic pattern; therefore each fragmenting may have produced similar phylogeographic patterns at different times (Arbogast and Kenagy, 2001), causing the overlapping and consequently hindering their analysis and visualization. Likewise, these populations process could result in a frequent mixture of populations that additionally would favor gene flow intra- and interspecific (Golden and Bain, 2000; Gutierrez-Larena et al.,

2002). This last possibility can explain the presence of 6 rare haplotypes, identified by the different size than the expected range (see Appendix A). Additionally, the episodes of high volcanic activity in the highlands of central Mexico could have caused fires in the communities of plants and decimate populations (Lozano-Garcia and Xelhuantzi-Lopez, 1997), decreasing the local genetic diversity.

The genetic diversity and range distribution of *Q. rugosa* could be the result of the sum of several episodes of climate and geological change, perhaps from the late Oligocene (estimated date for the presence of pollen and leaved fossils oaks in Chiapas and Puebla) (Valencia and Nixon, 2004), or from Middle Miocene (determined date for the presence of broad-leaved oaks in the formation of Paraje Solo, Veracruz, according to records of microfossils oaks) (Graham, 1993). Although this could fall into the terrain of speculation, being this specie the oak with the widest distribution in Mexico, it is an element that supports the above written (it has had more time to expand and to occupy larger areas).

Conclusions

The chloroplast microsatellite markers were useful for characterizing genetic variation within and among *Q. rugosa* populations. The populations were characterized by having high exceptionally allelic and haplotypic diversity. Migration of seed, expansion of populations and possibly recombination by natural crosses, could have contributed to the very high level of variability. High chloroplast diversity was clearly persistent in populations, probably throughout several glacial cycles. Furthermore, the complex topography would allow populations to diverge throughout such time periods. Is not clear the incongruence between the geographic distribution of haplotypes and genealogical relationships,

possibly caused as resulted of the geographical and geophysical complex history of Mexico. Results supports the hypothesis of the persistence of ancestral genetic diversity as result of minor impact of climate change on temperate plants communities of mid-latitude (Cannon and Manos, 2003; Gonzalez-Rodríguez et al., 2004; Grivet et al., 2006).

Acknowledgements

The authors thank N. Pérez-Nasser, L. Herrera-Arroyo, J.M. Peñaloza-Ramírez, H. Ferreira, A. Valencia, J. Junco, for technical support; S. Zamudio-Ruíz for taxonomic advice and valuable comments; S. Lara-Cabrera and H. Cano-Camacho for valuable comments. This research was supported by grants from DGAPA-PAPIIT, UNAM (IN229803 to KO), CONACYT (38550-V to KO), SEMARNAT-CONACYT (2004-C01-97 and 2006-23728 to KO), and a scholarship grant from CONACYT to DUS.

References

- Arbogast, B.S., Kenagy, G.J. 2001. Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *Journal of Biogeography* 28, 819-825.
- Avice, J.C. 2000. Phylogeography: The history and formation of species. Harvard University Press, Londres.
- Burban, C., Petit, R.J., Carcreff, E., Jactel, H. 1999. Rangewide variation of the maritime pine bast scale *Matsucoccus feytaudii* Duc. (Homoptera: Matsucoccidae) in relation to the genetic structure of its host. *Molecular Ecology* 8, 1593-1602.
- Cannon, C.H., Manos, P.S. 2003. Phylogeography of the Southeast Asian stone oaks (*Lithocarpus*). *Journal of Biogeography* 30, 211-226.

- Cavers, S., Navarro, C., Lowe, J. 2003. Chloroplast DNA phylogeography reveals colonization history of a Neotropical tree, *Cedrela odorata* L., in Mesoamerica. *Molecular Ecology* 12, 1451-1460.
- Craft, K.J., Ashley, M.V. 2007. Landscape genetic structure of bur oak (*Quercus macrocarpa*) savannas in Illinois. *Forest Ecology and Management* 239, 13-20.
- Crandall, K.A., Templeton, A.R. 1993. Empirical test of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics* 134, 2008-2012.
- Davis, M.B., Shaw, R.G., Etterson, J.R. 2005. Evolutionary responses to changing climate. *Ecology* 86, 1704-1714.
- Deguilloux, M.F., Dumolin-Lap  gue, S., Gielly, L., Grivet, D., Petit, R.J. 2003. A set of primers for the amplification of chloroplast microsatellites in *Quercus*. *Molecular Ecology Notes* 3, 24-27.
- Deguilloux, M.F., Pemonge, H., Petit, R.J. 2004. Use of chloroplast microsatellites to differentiate oak populations. *Annals of Forest Science* 61, 825-830.
- Dumolin, S., Demesure, B., Petit, R.J. 1995. Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theoretical and Applied Genetics* 91, 1253-1256.
- Dumolin-Lap  gue, 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.
- Estoup, A., Jarne, P., Cornuet, J.-M. 2002. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11, 1591-1604.
- Ferrusquía-Villafranca, I. 1993. Geology of Mexico: a synopsis. In: Ramamoorthy T.P., Bye R., Lot A., Fa J. (Eds.) Biological diversity of Mexico: origins and distribution, 397-420. Oxford University Press, New York.
- Graham, A. 1993. History factors of the biological diversity of Mexico. In: Ramamoorthy, T.P., Bye, R., Lot, A., Fa, J. (Eds.), Biological diversity of Mexico: origins and distribution, 3-107. Oxford University Press, New York.
- Graham, A. 1999. The Tertiary history of the northern temperate element in the northern Latin American biota. *American Journal of Botany* 86, 32-38.

- Golden, J.L., Bain, J.F., 2000. Phylogeographic patterns and high levels of chloroplast DNA diversity in four *Packera* (Asteraceae) species in southwestern Alberta. *Evolution* 54, 1566-1579.
- González, R.R., 1993. La Diversidad de los Encinos Mexicanos. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* Vol. Esp. (XLIV) 125-142 pp.
- González-Rodríguez, A., Bain, J.F., Golden, J.L., Oyama, K. 2004. Chloroplast DNA variation in the *Quercus affinis* - *Q. laurina* complex in Mexico: geographical structure and associations with nuclear and morphological variation. *Molecular Ecology* 13, 3467-3476.
- Grivet, D., Deguilloux, M.F., Petit, R., Sork, V.L., 2006. Contrasting patterns of historical colonization in white oaks (*Quercus* spp.) in California and Europe. *Molecular Ecology* 15, 4085-4093.
- Gutiérrez-Larena, B., Fuertes, A.J., Nieto, F.G. 2002. Glacial-induced altitudinal migrations in *Armeria* (Plumbaginaceae) inferred from patterns of chloroplast DNA haplotype sharing. *Molecular Ecology* 11, 1965-1974.
- Hewitt, G.M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58, 247-276.
- Jackson, S.T., Webb, R.S., Anderson, K.H. 2000. Vegetation and environment in eastern North America during the Last Glacial Maximum. *Quaternary Science Reviews* 19, 489-508.
- Le Corre, V., Machon, N., Petit, R.J., Kremer, A. 1997. Colonization with long-distance seed dispersal and genetic structure of maternally inherited genes in forest trees, a simulation study. *Genetical Research* 69, 117-125.
- Lefort, F., Douglas, G.C. 1999. An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood tree species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. *Annals of Forest Science* 56, 259-263.
- Lozano-García, M.S., Xelhuantzi-López, M.S. 1997. Some problems in the late quaternary pollen records of central Mexico: Basins of Mexico and Zacapu. *Quaternary International* 43/44, 117-123.
- Lozano-García, S., Sosa-Nájera, S., Sugiura, Y., Caballero, M. 2005. 23,000 yr of vegetation history of the Upper Lerma, a tropical high-altitude basin in Central Mexico. *Quaternary Research* 64, 70-82.
- Magni, C.R., Ducouso, A., Caron, H., Petit, R.J., Kremer, A. 2005. Chloroplast

- DNA variation of *Quercus rubra* L. in North America and comparison with other Fagaceae. *Molecular Ecology* 14, 513-524.
- Mantel, N.A. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27, 209-220.
- Metcalf, S.E., O'Hara, S.L., Caballero, M., Davies, S.J., 2000. Records of Late Pleistocene-Holocene climatic change in Mexico--- a review. *Quaternary Science Reviews* 19, 699-721.
- Moritz, C., Faith, D.P. 1998. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular Ecology* 7, 419-429.
- Nason, J.D., Hamrick, J.L., Fleming, T.H. 2002. Historical vicariance and postglacial colonization effects on the evolution of genetic structure in *Lophocereus*, a Sonoran desert columnar cactus. *Evolution* 56, 2214-2226.
- Navascués, M., Vaxevanidou, Z., González-Martínez, S.C., Climent, J., Gil, L., Emerson, B.C. 2006. Chloroplast microsatellites reveal colonization and metapopulation dynamics in the Canary Island pine. *Molecular Ecology* 15, 2691-2698.
- Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.
- Palmé, A.E., Vendramin, G.G. 2002. Chloroplast DNA variation, postglacial recolonization and hybridization in hazel, *Corylus avellana*. *Molecular Ecology* 11, 1769-1779.
- Palmer, J.D. 1985. Evolution of chloroplast and mitochondrial DNA in plants and algae. In: MacIntyre R.J. (Ed.). *Molecular Evolutionary Genetics*. Pp. 131-240. Plenum Press, New York.
- Petit, R.J., Brewer, S., Bordács, S., Burg, K., Cheddadi, R., Coart, E., Cottrell, J., Csaikl, U.M., van Dam, B., Deans, J.D., Espinel, S., Fineschi, S., Finkeldey, R., Glaz, I., Goicoechea, P.G., Jensen, J.S., König, A.O., Lowe, A.J., Madsen, S.F., Mátias, G., Munro, R.C., Popescu, F., Slade, D., Taberner, H., de Vries, S.G.M., Ziegenhagen, B., de Beaulieu, J.L., Kremer, A. 2002a. 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.
- Petit, R.J., Csaikl, U.M., Bordács, S., Burg, K., Coart, E., Cottrell, J., Van Dam, B., Deans, J.D., Dumolin-Lapegue, S., Fineschi, S., Finkeldey, R., Gillies, A.,

- Glaz, I., Goicoechea, P.G., Jensen, J.S., König, A.O., Lowe, A.J., Madsen, S.F., Mátías, G., Munro, R.C., Olalde, M., Pemonge, M.H., Popescu, F., Slade D., Tabbener, H., Turchini, D., de Vries, S.G.M., Ziegenhagen, B. Kremer, A. 2002b. Chloroplast DNA variation in European white oaks. Phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management* 156, 5-26.
- Pons, O., Petit, R.J. 1996. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics* 144, 1237-1245.
- Riddle, B.R., Hafner, D.J., Alexander, L.F., Jaeger, J.R. 2000. Cryptic vicariance in the assembly of a Baja California Peninsular Desert biota. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97, 14438-14443.
- Rzedowski, J. 1986. Vegetación de México. Ed. Limusa. México.
- Schaal, B.A., Hayworth, D.A., Olsen, K.M., Rausher, J.T., Smith, W.A. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology* 7, 465-474.
- Schneider, S., Roessli, D., Excoffier, L. 2000. *ARLEQUIN* Version 2000: A Software for Population Genetics Data Analysis. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Ecology and Anthropology, University of Geneva, Switzerland.
- Sebastiani, F., Carnavale, S., Vendramin, G.G. 2004. A new set of mono- and dinucleotide chloroplast microsatellites in Fagaceae. *Molecular Ecology Notes* 4, 259-261.
- Sewell, M.M., Parks, C.R., Chase, M.W. 1996. Intraspecific chloroplast DNA variation and biogeography of North American *Liriodendron* L. (Magnoliaceae). *Evolution* 50, 1147-1154.
- Soltis, D.E., Gitzendanner, M.A., Streng, D.D., Soltis, P.S. 1997. Chloroplast DNA intraspecific phylogeography of plants from the Pacific Northwest of North America. *Plant Systematics and Evolution* 206, 353-373.
- Spellenberg, R. 1995. On the hybrid nature of *Quercus basaseachicensis* (Fagaceae, Sect. *Quercus*). *Sida* 16, 427-437.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A.G., Cosson, J.F. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7, 453-464.
- Toledo, V.M. 1982. Pleistocene changes of vegetation in Tropical Mexico. In

- Prance G.T. (ed.) Biological diversification in the Tropics. Pp. 93-111. Columbia University Press, New York.
- Uribe-Salas, D., Sáenz-Romero, C., González-Rodríguez, A., Téllez-Valdéz, O., Oyama, K. 2008. Foliar morphological variation in the white oak *Quercus rugosa* Née (Fagaceae) along a latitudinal gradient in Mexico: Potential implications for management and conservation. *Forest Ecology and Management* 256, 2121-2126.
- Valencia, A.S., Nixon, C.K. 2004. Encinos. In: García-Mendoza, A.J., Ordóñez, M.J., Briones-Salas, M. (Eds.), Biodiversidad de Oaxaca, 219-226. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza. World Wildlife Fund. México.
- Van Devender, T.R., Betancourt, J.L., Wimberley, M. 1984. Biogeographic implications of a packrat midden sequence from the Sacramento Mountains, south-central New Mexico. *Quaternary Research* 22, 344–360.
- Van Devender, T.R., Burgess, T.L. 1985. Late Pleistocene woodlands in the Bolson de Mapimi: A refugium for the Chihuahuan desert biota. *Quaternary Research* 24, 346-353.
- Weising, K., Gardner, R.C. 1999. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* 42, 9-19.
- Westfall, R.D., Millar, C.I. 2004. Genetic consequences of forest population dynamics influenced by historic climatic variability in the western USA. *Forest Ecology and Management* 197, 159-170.

Appendix A

Haplotype frequency based on chloroplast microsatellite data in *Quercus rugosa* populations

Haplotype	Microsatellite size	Population																									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	Total
1	106 148 193 211 218 124					1																					1
2	106 148 193 211 219 124					2																					2
3	107 148 193 211 220 124	1				3									4												8
4	106 148 193 211 220 124				1																						2
5	106 147 194 211 221 123					1																					1
6	106 148 193 211 220 123					1																					1
7	107 148 193 211 219 124					1																					1
8	106 148 192 211 221 124					2											2										4
9	106 148 192 211 220 124					5										1											6
10	106 147 192 211 220 124					1																					1
11	106 148 192 211 219 124					1											1										2
12	106 148 194 213 222 124																1										1
13	106 148 191 211 221 120	1																									1
14	105 148 191 211 220 121																										1
15	106 149 190 211 221 123	1																									1
16	106 148 191 211 221 121	3																									3
17	107 149 193 211 221 124								1						5		1						1				8
18	107 148 193 211 221 124	6						3											4								13
19	107 148 194 211 221 124							1							1			7									14
20	106 148 193 211 221 124							3																			3
21	107 149 191 211 220 122			1																							1
22	99 137 177 196 206 113			1																							1
23	108 149 191 211 221 122			1																							1
24	107 149 191 211 221 122			2																							2
25	107 149 192 211 221 122			2																							2
26	108 149 192 211 221 122			1																							1
27	108 149 194 211 221 123												2									1					3
28	108 149 193 211 221 123																							1			3
29	107 147 201 205 218 120																								1		1
30	108 150 193 211 221 124													1													2

Appendix A (continued)

Haplotype	Microsatellite size	Population																								Total
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
31	107 149 193 211 220 123																				1					1
32	107 150 192 211 220 124													1							1					2
33	108 150 192 211 221 124													1							1					2
34	108 149 193 211 221 124			4																				3	1	12
35	108 150 193 211 221 123									4																1
36	108 150 194 211 221 123									1																1
37	107 150 193 211 221 123									1																1
38	108 149 194 211 221 124			3						1						2										6
39	108 149 194 211 220 124			1				3								1										1
40	108 149 193 211 220 124			1				4																		5
41	108 149 193 211 221 125							1																		4
42	108 149 193 211 220 125							2																		1
43	107 149 193 211 220 125								5																	2
44	107 149 192 211 220 124								1																	5
45	107 149 192 211 221 124								2								1									1
46	108 149 192 211 221 124								1																2	5
47	107 149 194 211 220 123												4										2			5
48	107 149 193 211 220 124														2								2			2
49	107 149 194 211 221 124																						2			4
50	108 149 193 211 219 124																						1			1
51	107 149 194 211 220 124																1					2				3
52	107 149 193 211 219 124																1					1				2
53	107 150 193 212 220 124																1					1				1
54	107 149 192 211 219 124																1									1
55	106 164 202 205 217 124																							1		1
56	106 164 202 205 216 123																							1		1
57	106 165 202 205 217 123																							1		1
58	106 147 191 211 221 123																							1		1
59	107 147 191 211 221 123																							1		1
60	107 148 194 211 221 123											4														4
61	108 148 194 211 221 123										2														1	3
62	107 148 194 211 220 123										2															2

Appendix A (continued)

Haplotype	Microsatellite size	Population																									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	Total
63	107 148 194 211 219 123	1										1															1
64	108 148 194 211 221 120																				1						1
65	107 148 194 211 221 120																				3						3
66	107 148 194 211 220 120																				3						3
67	108 148 193 211 220 121																				1						1
68	107 148 194 211 220 121																				1						1
69	107 148 194 211 220 124																		2								2
70	107 148 192 211 220 124	1																									1
71	107 148 192 211 221 124	1																									1
72	107 149 195 211 221 123									8																	8
73	107 149 195 211 220 123									2																	2
74	107 146 202 190 218 119													1													1
75	106 149 194 211 220 124												1														1
76	108 148 193 211 221 123																							1			1
77	107 148 193 211 220 123																							1			1
78	107 149 192 211 221 123																							1			1
79	108 149 193 211 220 123																									1	1
80	108 149 192 211 220 124																									1	1
Total		6	9	8	9	10	10	10	9	8	8	10	9	9	9	5	9	5	9	8	9	8	5	8	5	205	

Note. Data for microsatellites size indicate allele size at each of the six chloroplast microsatellites (Cmcs4, Cmcs5, Cmcs6, Cmcs7, Cmcs12, and Udt3), respectively. The populations are numbered as in Table 1.

VII. DISCUSIÓN GENERAL

Las especies de plantas con distribución geográfica amplia brindan una oportunidad de estudio para entender cómo la variación de caracteres morfológicos y genéticos se estructuran poblacionalmente en respuesta a factores ambientales e históricos. En esta tesis se realizó un estudio morfológico foliar y molecular de las poblaciones de la especie *Quercus rugosa* a través de su distribución en México. Sus características de historia de vida (Hamrick y Godt 1996), aunado al intervalo geográfico amplio con condiciones heterogéneas, dadas por la combinación de variables geográficas (latitud, longitud y altitud), climáticas (temperatura, precipitación e índice de aridez) y orográficas, en las que habitan sus poblaciones, más el elemento histórico, son factores que han promovido una gran variabilidad morfológica y molecular, como lo indican los resultados de este trabajo.

Análisis morfológico

Las poblaciones naturales de plantas muestran patrones de variación de características como la arquitectura del árbol, el tamaño de la semilla y la morfología foliar, en respuesta a factores ambientales, principalmente a los climáticos (Tilki y Alptekin, 2005; Traiser *et al.*, 2005; Royer y Wilf, 2006). Uno de los grupos de plantas que ha sido reconocido por mostrar una gran variación en caracteres fenotípicos en respuesta al ambiente es el género *Quercus* (Bruschi *et al.*, 2003a, b; Li *et al.*, 2006). Sin embargo, aún cuando México es un país con gran biodiversidad, hasta ahora pocos estudios documentan esta relación en especies de plantas mexicanas (i.e. *Quercus oleoides*, A. González-Rodríguez, datos no publicados y *Rhizophora mangle* (Rico-Gray y Palacios-Ríos, 1996).

En este trabajo, los resultados de los análisis de la morfología foliar presentados en el Capítulo 1, indicaron como hallazgo principal la existencia de un claro patrón clinal de variación morfológica en el tamaño de la hoja, aparentemente como una respuesta adaptativa a la variación de factores ambientales asociada a la latitud. Particularmente, las variables climáticas precipitación media anual e índice de aridez mostraron correlaciones significativas con la variación foliar.

Otro aspecto notorio confirmado en este trabajo fue el número de mucrones (estructuras dentadas) en el borde foliar en respuesta al gradiente latitudinal, identificado mediante una regresión lineal que dio una correlación positiva significativa ($r = 0.611$; $P < 0.001$) entre el carácter morfológico número de mucrones y la latitud de las poblaciones (Fig. 1). Este resultado es congruente con reportes previos en los que el número de estructuras dentadas (lóbulos, aristas y mucrones) del borde foliar de especies de ambientes méxicos muestra una correlación negativa significativa con la temperatura media anual del lugar, en el que tales estructuras dentadas proporcionan ventaja selectiva a estas especies cuando la temperatura es limitante pero la humedad y los nutrientes no lo son (Royer *et al.*, 2005; Royer y Wilf, 2006).

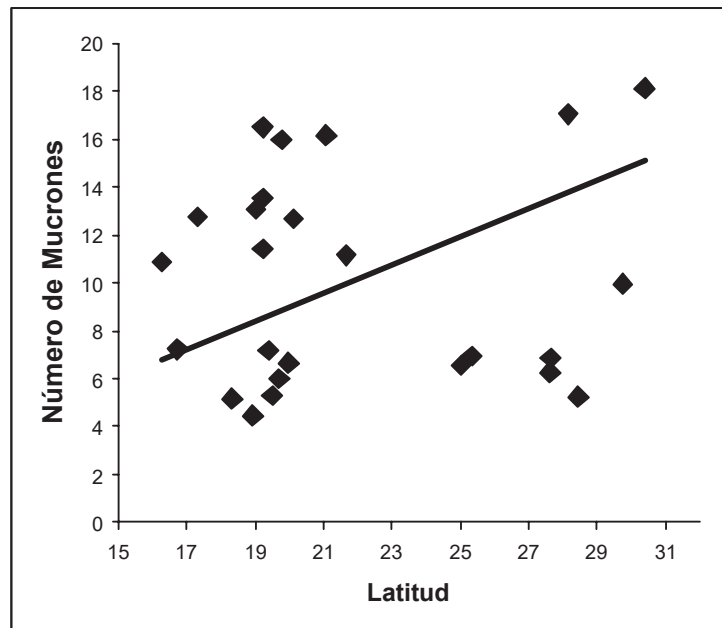


Fig. 1. Regresión lineal entre la latitud de 25 poblaciones mexicanas de *Quercus rugosa* y el carácter morfológico número de mucrones (NM) ($r = 0.611$; $P < .001$).

Así mismo, cabe mencionar que la altitud de los lugares de colecta también mostró correlación significativa con los caracteres morfológicos foliares (Fig. 2) como lo reporta Li y col. (2006) para la especie *Q. aquifolioides*. El patrón de variación altitudinal encontrado en *Q. aquifolioides* fue explicado como resultado

de cambios en la concentración de CO₂ asociados con la altitud de los sitios de muestreo.

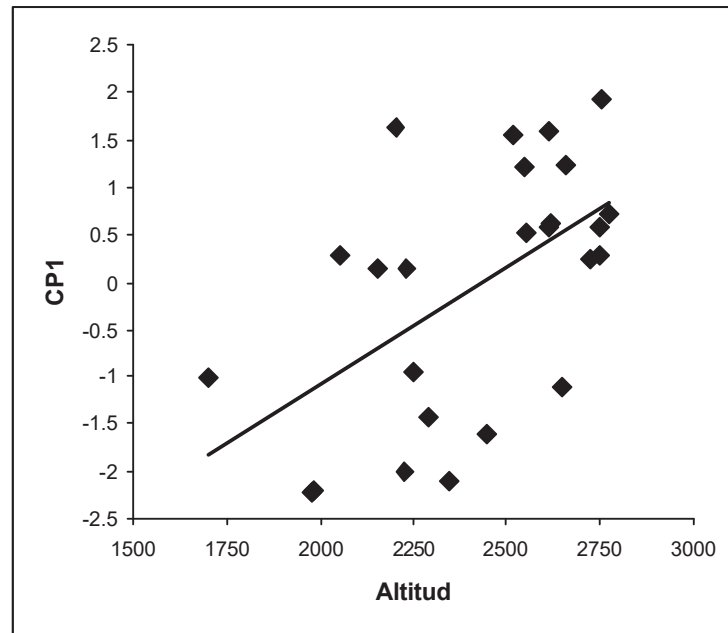


Fig. 2. Regresión lineal entre la altitud de 25 poblaciones mexicanas de *Quercus rugosa* y la variable morfológica componente principal 1 (CP1) ($r = 0.551$; $P < .004$).

El patrón clinal latitudinal y altitudinal de variación morfológica observado para los caracteres de hoja de *Q. rugosa* se ha encontrado también en otras especies de plantas (Rico-Gray y Palacios-Ríos, 1996; Bussotti *et al.*, 2000; Harris y Beveer, 2002; Cardillo y Bernal, 2006; Calagari *et al.*, 2006). Estos reportes ilustran la asociación de los patrones latitudinales y altitudinales observados en la morfología, con variables físicas.

Por lo anterior, considerando que los caracteres morfológicos pueden ser controlados por genes que están sujetos a la selección (Fernández-Manjarrez *et al.*, 2006), las diferencias latitudinales en el territorio mexicano habrían operado en el patrón de diferenciación local ahora reconocido en el grupo de poblaciones en estudio de *Q. rugosa*. Esta diferenciación local tiene un significado adaptativo, donde la disminución en el tamaño de las hojas les permite sobrevivir en ambientes más secos y áridos; por el contrario, hojas con mayor tamaño son de plantas de sitios más húmedos y menos áridos (Capítulo 1). Actualmente está

siendo desarrollado un estudio en *Q. rugosa* para explorar el significado fisiológico de varios caracteres micromorfológicos de la hoja, así como investigar la expresión génica bajo condiciones de estrés hídrico (Llanderal-Mendoza y González-Rodríguez, en proceso), basado en el patrón clinal latitudinal identificado en el presente estudio.

Análisis molecular

Los niveles de diversidad genética encontrados en este trabajo son los más altos reportados hasta ahora para especies de este género, teniendo la diversidad genética total (h_T) un valor muy elevado (0.987), al igual que la diversidad dentro de las poblaciones ($h_s = 0.765$). Por otra parte, se encontró una proporción relativamente baja de diferenciación entre todas las poblaciones ($G_{ST} = 0.225$) y la ausencia de estructura geográfica y filogeográfica ($R_{ST} = 0.296$, $P = 0.187$). Lo anterior son los hallazgos centrales del estudio molecular de esta tesis (Capítulo 2). De acuerdo a los análisis presentados en este trabajo, los marcadores neutros de cloroplasto utilizados sugieren la persistencia de las poblaciones de *Q. rugosa* en virtud de los niveles altos de diversidad genética total, alta diversidad genética dentro de las poblaciones, así como un número bajo de haplotipos inferidos en el análisis de las relaciones genealógicas. El análisis de varianza (AMOVA) basada en los polimorfismos obtenidos con 6 loci microsatélites de cloroplasto muestra que el 69.33% de la variación total fue debida a diferencias dentro de poblaciones, el 24.88% de la variación genética total fue debida a diferencias entre poblaciones dentro de regiones y el 5.8% de la variación total es explicada por diferencias entre las regiones fisiográficas (Cuadro 1). La alta variación observada al interior de las poblaciones implica una tasa alta de mutación que puede ser el resultado de los procesos de expansión de las poblaciones y diversificación de los haplotipos (ver Discusión, Capítulo 2). Por su parte, el significado de la proporción baja de la varianza total entre regiones fisiográficas (no hubo alguna región específica con diversidad genética mayor) es la no existencia de regiones utilizadas como refugios; en otras palabras, los resultados del Cuadro 1, apoyan la premisa de un menor impacto de la historia climática sobre las comunidades de plantas templadas de latitudes medias en comparación con la de plantas templadas de latitudes mayores.

Cuadro 1. Distribución de la varianza molecular por nivel jerárquico en *Q. rugosa*

Caracter	Entre regiones ¹		Poblaciones (regiones)		Poblaciones %
	%	P	%	P	
6 loci	5.80	0.0001	24.88	0.0001	69.33
Microsatélites (cp)					

¹ Regiones fisiográficas de México (Sierra Madre Occidental, Sierra Madre Oriental, Eje Volcánico Transversal y Sierra Madre del Sur). Para facilitar el análisis, la población de San Cristóbal de las Casa, Chis. fue incluida en el grupo de la Sierra Madre del Sur y la población de Guanajuato, Gto. fue incluido en el grupo de la Sierra Madre Oriental.

Los componentes de la varianza y los niveles de significancia fueron determinados con un AMOVA anidado en el Programa ARLEQUIN versión 2.000.

Estos resultados son consistentes con la hipótesis previa de que los cambios climáticos del Pleistoceno ejercieron un impacto moderado sobre las poblaciones de encinos. Los estudios moleculares de la flora templada de México disponibles (Cuenca *et al.*, 2003; González-Rodríguez *et al.*, 2004b; Jaramillo–Correa *et al.*, 2006; Delgado *et al.*, 2007; Jaramillo–Correa *et al.*, 2008), sugieren una historia evolutiva en la que habrían predominado fragmentaciones, aislamiento, contracciones y expansiones cíclicas de las poblaciones, así como ausencia de migraciones a larga distancia durante los periodos interglaciares.

Contrastando con lo anterior, existe un número importante de reportes que documentan el patrón geográfico de variación genética intraespecífica para un gran número de especies de plantas de origen templado de latitudes mayores, que reflejan una historia evolutiva compartida por un amplio grupo de especies de diferentes familias (Sewell *et al.*, 1996; King y Ferris, 1998; Petit *et al.*, 2002a). Por ejemplo, el patrón mostrado por las comunidades de plantas Europeas de origen templado representa una fuerte estructuración geográfica de los linajes de cloroplasto, principalmente a lo largo de un gradiente longitudinal, como resultado de la recolonización del territorio a partir de las regiones identificadas como refugios al final del último máximo glacial; esta huella genética implica niveles de

diversidad genética mayores en los refugios y una disminución gradual de la diversidad que indica la dirección de la migración.

Aún la historia evolutiva de los encinos mexicanos es poco clara, se necesita un mayor número de trabajos que involucren a este grupo de plantas para lograr una mayor comprensión de los eventos históricos que han afectado la distribución de la diversidad genética de las especies de este género en México.

Aportaciones del estudio morfológico y molecular de esta tesis

El patrón clinal de variación morfológico foliar de *Quercus rugosa* analizado en este estudio, apoya la hipótesis de selección de caracteres de la hoja favorecidos a lo largo de un gradiente geográfico y ecológico (Endler, 1977). Por su parte, el estudio sobre el análisis de la variación molecular de marcadores de cloroplasto neutros o casi neutros a la selección en *Q. rugosa*, fue útil para evidenciar una alta tasa de mutación dentro de las poblaciones, así como la persistencia histórica de las mismas, implicando un impacto menor de los cambios climáticos sobre sus comunidades, en comparación con lo reportado para plantas de origen templado de latitudes mayores (Sewell *et al.*, 1996; King y Ferris, 1998; Petit *et al.*, 2002a).

El agrupamiento UPGMA basado en 6 loci microsatélites de cloroplasto (Fig. 3 A), muestra grupos de poblaciones que no necesariamente están en proximidad geográfica; este agrupamiento fue confirmado por la prueba de Mantel, la cual no detectó correlación entre la matriz de distancias genéticas pareadas y la matriz de distancias geográficas correspondientes. Lo anterior puede estar indicando una historia evolutiva compleja de las poblaciones de *Q. rugosa* de México, en donde la dirección de la migración y las dinámicas de flujo de genes entre poblaciones aún son poco claras.

Por el contrario, el agrupamiento UPGMA desarrollado con datos de 10 atributos morfológicos resolvió grupos de poblaciones que corresponden a áreas geográficas distintas. La Fig. 3B, muestra el agrupamiento de las poblaciones basado en 10 caracteres morfológicos foliares de *Q. rugosa*. Este agrupamiento UPGMA reconoció dos grupos principales de poblaciones; el primer grupo representado por las poblaciones del centro y sur de México, localizadas en el Eje Volcánico Transversal, Sierra Madre del Sur y Los Altos de Chiapas (agrupación superior). El segundo grupo, está integrado por poblaciones del norte de México,

localizadas en la Sierra Madre Occidental y Sierra Madre Oriental (agrupación inferior). La población de Mariano Escobedo, Veracruz parece ser única morfológicamente y diferenciada de ambos grupos principales.

Valencia (comunicación personal) sugiere que a nivel de los caracteres micromorfológicos foliares (como los tricomas), las poblaciones de *Q. rugosa* del sureste mexicano y de Centroamérica están diferenciadas del resto de las poblaciones de la especie. Esta hipótesis parece estar soportada por el UPGMA basado en caracteres morfológicos, ya que en la Fig. 3B, se observa una agrupación (la más externa del grupo de poblaciones del centro y sur), con las poblaciones del sur de México (Tecoltepec, Pue. (TecoIPue), Corral de Piedras, Oax. (CoPieOax), San Juan Mixtepec, Oax. (SJMixOax) y San Cristóbal de las Casas, Chis. (SCriChis) conformando un subgrupo diferenciado del resto del grupo.

Presentados juntos, ambos agrupamientos UPGMA muestran la incongruencia entre los diferentes marcadores, interpretada como una indicación de que son afectados por diferentes fuerzas evolutivas. Aparentemente, mientras que el patrón de variación de los caracteres morfológicos es moldeada principalmente por la presión diferencial de selección, producto de un gradiente climático de aridez norte-sur, el patrón de variación de los caracteres moleculares son moldeados principalmente por la deriva génica y el flujo genético entre poblaciones. Así mismo, esta incongruencia implica que los haplotipos identificados en las poblaciones no son indicativos de las características morfológicas de las hojas.

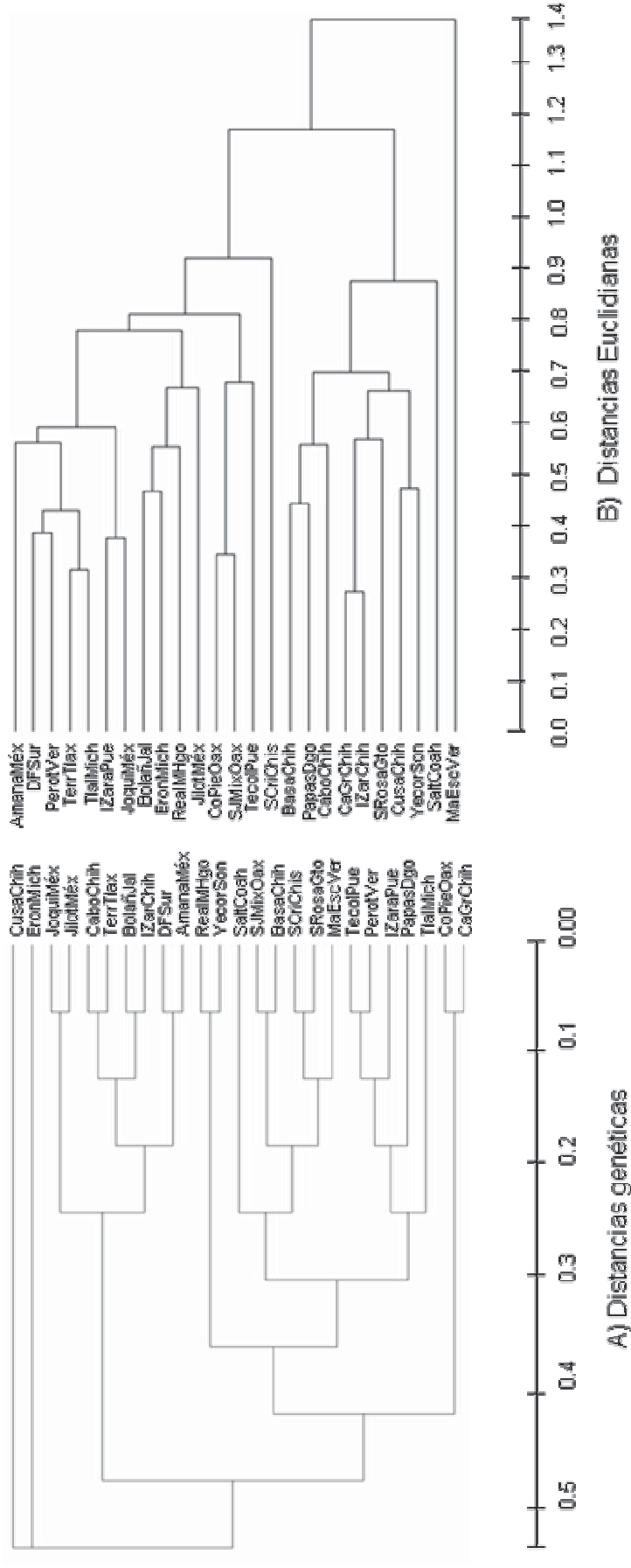


Figura 3.- Comparación de los patrones de similitud de las 25 poblaciones de *Quercus rugosa* Née basados en distancias genéticas de Nei entre poblaciones, obtenidas a partir de 6 loci microsatélites de cloroplasto (A) y distancias Euclidianas obtenidas a partir de 10 caracteres morfológicos de la hoja (B).

Una explicación a la incongruencia del agrupamiento mostrado en la Fig. 3A, podría ser similar al planteamiento hecho por Arbogast y Kenagy (2001), quienes propone que la incongruencia podría ser el resultado de la superposición de varios patrones filogeográficos correspondientes al mismo número de episodios de cambio climático, en donde los linajes estarían diversificando como consecuencia de la fragmentación, la contracción y la subsiguiente expansión de las poblaciones, asociadas a los ciclos glaciares del Pleistoceno, lo que junto con la baja tasa de extinción, favorecería la acumulación de los haplotipos divergentes de diferentes linajes. Adicionalmente, los niveles altos de diversidad dentro de poblaciones y de regiones fisiográficas (Cuadro 2) son indicadores probables del establecimiento de las poblaciones a partir de individuos procedentes de varias poblaciones, mediante eventos independientes de migración y dispersión normal, así como dispersión a larga distancia en diferentes tiempos en el pasado (Tremblay y Schoen, 1999). Lo anterior pudiera ser una causa de la presencia de haplotipos derivados de varios linajes de la especie en una misma población (Petit *et al.*, 2002b), de la misma manera, existirían haplotipos derivados de un linaje en varias poblaciones ocasionando que poblaciones geográficamente cercanas y/o distantes estén agrupadas en el dendrograma.

Cuadro 2. Índices de diversidad genética para poblaciones de *Quercus rugosa* agrupadas de acuerdo a las regiones fisiográficas de México

Regiones fisiográficas	GST (se)	RST (se)	hs (se)	hT (se)
Sierra Madre Occidental	0.216 (0.0363)	0.176 (NC)	0.776 (0.0394)	0.990 (0.0167)
Sierra Madre Oriental	0.360 (0.1517)	0.795 (0.1485)	0.640 (0.1421)	1.000 (0.0831)
Eje Volcánico Transversal	0.240 (0.0583)	0.068 (NC)	0.746 (0.0640)	0.982 (0.0203)
Sierra Madre del Sur	0.045 (NC)	0.384 (NC)	0.931 (0.0346)	0.975 (0.0300)

GST: coeficiente de diferenciación genética sobre todas las poblaciones (alelos no ordenados); RST: coeficiente de diferenciación genética sobre todas las poblaciones (alelos ordenados); hs: diversidad genética dentro de poblaciones; hT: diversidad total; se: error estándar (en paréntesis).

Una aportación adicional de los estudios morfológicos y moleculares a gran escala geográfica radica en la identificación de posibles zonas híbridas. En el estudio de *Q. rugosa* mediante caracteres morfológicos de la hoja, identificamos en Mariano Escobedo, Veracruz, una comunidad de *Q. rugosa* con evidencia de posible hibridación, en tanto que el estudio molecular detectó seis haplotipos raros (presentan un tamaño fuera del intervalo esperado), 1 en Yécora, Sonora, 1 en Ignacio Zaragoza, Puebla, 1 en Mariano Escobedo, Veracruz y 3 en Corral de Piedras, Oaxaca, donde la hibridación podría ser una de las explicación posible de la presencia de estos haplotipos en estas poblaciones de *Q. rugosa*.

Así mismo, los estudios moleculares a gran escala geográfica abordados con un enfoque filogeográfico contribuyen con la identificación de regiones importantes para la conservación (Moritz y Faith, 1998).

Predicción de la distribución geográfica potencial de Quercus rugosa bajo condiciones de cambio climático

Se desarrolló un modelo con la distribución potencial de las poblaciones de *Quercus rugosa* durante el último máximo glacial utilizando para ello la temperatura media mínima así como las condiciones de humedad que prevalecieron durante el máximo glacial de acuerdo a Socorro Lozano-García (comunicación personal) (Fig. 4 A). Igualmente se desarrolló un modelo con la distribución potencial actual de las poblaciones de la especie (para efecto de comparación) (Fig. 4B). Primeramente, con el programa BIOCLIM fue posible hacer una estimación de 19 variables climáticas; posteriormente mediante el programa PATN se agrupó a las poblaciones de acuerdo a sus afinidades climáticas. Para la elaboración del modelo, se utilizó la temperatura media mínima, bajo el razonamiento de que el clima tiene una asociación geográfica con la latitud, donde la temperatura media mínima más baja corresponde a la latitud más norteña y la menos baja corresponde al sur de México. El modelo fue desarrollado por regiones geográficas específicas para aumentar la certidumbre, de tal manera que se incorporaron los cambios de temperatura media mínima y precipitación adecuados en cada una de estas agrupaciones del modelo.

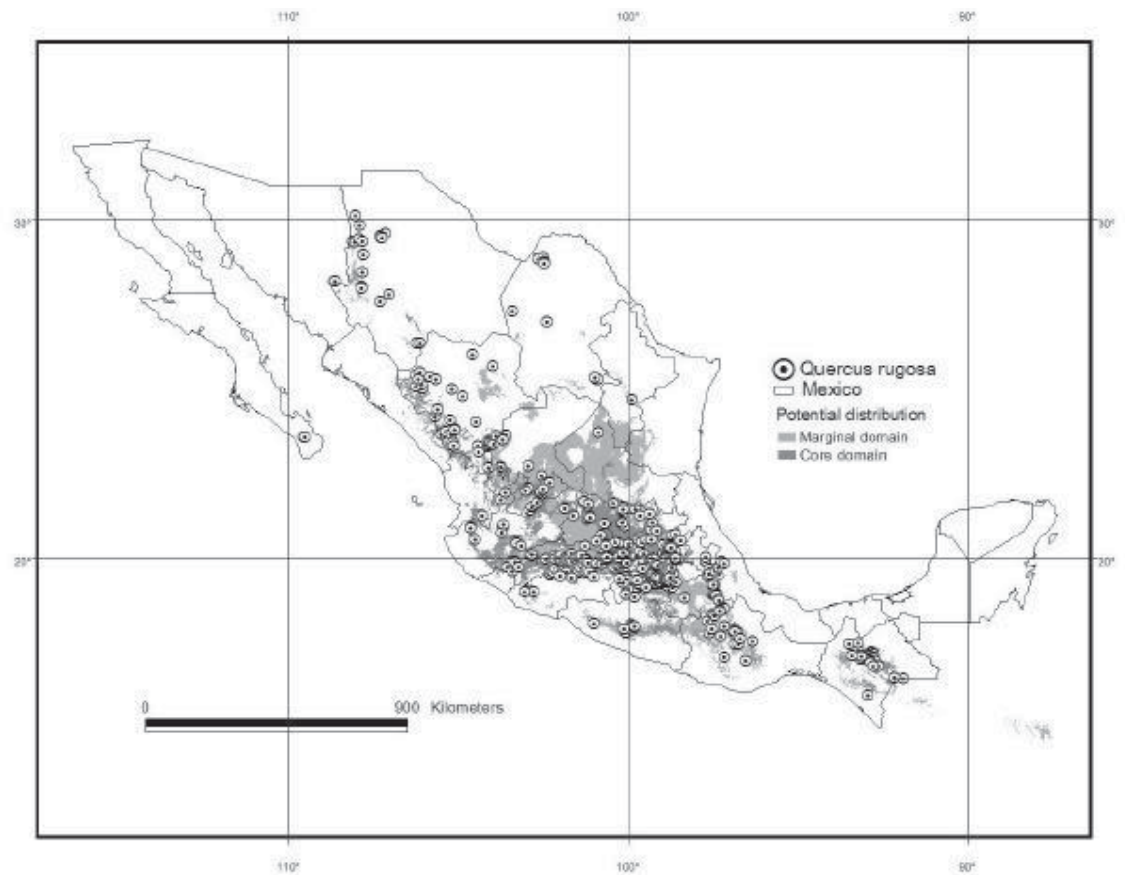


Fig. 4 a). Modelo de distribución potencial de *Quercus rugosa* durante el último máximo glacial (hace 21 000-18 000 años). El núcleo de distribución potencial de *Q. rugosa* durante el último máximo glacial está sombreado en gris oscuro. Los puntos representan localidades de colecta actuales de herbario.

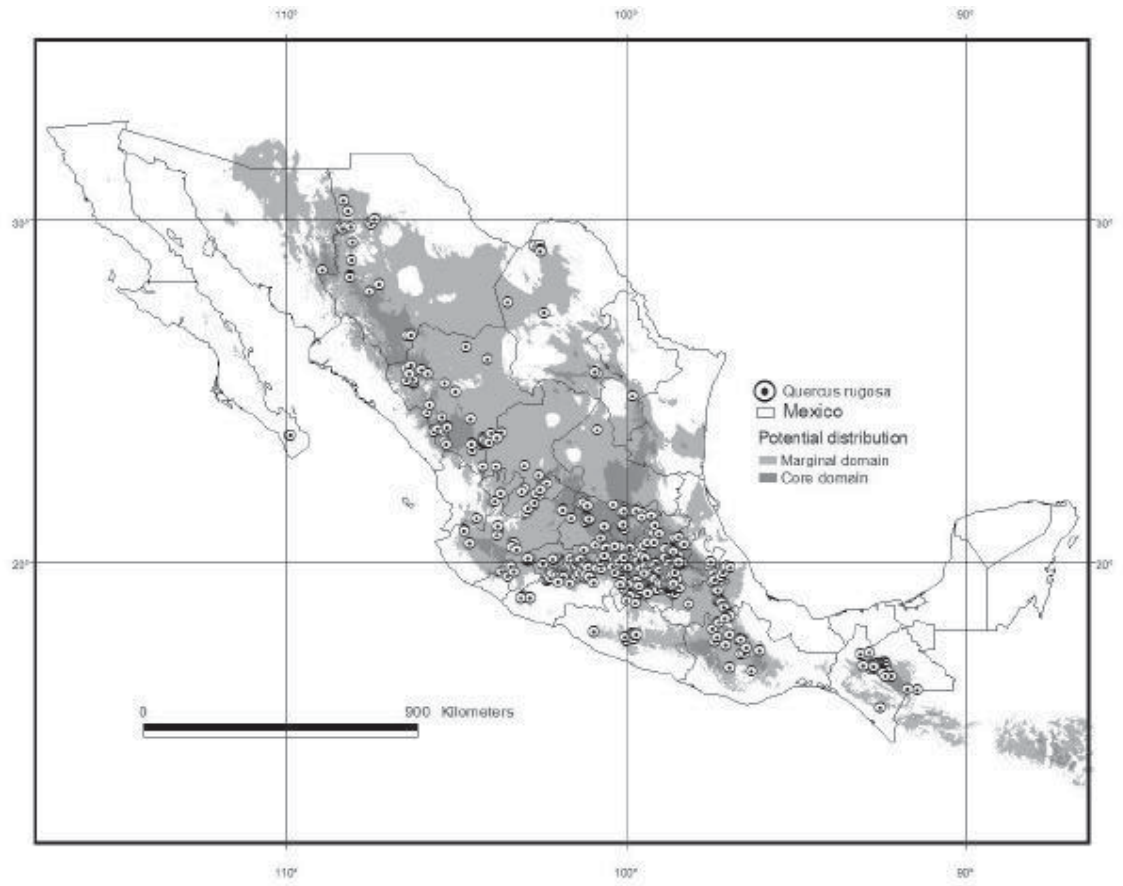


Fig. 4 b). Modelo de distribución potencial de *Quercus rugosa* en el presente. El núcleo de distribución potencial de *Q. rugosa* en el presente está sombreado en gris oscuro. Los puntos representan localidades de colecta actuales de herbario.

Con base en los patrones actuales de diversidad genética compartidos por una variedad de especies de plantas de latitudes altas, es posible predecir una diversidad genética mayor dentro de las poblaciones y una menor diferenciación de las poblaciones persistentes (aquellas que no se extinguieron durante el último cambio climático), a partir de las cuales se habría recolonizado el territorio al final del último máximo glacial. Por el contrario, la diversidad genética dentro de las poblaciones y la diferenciación entre poblaciones recolonizadas sigue un patrón opuesto (King y Ferris, 1998; Petit *et al.*, 2002a). Utilizando los datos moleculares del presente trabajo, desarrollamos análisis estadísticos planteados con base en los modelos de distribución potencial (Figuras 4A y 4B) y se encontró que ambos modelos de distribución para *Q. rugosa* cumplen con esta premisa. Es decir, los índices de diversidad genética estimados para el grupo de poblaciones encontrado

en el núcleo de la distribución potencial durante el último máximo glacial (poblaciones persistentes), tiene una mayor diversidad dentro de poblaciones y una menor proporción de diferenciación entre las poblaciones; en comparación, el grupo de poblaciones que fue encontrado fuera de él (poblaciones recolonizadas), tienen una diversidad genética menor, así como una mayor proporción de diferenciación entre las poblaciones de este grupo (Cuadro 3). Este patrón estaría indicando que las poblaciones persistentes han conservado la diversidad genética dentro de poblaciones a través de varios episodios de cambio climático. En contraste, la recolonización implicaría una ligera disminución de diversidad genética dentro de poblaciones. Esta diferencia baja en los niveles de diversidad es explicable por la distancia geográfica significativamente menor que habrían migrado las poblaciones para recolonizar el área de distribución potencial en México, en comparación con las grandes distancias que debieron hacerlo las poblaciones de árboles de origen templado de mayores latitudes (King y Ferris, 1998; Petit *et al.*, 2002a), las que muestran una disminución notoria en los niveles de diversidad a través de su ruta de recolonización.

Cuadro 3. Índices de diversidad genética para poblaciones de *Quercus rugosa* a través de toda su distribución en México y por grupos diferentes.

	Hpl	Pob.	G _{ST} (se)	R _{ST} (se)	h _S (se)	h _T (se)
Todas las poblaciones	80	25	0.225 (0.0356)	0.296 (NC)	0.765 (0.0365)	0.987 (0.0062)
Persistentes	21	6	0.143 (0.0307)	0.292 (0.1827)	0.827 (0.0353)	0.964 (0.0195)
Recolonizadas	65	19	0.243 (0.0442)	0.300 (NC)	0.746 (0.0463)	0.985 (0.0104)

Hpl: número de haplotipos; Pob: Número de poblaciones; G_{ST}: coeficiente de diferenciación genética sobre todas las poblaciones (alelos no ordenados); R_{ST}: coeficiente de diferenciación genética sobre todas las poblaciones (alelos ordenados); h_S: diversidad genética dentro de poblaciones; h_T: diversidad total; se: error estándar (en paréntesis); NC: no computarizado.

CONCLUSIONES

1. *Quercus rugosa* muestra un patrón latitudinal de variación morfológica foliar asociado a las variables climáticas precipitación anual e índice de aridez, en el que poblaciones del norte, de sitios más áridos, presentan hojas más pequeñas que poblaciones del sur, que presentan hojas más grandes en lugares menos áridos.
2. Con base en el patrón de variación morfológico foliar mostrado, fueron propuestas de manera provisional 6 zonas latitudinales para el movimiento de semilla de *Q. rugosa* con propósitos de reforestación, cada una de ellas de un ancho de 2.5 grados de Latitud.
3. Los loci microsatélites de herencia materna fueron útiles para conocer los niveles de diversidad genética de *Q. rugosa* a través de su ámbito de distribución.
4. *Quercus rugosa* posee una diversidad genética alta, característico de plantas que habitan ambientes contrastantes en un intervalo latitudinal amplio.
5. La estructuración de su variación genética molecular y la baja proporción de diferenciación entre poblaciones, así como la ausencia de una estructura filogeográfica evidente, fue indicativo de una historia evolutiva compleja aún poco clara, aunque diferente de aquella de los encinos de mayores latitudes.
6. No se encontró asociación entre los caracteres morfológicos y moleculares para *Q. rugosa*; por lo tanto, no es posible inferir haplotipos a partir de la información morfológica foliar o viceversa.

VIII. PERSPECTIVAS

El presente trabajo sobre la especie *Quercus rugosa* representa una primera aproximación en el estudio de cómo está organizada la variación morfológica y genética (molecular) de la especie y de los factores ambientales e históricos que las causan.

De este trabajo conocemos que *Q. rugosa* muestra una clina latitudinal y climática de variación morfológica foliar, en tanto que la variación morfológica causada por el proceso de hibridación aún no ha sido documentada. En el transcurso del estudio fue posible identificar mediante el análisis morfológico y molecular, sitios ya reconocidos o potenciales de hibridación entre *Q. rugosa* y otras especies de la sección *Quercus*. Específicamente Spellenberg (1995) reportó la hibridación entre *Q. rugosa* X *Q. depressipes* en El Parque Nacional “Cascada de Basaseachic” en Basaseachic, Chih. Otros sitios donde estaría ocurriendo la hibridación son: Erongarícuaro Mich. (*Q. rugosa* X *Q. obtusata*) (S. Zamudio, comunicación personal) y posiblemente Mariano Escobedo, Ver. Los procesos que subyacen a la hibridación en esta especie, aún carecen de un estudio formal.

De igual manera, en el aspecto molecular se desconocen los patrones de segregación de los marcadores moleculares de núcleo y de cloroplasto durante el proceso de hibridación.

Queda por desarrollar el análisis de los niveles y la distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones de la especie, así como estimar el flujo de genes entre poblaciones utilizando marcadores de núcleo (microsatélites) (Takahashi, 2003) a la escala geográfica del presente estudio, aspecto básico para el desarrollo de estrategias de conservación de los recursos genéticos; la información generada aportaría adicionalmente elementos para contribuir con el entendimiento de los procesos que subyacen la diversidad genética de la especie y su distribución (Bruschi *et al.*, 2003b).

Otro aspecto que sería de gran interés en trabajos futuros, es el estudio del patrón geográfico de variación de caracteres cuantitativos mediante ensayos de procedencia, con el objetivo de separar el efecto genético del ambiental, y con ello entender los patrones de variación adaptativa. Esto permitiría desarrollar una propuesta definitiva de zonificación para la colecta y movimiento de semillas y

plantas, con base en criterios latitudinales, altitudinales u otros, a partir de la información generada (Matyas y Yeatman, 1992; Savva *et al.*, 2007).

Tal propuesta sería importante no sólo para *Quercus rugosa*, sino también para otras especies de encinos. Por ello, para desarrollar estudios de adaptabilidad con encinos mexicanos con fines de reforestación, sería recomendable establecer ensayos de especies y procedencias, a fin de obtener datos de campo de cómo la variación genética existente entre y dentro de especies, se puede utilizar para lograr un buen acoplamiento entre genotipos y ambientes (Zobel y Talbert, 1992; Domínguez-Lerena *et al.*, 2001).

Ante la carencia de antecedentes detallados sobre la fenología de *Q. rugosa*, actualmente está siendo desarrollado un trabajo dirigido al entendimiento de algunos aspectos fenológicos en una comunidad de esta especie localizada en Erongarícuaro, Mich. De acuerdo a observaciones en ejemplares de herbario de *Q. rugosa*, existe un desfazamiento latitudinal en las etapas fenológicas, específicamente notorio en la etapa que comprende desde la floración hasta la maduración de las bellotas y que consiste en la presencia de flores masculinas y femeninas y posteriormente de bellotas, tales estructuras de floración y fructificación anteceden temporalmente en los ejemplares de poblaciones de menores latitudes, y su presencia progresivamente va siendo observada en los ejemplares colectados de poblaciones de mayores latitudes. Mediante un estudio a mayor escala que involucre simultáneamente a varios sitios de diferentes latitudes, se podrá corroborar lo anterior. Otro aspecto de interés son los ciclos de producción masiva de semillas; de acuerdo a la literatura, tales ciclos en encinos pueden abarcar 4 ó 5 años dependiendo de la especie. El trabajo que se desarrolla en Erongarícuaro, Michoacán indica que los ciclos de producción masiva de bellotas en *Q. rugosa* se presentan en intervalos no menores a 4 años. Además, con un estudio a largo plazo (10-15 años), se podrá conocer si el intervalo temporal de los ciclos de producción es consistente o si éste se ve afectado por factores ambiente-temporales; de igual manera, es de interés conocer si la duración del ciclo de producción masiva de bellotas es consistente a través de la distribución geográfica de las poblaciones de la especie.

IX. REFERENCIAS GENERALES

- Albarrán-Lara A., Mendoza-Cuenca L., Valencia-Ávalos S., González-Rodríguez A. y Oyama K. Morphological and molecular differentiation between two hybridizing oak *Quercus magnoliifolia* and *Quercus resinosa* (Fagaceae) through an altitudinal gradient in Mexico. En preparación.
- Arbogast B.S. y Kenagy, G.J. 2001. Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *Journal of Biogeography* 28: 819-825.
- Arnold M.L. 1997. Natural hybridization and evolution. Oxford University Press, Oxford. U.K.
- Avice J.C., Arnold J. y Ball R.M. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Sistematics* 18: 489-522.
- Avice J.C. 2000. Phylogeography: The history and formation of species. Harvard University Press, Londres.
- Axelrod D.I. 1975. Evolution and biogeography of the Madrean-Tethyan sclerophyll vegetation. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 62: 280-334.
- Bogdan S., Katicic-Trupcevic I. y Kajba D. 2004. Genetic variation in growth traits in a *Quercus robur* L. open-pollinated progeny test of the Slavonian provenance. *Silvae Genetica* 53: 5-6.
- Bonfil C. y Soberón J. 1999. *Quercus rugosa* seedling dynamics in relation to its re-introduction in a disturbed Mexican landscape. *Applied Vegetation Science* 2: 189-200.
- Borgardt S.J. y 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. I-II-1979.
- Bruschi P., Grossoni P. y Bussotti F. 2003a. 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. y Grossoni P. 2003b. Morphological and molecular diversity among Italian populations of *Quercus petraea* (Fagaceae). *Annals of Botany* 91: 707-716.
- Bussotti F., Borghini F., Celesti C., Leonzio C. y Bruschi P. 2000. Leaf morphology and macronutrients in broadleaved trees in central Italy. *Trees* 14: 361-368.
- Caballero-Miranda M.E. 1997. The last glacial maximum in the Basin of Mexico: the diatom record between 34,000 and 15,000 years BP from Lake Chalco. *Quaternary International* 43/44: 125-136.
- Calagari M., Modirrahmati A.R. y Asadi F. 2006. Morphological variation in leaf traits of *Populus euphratica* Oliv. natural populations. *International Journal of Agriculture and Biology* 8: 754-758.
- Cannon C.H. y Manos P.S. 2003. Phylogeography of the Southeast Asian stone oaks (*Lithocarpus*). *Journal of Biogeography* 30: 211-226.
- Cardillo E. y Bernal C.J. 2006. Morphological response and growth of cork oak (*Quercus suber* L.) seedlings at different shade levels. *Forest Ecology and Management* 222: 296-301.
- Cavers S., Navarro C. y Lowe J. 2003. Chloroplast DNA phylogeography reveals colonization history of a Neotropical tree, *Cedrela odorata* L., in Mesoamerica. *Molecular Ecology* 12: 1451-1460.
- CONABIO, 2009. *Quercus rugosa*. Anales de Ciencias Naturales 3: 275. www.conabio.gob.mx (Accesada en enero del 2009).
- Cuenca A., Escalante A.E. y Piñero D. 2003. Long-distance colonization, isolation by distance, and historical demography in a relictual Mexican pinyon pine (*Pinus nelsonii* Shaw) as revealed by paternally inherited genetic markers (cpSSRs). *Molecular Ecology* 12: 2087-2097.
- Curtu A.L., Gailing O. y Finkeldey R. 2007. Evidence for hybridization and introgression within a species-rich oak (*Quercus* spp.) community. *MBC Evolutionary Biology* 7: 218.
- Deguilloux M.F., Dumolin-Lapégue S., Gielly L., Grivet D. y Petit R.J. 2003. A set of primers for the amplification of chloroplast microsatellites in *Quercus*. *Molecular Ecology Notes* 3: 24-27.

- Delgado P., Salas-Lizana R., Vázquez-Lobo A., Wegier A., Anzidei M., Alvarez-Buylla E.R., Vendramin G.G. y Piñero D. 2007. Introgressive hybridization in *Pinus montezumae* Lamb and *Pinus pseudostrobus* Lindl. (Pinaceae): Morphological and molecular (cpSSR) evidence. *International Journal of Plant Science* 168: 861-875.
- Denk T., Grimm G., Stogerer K., Langer M. y Hemleben V. 2002. The evolutionary history of *Fagus* in western Eurasia: Evidence from genes, morphology and the fossil record. *Plant Systematics and Evolution* 232: 213-236.
- Domínguez-Lerena S., Murrias G., Herrero S.N. y Peñuelas R.J.L. 2001. Cultivo de once especies mediterráneas en vivero: implicaciones prácticas. *Ecología* 15: 213-223.
- Dumolin S., Demesure B. y Petit R.J. 1995. Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 1253-1256.
- Dumolin-Lapègue S., Demesure B., Fineschi S., Le Corre V. y Petit R.J. 1997. Phylogeographic structure of white oaks throughout the European continent. *Genetics* 146: 1475-1487.
- Dumolin Lapègue S., Kremer A. y Petit R.J. 1999. Are chloroplast and mitochondrial DNA variation species independent in oaks? *Evolution* 53: 1406-1413.
- Endler J.A. 1977. Geographic Variation, Speciation and Clines. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Fernandez-Manjarrez J.F., Gerard P.R., Dufour J., Raquin C. y Frascaria-Lacoste N. 2006. Differential patterns of morphological and molecular hybridization between *Fraxinus excelsior* L. and *Fraxinus angustifolia* Vahl (Oleaceae) in eastern and western France. *Molecular Ecology* 15: 3245-3257.
- Ferrusquía-Villafranca I. 1993. Geology of Mexico: a sinopsis. In: Ramamoorthy T.P., Bye R., Lot A., Fa J. (Eds.) Biological diversity of Mexico: origins and distribution, 397-420. Oxford University Press, New York.
- González R.R. 1993. La Diversidad de los Encinos Mexicanos. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural* Vol. Esp. (XLIV) 125-142 pp.

- González-Rodríguez A., Arias D.M., Valencia S. y Oyama K. 2004a. Morphological and RAPD analysis of hybridization between *Quercus affinis* and *Q. laurina* (Fagaceae), two Mexican red oaks. *American Journal of Botany* 91: 401-409.
- González-Rodríguez A., Bain J.F., Golden J.L. y Oyama K. 2004b. Chloroplast DNA variation in the *Quercus affinis* - *Q. laurina* complex in Mexico: geographical structure and associations with nuclear and morphological variation. *Molecular Ecology* 13: 3467-3476.
- Graham A. 1993. History factors of the biological diversity of Mexico. In: Ramamoorthy, T.P., Bye, R., Lot, A., Fa, J. (Eds.), Biological diversity of Mexico: origins and distribution, 3-107. Oxford University Press, New York.
- Graham A. 1999. The Tertiary history of the northern temperate element in the northern Latin American biota. *American Journal of Botany* 86: 32-38.
- Grivet D., Deguilloux M.F., Petit R. y Sork V.L. 2006. Contrasting patterns of historical colonization in white oaks (*Quercus* spp.) in California and Europe. *Molecular Ecology* 15: 4085-4093.
- Gurevitch J. 1992. Sources of variation in leaf shape among two populations of *Achillea lanulosa*. *Genetics Society of America* 130: 385-394.
- Hamrick J.L. y Godt M.J.W. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*. 351: 1291-1298.
- Harris W. y Beever R.E. 2002. Genotypic variation of leaf characteristics of wild populations of *Cordyline australis* (Lomandraceae) in New Zealand. *New Zealand Journal of Botany* 40: 457-472.
- Herrera-Arroyo M.L. 2005. Análisis de la morfología foliar de tres especies de encinos mexicanos *Quercus conzattii*, *Q. urbanii* y *Q. eduardii* (Fagaceae: Lobatae), variación, diferenciación e hibridación. Tesis de maestría, UNAM. México.
- Himrane H., Camarero J.J. y Gil-Pelegrín E. 2004. Morphological and ecophysiological variation of the hybrid oak *Quercus subpyrenaica* (*Q. faginea* x *Q. pubescens*). *Trees* 18: 566-575.
- Hovenden M.J. y Vander Schoor J.K. 2006. The response of leaf morphology to

- irradiance depends on altitude of origin in *Nothofagus cunninghamii*. *New Phytologist* 169: 291-297.
- Jaramillo-Correa J.P., Beaulieu J., Ledig F.T. y Bousquet J. 2006. Decoupled mitochondrial and chloroplast DNA population structure reveals Holocene collapse and population isolation in a threatened Mexican-endemic conifer. *Molecular Ecology* 15: 2787-2800.
- Jaramillo-Correa J.P., Aguirre-Planter E., Khasa D.P., Eguiarte L.E., Piñero D., Furnier G.R. y Bousquet J. 2008. Ancestry and divergence of subtropical montane forest isolates: molecular biogeography of the genus *Abies* (Pinaceae) in southern Mexico and Guatemala. *Molecular Ecology* 17: 2476-2490.
- Jensen J.S. y Deans J.D. 2004. Late autumn frost resistance of twelve North European Provenances of *Quercus* species. *Scandinavian Journal of Forest Research* 19: 390-399.
- King R.A. y Ferris C. 1998. Chloroplast DNA phylogeography of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. *Molecular Ecology* 7: 1151-1161.
- Lesser M.R. y Parker W.H. 2004. Genetic variation in *Picea glauca* for growth and phenological traits from provenance test in Ontario. *Silvae Genetica* 53: 141-148.
- Lewin B. 1994. Genes V. Oxford University Press. Oxford.
- Lewington R. y Streeter D. 1993. La historia natural de los robles. Dorling-Kindersley, España.
- Li C., Zhang X., Liu X., Luukkanen O. y Berninger F. 2006. Leaf morphological and physiological responses of *Quercus aquifolioides* along an altitudinal gradient. *Silva Fennica* 40: 5-13.
- Lozano-García M.S. y Xelhuantzi-López M.S. 1997. Some problems in the late quaternary pollen records of central Mexico: Basins of Mexico and Zacapu. *Quaternary International* 43/44: 117-123.
- Lozano-García S., Sosa-Nájera S., Sugiura Y. y Caballero M. 2005. 23,000 yr of vegetation history of the Upper Lerma, a tropical high-altitude basin in Central Mexico. *Quaternary Research* 64: 70-82.
- Magni C.R., Ducousso A., Caron H., Petit R.J. y Kremer A. 2005. Chloroplast DNA variation of *Quercus rubra* L. in North America and comparison with

- other Fagaceae. *Molecular Ecology* 14: 513-524.
- Manos P.S., Doyle J.J. y Nixon K.C. 1999. Phylogeny, biogeography, and processes of molecular differentiation in *Quercus* subgenus *Quercus* (Fagaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12: 333-349.
- Matyas C. y Yeatman C.W. 1992. Effects of geographical transfer on growth and survival of jack pine (*Pinus banksiana* Lamb.) populations. *Silvae Genetica* 43: 370-376.
- McVaugh R. 1974. Flora Novo-Galiciana. Contr. Univ. Michigan Herb. 12, 3: 1-93.
- Moritz C. y Faith D.P. 1998. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular Ecology* 7: 419-429.
- Nienstaedt H., Clausen K.E. y Eguiluz-Piedra T. 1990. La primera zonificación de semillas en México: caso Durango y Chihuahua. *Nota Técnica* 6 Centro de Genética Forestal, A. C., Chapingo, México. 9 p.
- Nixon K.C. 1993. The genus *Quercus* in México. 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.
- Palmer J.D. 1985. Evolution of chloroplast and mitochondrial DNA in plants and algae. En: MacIntyre R.J. (Ed.). *Molecular Evolutionary Genetics*. Pp. 131-240. Plenum Press, New York.
- Peñaloza-Ramírez J.M., González-Rodríguez A., Mendoza-Cuenca L., Caron H., Kremer A. y Oyama K. Atitudinal patterns of interspecific gene flow in a multispecies oak hybrid zone in the Sierra Tarahumara, Mexico. Sometido en *American Journal of Botany*.
- Petit R.J., Pineaud E., Demesure B., Bacilieri R., Ducousso A. y Kremer A. 1997. Chloroplast DNA footprints of postglacial recolonization by oaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 9996-10001.
- Petit R.J., Brewer S., Bordács S., Burg K., Cheddadi R., Coart E., Cottrell J., Csaikl U.M., van Dam B., Deans J.D., Espinel S., Fineschi S., Finkeldey R., Glaz I., Goicoechea P.G., Jensen J.S., König A.O., Lowe A.J., Madsen S.F., Mátías G., Munro R.C., Popescu F., Slade D., Tabbener H., de Vries S.G.M., Ziegenhagen B., de Beaulieu J.L. y Kremer A.

- 2002a. 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.
- Petit R.J., Csai Kl U.M., Bordács S., Burg K., Coart E., Cottrell J., Van Dam B., Deans J.D., Dumolin-Lapegue S., Fineschi S., Finkeldey R., Gillies A., Glaz I., Goicoechea P.G., Jensen J.S., König A.O., Lowe A.J., Madsen S.F., Mátías G., Munro R.C., Olalde M., Pemonge M.H., Popescu F., Slade D., Tabbener H., Turchini D., de Vries S.G.M., Ziegenhagen B. y Kremer A. 2002b. Chloroplast DNA variation in European white oaks. Phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management* 156: 5-26.
- Rico-Gray V. y Palacios-Ríos M. 1996. Leaf area variation in *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae) along a latitudinal gradient in Mexico. *Global Ecology and Biogeography* 5: 30- 35.
- Rehfeldt G.E. 1991. A model of genetic variation for *Pinus ponderosa* in the Inland Northwest (U.S.A.): applications in gene resource management. *Canadian Journal of Forest Research* 21: 1491-1500.
- Rieseberg L.H. 1995. The role of hybridization in evolution: old wine in new skins. *American Journal of Botany* 82: 944-953.
- Royer D.L., Wilf P., Janesko D.A., Kowalski E.A. y Dilcher D.L. 2005. Correlations of climate and plant ecology to leaf size and shape: potential proxies for the fossil record. *American Journal of Botany* 92: 1141-1151.
- Royer D.L. y Wilf P. 2006. Why do toothed leaves correlate with cold climates? Gas exchange at leaf margins provides new insights into a classic paleotemperature proxy. *International Journal of Plant Sciences* 167: 11-18.
- Rzedowski J. 1965. Relaciones y orígenes de la flora Mexicana. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 29: 121-177.
- Rzedowski J. 1986. Vegetación de México. Ed. Limusa. México.
- Sáenz-Romero C. 2004a. Zonificación y conservación de coníferas en México. En: Vera C.G., Vargas H.J. y Dorantes L.J. (Eds.) *Uso y Conservación de Recursos Genéticos Forestales*. México, Comisión Nacional Forestal. pp 21-28.

- Sáenz-Romero C. 2004b. Zonificación estatal y altitudinal para la colecta y movimiento de semillas de coníferas en México. *En*: Vargas-Hernández, J.J., Bermejo-Velázquez, B. y Ledig, F.T. (Eds.). Manejo de Recursos Genéticos Forestales. México, CONAFOR-Comisión Forestal de América del Norte. pp 72-86.
- Sáenz-Romero C., Snively A.E. y Lindig-Cisneros R. 2003. Conservation and restoration of pine forest genetic resources in Mexico. *Silvae Genetica* 52: 233-237.
- Sáenz-Romero C. y Clausen K.U. 1991. Zonas provisionales de semillas de especies forestales en el estado de México. Centro de Genética Forestal, A.C. Nota Técnica. Chapingo, México. No. 7.
- Sava I., Denneler B., Koubaa A., Tremblay F., Bergeron Y. y Tjoelker M.G. 2007. Seed transfer and climate change effects on radial growth of jack pine populations in a common garden in Petawawa, Ontario, Canada. *Forest Ecology and Management* 242: 636-647.
- Schaal B.A., Hayworth D.A., Olsen K.M., Rausher J.T. y Smith, W.A. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology* 7: 465-474.
- Sebastiani F., Carnavale S. y Vendramin G.G. 2004. A new set of mono- and dinucleotide chloroplast microsatellites in Fagaceae. *Molecular Ecology Notes* 4: 259-261.
- Sebbenn A. M., Pontinha A.A.S., Giannotti E. y Kageyama P.Y. 2003. Genetic variation in provenance-progeny test of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. In Sao Paulo, Brazil. *Silvae Genetica* 52: 5-6.
- Sewell M.M., Parks C.R. y Chase M.W. 1996. Intraspecific chloroplast DNA variation and biogeography of North American *Liriodendron* L. (Magnoliaceae). *Evolution* 50: 1147-1154.
- Soltis D.E., Gitzendanner M.A., Strenge D.D. y Soltis P.S. 1997. Chloroplast DNA intraspecific phylogeography of plants from the Pacific Northwest of North America. *Plant Systematics and Evolution* 206: 353-373.
- Spellenberg R. 1995. On the hybrid nature of *Quercus basaseachicensis* (Fagaceae, Sect. *Quercus*). *Sida* 16: 427-437.
- Takahashi T., Konuma A., Ohkubo T., Taira H. y Tsumura Y. 2003. Comparison

- of spatial genetic structures in *Fagus crenata* and *F. japonica* by the use of microsatellite markers. *Silvae Genetica* 52: 5-6.
- Tilki F. y Alptekin C.U. 2005. Variation in acorn characteristics in three provenances of *Quercus aucheri* Jaub. et Spach and provenance, temperature and storage effects on acorn germination. *Seed Science and Technology* 33: 441-447.
- Toledo V.M. 1982. Pleistocene changes of vegetation in Tropical Mexico. In Prance G.T. (Ed.) Biological diversification in the Tropics. Pp. 93-111. Columbia University Press, New York.
- Tovar-Sánchez E. y Oyama K. 2004. Natural hibridization and hybrid zones between *Quercus crassifolia* and *Quercus crassipes* (Fagaceae) in Mexico: morphological and molecular evidence. *American Journal of Botany* 91: 1352-1363.
- Tovar-Sánchez E., Mussali-Galante P., Esteban-Jiménez R., Piñero D., Arias D.M., Dorado O. y 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.
- Traiser C., Klotz S., Uhl D. y Mosbrugger V. 2005. Environmental signals from leaves – a physiognomic analysis of European vegetation. *New Phytologist* 166: 465-484.
- Tremblay N. O. y Schoen D. J. 1999. Molecular phylogeography of *Dryas integrifolia*: glacial refugia and postglacial recolonization. *Molecular Ecology* 8: 1187-1198.
- Valencia S. 2004. Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 75: 33-53.
- Valencia A.S. y Nixon C.K. 2004. Encinos. In: García-Mendoza, A.J., Ordóñez, M.J., Briones-Salas, M. (Eds.), Biodiversidad de Oaxaca, 219-226. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo Oaxaqueño para la Conservación de la Naturaleza. World Wildlife Fund. México.
- Warren Ch.R., Tausz M. y 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?

- Tree Physiology* 25: 1369-1378.
- Weising K. y Gardner R.C. 1999. A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome* 42: 9-19.
- Whittemore A.T. y Schaal B.A. 1991. Interspecific gene flow in sympatric oaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88: 2540-2544.
- Zavala F. 1990. Los encinos mexicanos: un recurso desaprovechado. *Ciencia y Desarrollo* vol. XVI, núm. 95.
- Zobel B. y Talbert J. 1992. Técnicas de mejoramiento genético de árboles forestales. Ed. Limusa.