



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICÓLAS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES SOBRE LOS RECURSOS NATURALES

**PATRONES DE DIFERENCIACIÓN GENÉTICA ENTRE ESPECIES DE ENCINOS
BLANCOS A LO LARGO DE UN GRADIENTE ALTITUDINAL EN MÉXICO**

T E S I S

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS EN ECOLOGÍA INTEGRATIVA**

**PRESENTA:
ESTRADA TELLEZ SANDRA LUZ**

**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. YURIXHI MALDONADO LÓPEZ**

**CO-ASESOR:
DR. ANTONIO GONZÁLEZ RODRÍGUEZ**

**REVISORES:
DR. LEONEL LOPEZ TOLEDO
DRA. CLEMENTINA GONZÁLEZ ZARAGOZA
DR. HERNANDO RODRÍGUEZ CORREA**

**Morelia, Mich.
FEBRERO 2022**



Dedicatoria

A María Félix Tellez Huerta y Patricia Vera Caletti mis grandes apoyos en mi vida y a Laila mi compañera eterna.

Agradecimientos

Al Dr. Antonio González Rodríguez por darme la oportunidad de mejorar en mi desarrollo profesional al permitirme trabajar a su lado, siempre atento, respetuoso, paciente y constante.

Al instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo por el apoyo brindado para mi formación académica.

Al financiamiento otorgado con el número 572208 para el desarrollo de este trabajo por parte del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT).

Al proyecto PAPIIT IN207417 “Variación funcional de especies del genero Quercus (Fagaceae) en gradientes altitudinales “por el apoyo económico brindado para el desarrollo de este proyecto de tesis.

Al Laboratorio Nacional de Análisis y síntesis Ecológica (LANASE) y al técnico Mario Antonio Villalda Quesada por su apoyo brindado.

Al Dr. Jesús Llanderal Mendoza por el apoyo técnico brindado en análisis de mis muestras de laboratorio.

Al Laboratorio de Genética de la conservación por el préstamo de sus instalaciones y a mis compañeras de laboratorio Goretti e Ingrid por su paciencia, así como a mis compañeros de campo, Ricardo, Diana y Daniela.

Asi mismo, agradezco a los miembros del jurado, a la Dra. Clementina González Zaragoza, Dr. Hernando Rodríguez Correa y al Dr. Leonel López Toledo por sus comentarios y sugerencias tan pertinentes, gracias a estos se logró concretar un manuscrito final.

A mis papas María Félix Tellez Huerta y a Leonardo Estrada López por su gran amor incondicional.

A mis hermanos por siempre confiar en mí así como a mis sobrinos Naomi e Iker que me han enseñado a ver el mundo con otros ojos.

A mi segunda madre Patricia Vera Caletti quien llegó a mí para enseñándome primero lo bello que es la botánica para después enseñarme a ser cada día un mejor ser humano aconsejándome viendo siempre por mi bienestar.

A mi gran y mejor amiga Jazmín que siempre está para mí en las buenas, las malas y las complicadas dándome ánimos, obligándome a ser cada día mejor, que nuestra amistad dure toda la vida.

A Alejandro Estrada que si viene, por ejemplo, a las cuatro de la tarde; desde las tres yo empezaría a ser dichosa, gracias por siempre ser mi soporte desmedido.

A mi paisana Sara Covarrubias por su enorme paciencia, al explicarme con vocación los temas que me siguen siendo complejos, así como por su tiempo y trabajo ayudándome en la elaboración de las figuras de este documento.

A mis compañeros de la maestría Rubén Ramírez, Antonio Lopez, Berenice Ramírez, María Lourdes Barriga, Gabriela Velazquez y Charles Martinez por nuestro periodo juntos que siempre fue divertido, alegre y lleno de comida.

A Farrah por ser siempre un apoyo moral y gran fortaleza.

Índice

Resumen	6
Abstract	8
Introducción general	10
Evolución del género <i>Quercus</i>	12
Diversidad genética de los encinos en América	15
Marcadores moleculares en encinos	18
Altitudinal patterns of genetic differentiation among white oak species along an altitudinal gradient in México	42
Abstract	43
Keywords: <i>Quercus magnoliifolia</i> , <i>Quercus resinosa</i> , <i>Quercus obtusata</i> , <i>Quercus rugosa</i> , outlier loci, hydric stress, EST-SSRs	43
Introduction	44
Materials and Methods	46
<i>Study site</i>	46
<i>Characterization of oak communities and sample collection</i>	47
<i>DNA extraction and microsatellite genotyping</i>	47
<i>Data analysis</i>	48
Results	49
<i>Species distribution along the altitudinal gradient</i>	49
<i>Outlier loci</i>	51

Resumen

Esclarecer cuales son los procesos que impulsan y dan origen a la diferenciación genética entre las poblaciones de encinos, es una parte fundamental para comprender como se distribuyen a lo largo de las zonas montañosas en México. La diferenciación genética está influenciada por procesos como el aislamiento por distancia, la adaptación local, disminución del flujo génico, endogamia, deriva genética. Dado que los encinos, son árboles de lento crecimiento, es difícil establecer si han desarrollado adaptaciones locales a los cambios ambientales a lo largo de gradientes altitudinales en México. Por lo anterior en la presente tesis se evaluó la diferenciación genética neutral y potencialmente adaptativa al estrés hídrico entre cuatro especies de encinos blancos (*Quercus magnoliifolia*, *Quercus resinosa*, *Quercus obtusata* y *Quercus rugosa*) a lo largo de un gradiente altitudinal en el volcán de Tequila, Jalisco, utilizando dos grupos de marcadores moleculares: microsatélites nucleares (nSSR) y microsatélites bajo selección (EST-SSRs). Los resultados muestran que las especies de encinos blancos presentan dos patrones de agrupación diferentes. Para los nSSR se observaron tres grupos genéticos mostrando una alta proporción del grupo rojo estuvo presente en *Q. magnoliifolia* (0.89) y *Q. resinosa* (0.72), mientras que los grupos verde y azul predominaron en *Q. obtusata* (0.53 y 0.33, respectivamente) y *Q. rugosa* (0.36 y 0.58) donde el mayor porcentaje de individuos puros se encuentra en los gradientes bajos y un mayor flujo genético ascendente. Mientras que los EST SSRs, agruparon a los encinos blancos en tres grupos genéticos, donde la distinción entre *Q. magnoliifolia* y *Q. resinosa* fue más clara, ya que el grupo genético azul predominó en la segunda especie (con una frecuencia de 0.76), mientras que la ascendencia de la primera especie estuvo compuesta

tanto por el grupo genético verde como por el azul (0.56 y 0.41, respectivamente). El grupo genético rojo estuvo en alta frecuencia en *Q. obtusata* (0.71) y, finalmente, *Q. rugosa* mostró una combinación de los grupos rojo (0.52), verde (0.36) y azul (0.12). Donde el flujo de genes se observa de forma ascendente a lo largo del gradiente altitudinal, mostrando un flujo genético continuo. Encontrándose dos EST-SSRs ligados a genes bajo selección divergente entre especies relacionadas con estrés hídrico, genes que al parecer han estado introgresando entre las cuatro especies de encinos. Nuestros resultados sugieren que ocurren diferentes procesos de adaptación dentro de las especies que podría favorecer la adecuación de los encinos ante en futuros cambios ambientales.

Palabras clave: *Quercus obtusata*, *Quercus rugosa*, loci outlier, Estrés hídrico, EST-SSRs

Abstract

Clarifying which are the processes that drive and give rise to genetic differentiation between oak populations is a fundamental part of understanding how they are distributed throughout the mountainous areas in Mexico. Genetic differentiation is influenced by isolation by distance, local adaptation, decreased gene flow, inbreeding, genetic drift. However, in oaks, as they are slow-growing trees, it is unknown whether they have developed local adaptations to environmental changes along the elevational gradients in Mexico. Therefore, we evaluated the neutral and potentially adaptive genetic difference between four species of white oaks (*Quercus magnoliifolia*, *Quercus resinosa*, *Quercus obtusata* and *Quercus rugosa*) along an altitudinal gradient in the Tequila volcano, Jalisco, using two groups of markers. Molecular: nuclear microsatellites (nSSR) and microsatellites under selection (EST-SSRs). The results show that the white oak species present two different grouping patterns. With the nSSR, three genetic groups were observed showing a high proportion of the red group was present in *Q. magnoliifolia* (0.89) and *Q. resinosa* (0.72), while the green and blue groups predominated in *Q. obtusata* (0.53 and 0.33, respectively) and *Q. rugosa* (0.36 and 0.58) where the highest percentage of pure individuals is found in the low gradients and a greater upward genetic flow. While the EST SSRs grouped the white oaks into three genetic groups, where the distinction between *Q. magnoliifolia* and *Q. resinosa* was clearer, since the blue genetic group predominated in the second species (with a frequency of 0.76), while the ancestry of the first species was composed of both the green and blue genetic groups (0.56 and 0.41, respectively). The red genetic group was in high frequency in *Q. obtusata* (0.71) and, finally, *Q. rugosa* showed a combination of the red (0.52), green (0.36) and blue (0.12) groups. Where the gene flow is observed upward along the altitudinal gradient, showing a continuous gene flow. Most of

the microsatellites were slightly differentiated between species, but two gene-linked EST-SSRs deviated significantly as atypical loci under divergent selection among species related to water stress, genes that appear to have been introgressing among oak species. Our results suggest that different adaptation processes occur within species that could help white oaks in future environmental changes.

Keywords: *Quercus magnoliifolia*, *Quercus resinosa*, *Quercus obtusata*, *Quercus rugosa*, outlier loci, hydric stress, EST-SSRs

Introducción general

El género *Quercus* se distribuye a lo largo de todo el hemisferio Norte, siendo uno de los géneros más importantes en diversos tipos de vegetación como bosques templados, tropicales y mesófilos, matorrales desérticos, semidesérticos y de clima mediterráneo (Nixon 1993; Kappelle *et al.*, 1995). Es uno de los grupos más importantes de angiospermas leñosas en términos de diversidad de especies, biomasa, predominio ecológico y valor económico, con un cálculo de aproximadamente 435 especies a nivel mundial (Kappelle *et al.*, 1995; Nixon *et al.*, 1997; Manos *et al.*, 1999; Denk *et al.*, 2017). En México, el género está representado por 161 especies dividido en cuatro grupos distintos: encinos blancos (sección *Quercus*) con 81 especies, encinos rojos (sección *Lobatae*) con 76 especies, encinos dorados (sección *Protobalanus*) con 4 especies y encinos Virentes (sección *Virentes*) con 3 especies.

Un total de 109 especies son endémicas (Manos, 1997; Valencia-A., 2004; Denk *et al.*, 2017), siendo México uno de los centros de diversidad más importantes de encinos blancos y rojos, probablemente como resultado de diversidad topográfica de los sistemas montañosos del país (Hipp *et al.*, 2018), característica que favoreció la adaptación del género ante múltiples latitudes, altitudes, climas, vegetaciones y suelos (Nixon, 1993). En México, los bosques con presencia de encinos cubren aproximadamente la cuarta parte del territorio nacional (Rzedowski, 1991) y son dominantes en diversos sistemas montañosos como la Sierra Madre Oriental, la Sierra Madre Occidental, el Cinturón Volcánico Trans-mexicano y la Sierra Madre del Sur. Las cuales presentan gradientes altitudinales que junto con los regímenes climáticos variados han permitidos que una gran cantidad de especies de encinos se distribuyan por todo el país, adaptándose a condiciones

determinadas de zonas específicas (García *et al.*, 1998). Por ejemplo, Luna-Vega (2006) analizó la composición y estructura de las comunidades de encinos que se encuentran en bosques mesófilos de montaña de México, encontrando que la distribución de las especies está determinada por gradientes de altitud y latitud, donde la diversidad de las comunidades disminuye al aumentar la latitud y elevación.

La altitud desempeña un papel muy importante para la distribución de especies arbóreas (Körner & Paulsen, 2004). En zonas montañas con diversos gradientes altitudinales se ha observado una riqueza alta de especies de encinos en las zonas intermedias de las montañas (Kessler *et al.*, 2012; Ávila-Sánchez *et al.*, 2018; Uribe-Salas *et al.*, 2019). Las condiciones ambientales en un gradiente altitudinal permiten la adaptación de un conjunto de especies o sólo la adaptación de una especie dominante (Cuyckens *et al.*, 2015).

Por ello en las elevaciones más bajas, se observa un incremento en relación con la diversidad funcional de especies de encinos (Barbour *et al.*, 1980; Gentry, 1988; Santiago & Jardel, 1993). Un ejemplo de variación altitudinal es el de los complejos *Quercus greggii*–*Quercus mexicana* y *Quercus saltillensis*–*Quercus laeta*, el segundo complejo está ubicado entre los 2250-2600 msnm, en el bosque de Zapalinamé (Coahuila) el cual en los gradientes altitudinales altos presenta bajas temperaturas albergando una menor diversidad funcional de especies. En comparación el complejo *Quercus saltillensis*–*Quercus laeta*, que se encuentra en altitudes desde los 2000 hasta 2350 msnm. Muestra un mayor número de individuos, así como una mayor diversidad funcional dado que las condiciones ambientales como temperatura y humedad les permite desarrollarse de manera óptima (Domínguez *et al.*, 2007).

Otro ejemplo es el trabajo de Huerta Martínez (2014), donde se observó que la composición de las comunidades de encinos, formadas por *Quercus laurina*, *Quercus obtusata*, *Quercus crassifolia*, *Quercus rugosa*, *Quercus candicans*, *Quercus resinosa*, *Quercus laurina*, *Quercus castanea*, *Quercus glabrescens* y *Quercus crassipes* cambiaba a través de la altitud del volcán de Tequila, con una disminución monotónica en la riqueza y composición de especies al aumentar la altitud encontrándose solo *Q. laurina*, *Q. castanea*, *Q. glabrescens*, *Q. rugosa*, *Q. crassifolia* y *Q. crassipes*. Caso similar es el de *Quercus sideroxyla* (1900-2200 msnm) y *Quercus laceyi* (2050-2800 msnm) distribuidas a lo largo de la sierra de Coahuila donde se observó que tienen una partición en su distribución atribuida a la elevación donde *Quercus laceyi* se encuentra en elevaciones bajas, mientras que *Quercus sideroxyla* está restringida a elevaciones más altas con temperaturas más bajas y humedad relativa más alta, sugiriendo que la elevación es el mecanismo responsable de la diversificación de la especie (Poulos, 2007). Otro ejemplo es el caso de *Quercus aquifolioides* donde a mayor altitud (2800 m) la especie reduce su tamaño, crecimiento, distribución y estructura poblacional, cambiando incluso sus componentes fisiológicos y morfológicos como el tamaño de la hoja (Li *et al.*, 2006).

Evolución del género *Quercus*

México es uno de los dos centros de diversificación del género *Quercus* (Nixon, 1993), con 161 especies, de las cuales 81 especies pertenecen a la sección *Quercus* (encinos blancos) (Valencia, 2004; Valencia-Cuevas *et al.*, 2014). Estas especies están distribuidas a lo largo del país desde el nivel del mar hasta los 3500 msnm (Chávez, 1998). Aunque no se distribuyen uniformemente, debido a las características orográficas únicas de México, se

encuentra una mayor diversidad de especies de encinos en la región central que en el norte del país (Nixon, 1993), siendo el centro de origen del mayor número de especies con el 65% de las 435 especies estimadas en el mundo (Nixon, 1997; Valencia, 2004; Beaulieu & Lamant, 2010).

El género *Quercus* surgió en el Paleoceno hace 56 Ma (Manos & Stanford, 2001; Kremmer *et al.*, 2020), la evidencia más antigua del género es el registro fósil de hojas perfectamente conservadas de la especie *Quercus subfalcata Friedrich* que data de hace 55 Ma localizada en Ménat, Francia. (Barrón *et al.*, 2017) que al distribuirse por Europa y Asia, los encinos cruzaron el estrecho de Bering de mano de los primeros grupos nómadas para llegar América del norte donde se expandieron el Paleógeno tardío hace aproximadamente 43 Ma (Barrón *et al.*, 2017). De acuerdo con los restos de impresiones de hojas (Howard *et al.*, 1997) y fósiles de granos de polen (McIntyre, 1991), en el terciario medio (37 a 24 Ma) ya existía una importante diversidad de especies del género *Quercus* en América del Norte (Axelrod, 1983). Con el tiempo el género *Quercus* se ha distribuido entre cinco continentes: Europa, Asia, África del norte, América del Norte, América central y del sur (Denk *et al.*, 2017), dispersándose por el hemisferio norte que va desde bosques tropicales y templados hasta regiones semiáridas (Nixon, 2006). Desarrollándose 180 especies a lo largo del continente Euroasiático (Denk *et al.*, 2017) y unas 255 especies en el Nuevo Mundo (Manos *et al.*, 1993; Nixon 2006, Aldrich & Cavender-Bares, 2011).

Los cambios ambientales de temperatura y humedad principalmente, ocasionaron ciclos de expansión y contracción que dieron origen a la divergencia entre especies de encinos, así como también influyeron en sus patrones de distribución a través de la migración de los encinos a nuevas áreas y después a su expansión, dominando las sierras y el Cinturón Volcánico Trans-mexicano (Heald, 1951; McLaughlin, 1994; He & Jiang,

2014; Deng *et al.*, 2020). En los periodos glaciales, las especies arbóreas que presentaban mayor adaptación a bajas temperaturas ampliaron sus áreas de distribución a elevaciones más bajas y retrocedieron a mayores elevaciones durante los interglaciares como fue el caso de las numerosas especies de encinos de la sección *Quercus* (Heald, 1951; McLaughlin, 1994; He & Jiang, 2014; Deng *et al.*, 2020).

Los encinos al desplazarse a lo largo de millones de años por los relieves montañosos han limitado el flujo genético que ha causado divergencia y determinado la estructura genética entre las poblaciones (Liu *et al.*, 2012; Shahzad *et al.*, 2017; Wen *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2020). Las secciones de encinos blancos y rojos en América (Denk *et al.*, 2017), surgieron y se diversificaron de manera simultánea en las áreas norte y este del continente para después radiar a lo largo de México entre 10 y 20 Ma (Hipp *et al.*, 2018). En México la región centro-norte del país experimentó un clima progresivamente más cálido, seco y moderadamente fluctuante desde la transición en el Holoceno tardío, hace unos 11,000 Ma (Van Devender *et al.*, 1987; Bacon & Spellenberg, 1996). Lo anterior derivó en cambios en las zonas montañosas, concretamente en el cinturón volcánico Transmexicano donde se ha descrito que la distribución de encinos estaba relacionada con la amplia variedad de zonas climáticas y edáficas (Rodríguez-Correa *et al.*, 2015; Rodríguez-Gómez *et al.*, 2018). Hace 11,000 Ma la tasa de especiación aumentó un 60% debido a los pronunciados gradientes ambientales en distancias cortas, por las inconstantes cadenas montañosas que se convirtieron en laboratorios naturales (Körner, 2000; Körner *et al.*, 2007; Körner *et al.*, 2011) formando zonas de hibridación e introgresión (Holycross & Douglas, 2007).

Desde su llegada a México los encinos se han diversificado en 154 especies y colonizado múltiples regiones topográficas (Valencia, 2004), donde las especies más

derivadas aún se encuentran estrechamente relacionadas con las especies ancestrales (Wiens & Donoghue, 2004; Escudero & Hipp, 2013). La sección de encinos blancos (*Quercus*) exhibe la mayor dominancia y adaptación a diversos factores abióticos (Valencia, 2004), desarrollándose en una variedad de gradientes altitudinales, temperatura, precipitación, humedad, suelo y la tolerancia al fuego, en comparación con otras secciones como *Lobatae*, siendo los causantes de una mayor diversidad de encinos en el país, lo cual no ocurre en Sudamérica dado que muestran una mayor homogenización en sus condiciones ambientales además de una mayor competencia con los elementos Neotropicales (Nixon, 1993; Chávez, 1998). El postulado anterior en conjunto con evidencias fitogeográficas (Cavender Bares *et al.*, 2011), sugiere que los procesos de divergencia, especiación y migración están correlacionados con las características históricas geológicas y climáticas de cada sitio de estudio (Rodríguez-Correa, 2015).

Diversidad genética de los encinos en América

La diversidad genética es la medida que cuantifica la magnitud de la variabilidad genética dentro de una población (Wright, 1920; Fisher, 1930; Hughes *et al.*, 2008). Está es determinada por su historia evolutiva y de vida las cuales reflejan la cantidad de estructura genética que alberga y cómo se reparte entre las poblaciones, su estudio está basado en el análisis de las frecuencias de alelos y de los genotipos, que expresan el modo en que la variabilidad genética se distribuye entre los individuos (Matesanz *et al.*, 2011). Los encinos en México se han caracterizan por tener una alta variación genética dentro de sus poblaciones, pero baja diferenciación entre estas (Ramírez-Toro *et al.*, 2017). Las condiciones ambientales como es altitud, temperatura, humedad, precipitación y el tipo de

suelo son algunos de los factores responsables de la alta variación y estructura genética en encinos, favoreciendo procesos de adaptación local en las especies que habitan ambientes heterogéneos, o bien como resultado de la deriva genética (Gugger *et al.*, 2016).

Particularmente, en un estudio realizado en *Quercus affinis* y *Quercus laurina*, las cuales se distribuyen a lo largo de un gradiente latitudinal en el sur de Oaxaca, utilizando microsatélites de cloroplasto (cpSSR) y microsatélites nucleares (nSSR), se identificaron dos grupos genéticos distintos. Los cuales correspondieron a cada especie, donde se observó que presentan introgresión una especie a otra ocurría en el área geográfica donde se entrecruzan ambas especies (Ramos-Ortiz *et al.*, 2016).

Aun cuando la hibridación entre especies de encinos ha sido ampliamente documentada, algunas encinos mantienen una estructura genética fuerte, como es el caso de *Quercus deserticola* (2000-2800 msnm), que distribuido en el Cinturón Volcánico Trans-mexicano muestra una estructura genética local fuerte con dos grupos genéticos de acuerdo con los estudios realizados a través de cpDNA y que están relacionados con la estacionalidad de la precipitación y las temperaturas en las que crece *Quercus deserticola* a lo largo del Cinturón Volcánico Trans-mexicano (Rodríguez-Gómez *et al.*, 2018). La estructura genética de los encinos puede variar de acuerdo a las condiciones ambientales y las distancias geográficas en las que se desarrollan (Cavender-Bares *et al.*, 2009). Por ejemplo, un estudio realizado en *Quercus conzattii*, *Quercus radiata*, *Quercus tarahumara* y *Quercus urbanii* en el Cinturón Volcánico Trans-mexicano, utilizando dos grupos de microsatélites de CpSSR y nSSR; se encontró una estructuración de ocho grupos genéticos con flujo de genes entre las poblaciones de *Q. conzattii* y *Q. urbanii*, relacionado con el suelo que es factor determinante en el establecimiento de las especies. (McCauley *et al.*, 2019).

Otro estudio de caso es el realizado en los encinos *Quercus berberidifolia*, *Quercus engelmannii* y *Quercus cornelius-mulleri*, establecidos en el sur de California donde utilizando nueve nSSR se encontró que tenían pequeñas asociaciones con la precipitación y temperatura máxima de verano del sur de California, relacionadas con una variación genética entre las especies, encontrándose diferenciación morfológica y adaptaciones ante hábitats particulares dependiendo de las especies (Riordan *et al.*, 2016).

La diversidad genética es la medida que cuantifica la magnitud de la variabilidad genética dentro de una población (Wright, 1920; Fisher, 1930, Hughes *et al.*, 2008). Desde la llegada de los encinos blancos y rojos al centro de México la tasa de diversificación se incrementó entre el 54% y el 85% en relación con las tasas del norte de México (Hipp *et al.*, 2018). Un ejemplo es el estudio de *Quercus virginiana* y *Quercus oleoides* a lo largo de gradientes altitudinales y latitudinales a través de un estudio de jardín común, donde se encontró una mayor diversidad genética en *Quercus Oleoides* pero una menor diferenciación genética entre las poblaciones en zonas tropicales que entre las zonas templadas condiciones ambientales preferibles para *Quercus virginiana*, características comúnmente relacionada la tolerancia a la congelación y la adaptación climática que puede haber evitado un flujo importante de genes entre las especies, características que se desarrollaron durante las fluctuaciones climáticas en los ciclos glaciares e interglaciares (Cavender-Bares, 2011).

Otro caso es el de *Quercus urbanii* y *Quercus konzattii* distribuidos en la Sierra Madre Occidental y la Sierra Madre del sur donde se analizó la diversidad a través de siete cpSSR evidenciando que *Quercus konzattii* muestra una baja diferenciación, como resultado de una expresión de flujo de genes con otros encinos, en comparación con *Quercus urbanii* el cual mostró una mayor diferenciación, relacionado con la adaptación a

sustratos específicos que reduce la hibridación y el intercambio de genes (McCauley, 2019).

Marcadores moleculares en encinos

Los estudios de diversidad genética en encinos se remontan a la implementación de las herramientas para monitorear la diversidad inicialmente centrada en la morfología (Baranski, 1975), para después correlacionarse con marcadores moleculares (Kremer & Petit, 1993). Con el descubrimiento y desarrollo de los marcadores moleculares, su uso se ha implementado en el estudio de la estructura y variación genética en especies complejas como son los encinos, a continuación se mencionaran algunos estudios en encinos con marcadores moleculares.

La primera generación de los marcadores moleculares fueron las isoenzimas, las cuales se identificaron mediante el proceso de electroforesis, donde una de las ventajas de la técnica es que es relativamente barata, accesible y no destructiva, aunque los resultados son difíciles de interpretar y presentan poco polimorfismo (Pérez-Nasser & Piñero, 1997). Uno de los casos de uso en isoenzimas en encinos es el estudio realizado en poblaciones naturales de *Quercus copeyensis*, *Quercus costaricensis*, *Quercus seemannii* y *Quercus corrugata* de la Cordillera de Talamanca, Costa Rica, donde estudiando la variabilidad de las poblaciones naturales de las especies, se probaron los sistemas enzimáticos PGM, PGI, 6-PGDH, MDH, IDH, G-6PDH, MNR y SKDH y se realizó una caracterización morfológica, donde se encontró que había una diferencia morfológica entre las especies pero al interpretar las bandas reveladas en los resultados considerados como los mejores no se representaron en zimogramas pues no se consideró que fueran lo suficientemente

confiables como para suponer que estos sistemas (IDH, PGI y MNR), estuvieran presentando polimorfismo para las especies de roble estudiadas (Quirós-Camacho, 2001).

Los RAPDs (polimorfismos de ADN amplificados al azar por sus siglas en inglés) son marcadores que amplifican aleatoriamente segmentos de ADN en una gran variedad de especies (Alcántara, 2007). Con una amplia gama de aplicaciones en el mapeo de genes, genética de poblaciones y genética evolutiva molecular, aunque estos marcadores muestran problemas como la presencia de bandas erróneas y la reproducibilidad de los resultados además de que son laboriosos y lentos (Bardakci, 2001).

En encinos se han empleado los RAPD en el complejo *Quercus affinis* y *Quercus laurina*, encontrando un patrón genético nuclear divergente de las poblaciones circundantes asociada generalmente a un cambio latitudinal, altitudinal y climático en las poblaciones analizadas, mostrando una variación genética entre ambas especies, encontrando individuos morfológicamente intermedios en las zonas de contacto secundario entre el Cinturón Volcánico Trans-mexicano y la Sierra Madre Oriental (González-Rodríguez *et al.*, 2004).

Los microsatélites (SSR), son marcadores que consisten en arreglos repetidos de nucleótidos por secuencias cortas que presentan una herencia mendeliana codominante, son muy abundantes y fáciles de replicar en los genomas nucleares y de cloroplasto de las plantas, Aunque se requiere de conocimiento previos sobre el genoma de las especies y pueden llegar a ser costosos, además de mostrar altas tasas de mutación (McCauley, 1995; Provan *et al.*, 2001; González, 2003). En los encinos han sido utilizados para diagnosticar la hibridación e introgresión y filogeografía debido a su herencia codominante, su alta sensibilidad para detectar variaciones y su rápida tasa de mutación (Senan *et al.*, 2014; Harrison & Larson 2014; Castillo Mendoza, 2019). Por ejemplo, utilizando SSR en un

muestreo en el centro de Europa se detectó que *Quercus robur* y *Quercus petraea* presentan una diferenciación entre especies estrechamente relacionadas con las frecuencias alélicas, así como alelos específicos los cuales les permiten adaptarse a diversas comunidades vegetales, con características múltiples mostrando una variación en su diversidad genética (Scotti-Saintagne *et al.*, 2004).

Los microsatélites de cloroplasto (cpSSR), por su modo de herencia generalmente uniparental los convierte en una herramienta poderosa para dilucidar la estructura, diversidad e introgresión genética en las plantas (Provan *et al.*, 2001; De Guilloux, 2004). Por ejemplo, en encinos se han estudiado los patrones de diversidad genética y diferenciación genética, entre los estudios de esta naturaleza se destaca la caracterización de 36 poblaciones de *Quercus castanea* con cpSSR en la Sierra Madre Occidental, la Meseta Central, el Cinturón Volcánico Trans-mexicano y la Sierra Madre del Sur, donde se identificaron qué factores geográficos y ambientales como altitud, latitud, temperatura y humedad, determinaron la expansión demográfica en el Cinturón Volcánico Trans-mexicano y la Sierra Madre del Sur encontrándose una diversidad genética alta (0.72) entre las poblaciones de *Quercus castanea* (Peñaloza-Ramírez *et al.*, 2020).

Otros de los marcadores moleculares son los genes candidatos, los cuales son genes polimórficos involucrados en la variación de rasgos según su función biológica y ligados a loci principales, donde su principal desventaja es el la identificación de genes con posibles diferencias en las subestructuras de la especie pueden dar como resultado la detección de alelos que difieren entre el caso y el control (Pflieger *et al.*, 2001), Aunque los genes candidatos ya han aportado información en los encinos. Por ejemplo, en poblaciones de *Quercus berberidifolia*, *Quercus cornelius-mulleri* y *Quercus Engelmann* distribuidas a lo largo de la frontera entre México y Estados Unidos, se analizaron 139 genes candidatos de

los cuales nueve fueron compartidos por las tres especies, ligados a la tolerancia a la sequía (Oney-Bird, 2018).

La secuenciación del ADN es una técnica de laboratorio utilizada para determinar la secuencia exacta de las bases en una molécula de ADN. Donde su principal ventaja es que no muestran sesgos en la secuenciación y la detección de variantes estructurales, aunque es complejo el uso de los datos y su interpretación. Variables estructurales como las encontradas en un estudio realizado a lo largo de las zonas montañosas de Mexico (Cinturón Volcanico Trans-Mexicano y el Noreste de Oaxaca) analizando el complejo *Quercus affinis* y *Quercus. Laurina* encontraron que el complejo comparte dos haplotipos ancestrales H1 y H4 los cuales han dado hincapié a una extensa dinámica además de que el complejo muestra una estructura genética alta (GST:0.381) entre las poblaciones (González-Rodríguez *et al.*, 2004).

Los SNPs, son marcadores que combinan la secuenciación de enzimas y el uso de identificadores moleculares utilizados para el análisis de la diversidad genética en las poblaciones determinando datos genómicos poblacionales de alta resolución (Davey & Blaxter, 2010). Una de sus ventajas es que tienen una baja tasa de mutación, son muy abundantes y simplifican los estudios comparativos cruzados, pero son costosos de aislar y caracterizar (Slate *et al.*, 2009). Un caso particular es el realizado en el estudio de la diversificación de los encinos en México en el cual se realizó un estudio utilizando 300 muestras de 146 especies usando RAD-seq que al correlacionarse con factores edafoclimáticos y fenológicos encontraron que los encinos, se diversificaron en gran número de especies asociadas con altas tasas de evolución a lo largo de gradientes de humedad y entre los hábitos foliares perennes y caducifolios (Hipp *et al.*, 2018)

Hibridación e introgresión en los encinos

La hibridación es la reproducción entre miembros de poblaciones genéticamente distintas que producen descendencia de ascendencia mixta (Barton & Hewitt, 1989) y puede acelerar la especiación a través de la introgresión adaptativa (Abbott, 2013). Existen tres teorías de cómo influye la hibridación en las especies vegetales tanto en su variabilidad genética como en su variabilidad morfológica; el primer caso sucede cuando dos especies colonizan un nuevo entorno, se fusionan en un enjambre híbrido e irradian, generando ascendencia mixta; el segundo caso sucede cuando la misma especie genera una colonización secuencial en un nuevo ambiente, generando una fusión en un enjambre híbrido con otra especie seguida de radiación, generando una genealogía parafilética; y por último dos poblaciones fundadoras que surgen de un evento de colonización único, comienzan a divergir en el aislamiento espacial para posteriormente volverse simpátricas, fusionarse en un enjambre híbrido, seguido de radiación, generando descendencia monofiléticas (Seehausen, 2004).

La hibridación es reconocida como generador de biodiversidad (Lamichhaney *et al.*, 2018; Rieseberg, 2019; Li *et al.*, 2020), ya que favorece la adaptación, evolución y supervivencia de las especies en condiciones ambientales cambiantes como es la altitud en las montañas (Reed & Frankham, 2003; Potter *et al.*, 2017), condición que en el caso específico de los encinos beneficia el flujo interespecífico de alelos favorables para la promoción de variaciones adaptativas (Sork, 2016). La hibridación e introgresión son factores que podrían aumentar la longevidad de las especies y su potencial de dispersión, en el caso de los encinos se sabe que experimentan un flujo genético interespecífico con mayor frecuencia que en otros grupos de plantas (Petit *et al.*, 2004).

En *Quercus robur* y *Quercus petraea* utilizando 12 microsatélites nucleares en Francia, se encontró que los cambios ambientales relacionados con altas temperaturas y

poca humedad, podrían aumentar las tasas de hibridación a través de dos mecanismos distintos; el primero al alterar la organización espacial de las comunidades, disminuiría la cantidad de polen coespecífico aumentando así las tasas de hibridación y en segundo lugar, al disminuir la densidad de especies se reduciría el polen, por lo tanto, aumentarían las tasas de hibridación como consecuencia de la polinización al azar (Lagache *et al.*, 2013).

Concretamente, en *Quercus engelmannii*, el cual se distribuye en el sureste de California una región caracterizada por tener condiciones ambientales secas, en un estudio realizado con nueve microsátélites, se encontraron híbridos generados por las especies capaces de persistir en climas con variación de temperatura y lluvia, que no son idénticos a los ocupados por cualquiera de las especies parentales (Ortego, 2014). Lo anterior, sugiere que la simpatría crea oportunidades para la hibridación, pero la selección basada en el clima determina hasta qué punto los híbridos persisten en una localidad específica (Swenson *et al.*, 2008; Ortego, 2014).

Caso similar el encontrado al estudiar poblaciones de *Quercus rubra* y *Quercus ellipsoidalis* distribuidas al norte de Michigan, las cuales se desarrollan en ambientes con suelos arenosos secos, al analizarlas con 16 nSSR y EST-SSRs se identificaron principalmente genes adaptativos, relacionados con la fenología foliar y tolerancia a la sequía los cuales contribuyen a la diferenciación entre ambas especies y se han transmitido a través de los procesos de hibridación e introgresión entre ambas especies (Lind-Galling, 2013), por lo cual múltiples factores complejos, incluidas las condiciones edáficas y climáticas, impulsan la diversificación entre especies (Cavender-Bares, 2019). Suceso opuesto en *Quercus magnoliifolia* y *Quercus resinosa*, los cuales se analizaron a lo largo de un gradiente altitudinal en Jalisco, donde las condiciones de humedad y temperatura son cambiantes, se encontró a través de ocho nSSR que hay poblaciones de ambas especies que

coexisten en completa simpatría con individuos híbridos puros y que aparentemente comparten las mismas condiciones ambientales de humedad y temperatura (Albarrán-Lara *et al.*, 2010).

Los encinos y los factores abióticos en los que se desarrollan

Las especies de encinos en México presentan una correlación en su distribución y adaptación geográfica relacionada con factores abióticos como altitud, humedad, tipo de suelo y un mayor efecto relacionado con la interacción entre ellas facilitando su coexistencia a distintas escalas geográficas (Aguilar-Romero, 2016). *Quercus magnoliifolia*, *Quercus resinosa*, *Quercus magnoliifolia x resinosa*, *Quercus obtusata* y *Quercus rugosa* son especies con amplia distribución geográfica (Valencia, 2004). *Quercus magnoliifolia* se localiza en 15 estados del país, forma parte de bosques de encino, de pino-encino, y en bosques tropicales deciduos (Ramírez *et al.*, 2003), observándose con mayor frecuencia en sitios cálidos y secos (Rzedowski, 1978; Fernández-Nava *et al.*, 1998). *Quercus rugosa* está presente en sitios con alta precipitación y temperaturas más bajas (Aguilar-Romero, 2016), es una de las especies dominantes en muchas regiones montañosas y exhibe una amplia variación en la forma y tamaño de las hojas, debido a la amplitud de su distribución y a los diversos ambientes en los que vive (Uribe-Salas, 2008).

Quercus resinosa, se distribuye en zonas limitantes de agua y suelo por lo cual es muy resistente a adversidades ambientales, se encuentra principalmente en barrancas, bosques de encino, bosque de pino-encino y bosque tropical caducifolio. Su distribución geográfica en México se encuentra en los estados de Aguascalientes, Durango, Guanajuato, Nayarit, San Luis Potosí y Zacatecas (Arizaga *et al.*, 2009; Dávila, 2013). *Quercus obtusata* es una de las especies de encino con más amplia distribución en nuestro país (Valencia,

2004), registrándose desde Nuevo León, Durango y Tamaulipas hasta Guerrero y Oaxaca. Prospera en bosques de pino-encino, bosque mesófilo de montaña y pastizal con matorral xerófilo (Rzedowski, 1978; De la Paz Pérez–Olvera *et al.*, 2006; Rubio-Licona *et al.*, 2011). La riqueza y abundancia de los encinos a través de gradientes ambientales como la elevación y la latitud se atribuyen a la temperatura y humedad que pueden desempeñar un papel importante en la estructuración de la biodiversidad (Scheffers *et al.*, 2013). Como es el caso de nuestro sitio de estudio que forma parte del Cinturón Volcánico Trans-mexicano, localizado en la porción centro occidente del estado de Jalisco, conocido como el volcán de Tequila que presenta una elevación de 2920 msnm con una variación climática heterogénea lo que permite un establecimiento de una alta diversidad de vegetación, considerándolo un refugio de flora y fauna silvestre, haciéndolo un sitio muy importante para la conservación. (Rodríguez-Alcántar, 2018).

En este estudio se analizaron los patrones de diferenciación genética neutral y de introgresión utilizando microsatélites neutrales y EST-SSRs que están relacionados con el estrés hídrico en cuatro especies de encinos blancos. Específicamente, nos hicimos las siguientes preguntas: 1) ¿existirá mayor diferenciación genética entre los EST-SSRs que en los nSSR? y 2) ¿los EST-SSRs estarán correlacionados con los gradientes altitudinales?

Objetivos

General:

Evaluar la diferenciación genética neutral y potencialmente adaptativa entre cuatro especies de encinos blancos y su asociación con condiciones ambientales a lo largo del gradiente altitudinal del volcán de Tequila.

Particulares

- 1) Evaluar los patrones de diferenciación genética neutral y los patrones de introgresión mediante loci de microsatélites neutrales.
- 2) Analizar los patrones de diferenciación genética relacionados con la respuesta al estrés hídrico en los encinos utilizando microsatélites EST-SSRs, y su correlación con los gradientes altitudinales a lo largo del volcán de tequila en los encinos blancos.

Hipótesis

1. Los encinos blancos muestran una mayor diferenciación genética en los EST-SSR que en los nSSR dado que se presenta una variación en la cantidad de las especies de encinos blancos a lo largo de los gradientes altitudinales del volcán de tequila
2. La variación genética en algunos EST-SSRs está asociada a las condiciones ambientales que se encuentran lo largo del gradiente altitudinal del volcán de tequila, mientras que los nSSR no muestran una asociación.

Referencias

- Abbott, R., Albach, D., Ansell, S., Arntzen, J. W., Baird, S. J., Bierne, N., ... & Zinner, D. (2013). Hybridization and speciation. *Journal of evolutionary biology*, 26(2), 229-246.
- Aguilar-Romero, R., García-Oliva, F., Pineda-García, F., Torres, I., Peña-Vega, E., Ghilardi, A., Oyama, K. (2016). Patterns of distribution of nine *Quercus* species along an environmental gradient in a fragmented landscape in central Mexico. *Botanical Sciences*, 94(3), 471-482.
- Albarrán-Lara, A. L., Mendoza-Cuenca, L., Valencia-Avalos, S., Gonzalez-Rodriguez, A., & Oyama, K. (2010). Leaf fluctuating asymmetry increases with hybridization and introgression between *Quercus magnoliifolia* and *Quercus resinosa* (Fagaceae) through an altitudinal gradient in Mexico. *International Journal of Plant Sciences*, 171(3), 310-322.
- Alcaide, F., Solla, A., Mattioni, C., Castellana, S., & Martín, M. Á. (2019). Adaptive diversity and drought tolerance in *Castanea sativa* assessed through EST-SSRS genic markers. *Forestry: An International Journal of Forest Research*, 92(3), 287-296.
- Aldrich, P. R., & Cavender-Bares, J. (2011). *Quercus*. In Wild crop relatives: genomic and breeding resources (pp. 89-129). Springer, Berlin, Heidelberg.

Anderson-Teixeira, K. J., Miller, A. D., Mohan, J. E., Hudiburg, T. W., Duval, B. D., & DeLucia, E. H. (2013). Altered dynamics of forest recovery under a changing climate. *Global change biology*, 19(7), 2001-2021.

Ávila-Sánchez, P., Sánchez-González, A., Catalán-Heverástico, C., Almazán-Núñez, R. C., & Jiménez-Hernández, J. (2018). Patrones de riqueza y diversidad de especies vegetales en un gradiente altitudinal en Guerrero, México. *Polibotánica*, (45), 101-113

Axelrod, D. I. (1983). Biogeography of oaks in the Arcto-Tertiary province. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 629-657.

Bacon, j. r., & Spellenberg, r. (1996). hybridization in two distantly related mexican black oaks" *quercus conzatti*" and" *quercus eduardii*"(fagaceae:" *quercus*": section" *lobatae*"). *SIDA, Contributions to Botany*, 17-41.

Baranski, M. J. (1975). analysis of variation within white oak, *Quercus alba* L.

Bardakci, F. (2001). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Turkish Journal of Biology*, 25(2), 185-196.

Barrón, E., Averyanova, A., Kvaček, Z., Momohara, A., Pigg, K. B., Popova, S., ... & Zhou, Z. K. (2017). The fossil history of *Quercus*. In *Oaks Physiological Ecology. Exploring the Functional Diversity of Genus Quercus L.* (pp. 39-105). *Springer*, Cham.

Barton, N. H., & Hewitt, G. M. (1989). Adaptation, speciation and hybrid zones. *Nature*, 341(6242), 497-503.

Castillo-Mendoza, E., Salinas-Sánchez, D., Valencia-Cuevas, L., Zamilpa, A., & Tovar-Sánchez, E. (2019). Natural hybridisation among *Quercus glabrescens*, *Q. rugosa* and *Q. Obtusata* (Fagaceae): Microsatellites and secondary metabolites markers. *Plant Biology*, 21(1), 110-121.

Cavender-Bares, J. (2016). Diversity, distribution and ecosystem services of the North American oaks. *International oaks*, 27, 37-48.

Cavender-Bares, J. (2019). Diversification, adaptation, and community assembly of the American oaks (*Quercus*), a model clade for integrating ecology and evolution. *New Phytologist*, 221(2), 669-692.

Cavender-Bares, J., & Pahlich, A. (2009). Molecular, morphological, and ecological niche differentiation of sympatric sister oak species, *Quercus virginiana* and *Q. geminata* (Fagaceae). *American Journal of Botany*, 96(9), 1690-1702.

- Cavender-Bares, J., Gonzalez-Rodriguez, A., Pahlich, A., Koehler, K., & Deacon, N. (2011). Phylogeography and climatic niche evolution in live oaks (*Quercus series Virentes*) from the tropics to the temperate zone. *Journal of Biogeography*, 38(5), 962-981.
- Cevallos-Ferriz, S. R., González-Torres, E. A., & Calvillo-Canadell, L. (2012). Perspectiva paleobotánica y geológica de la biodiversidad en México. *Acta botánica mexicana*, (100), 317-350.
- Chávez, F. Z. (1998). Observaciones sobre la distribución de encinos en México. *Polibotánica*, (8), 47-64.
- Cuyckens, G. A. E., Malizia, L. R., & Blundo, C. (2015). Composición, diversidad y estructura de comunidades de árboles en un gradiente altitudinal de selvas subtropicales de montaña (Serranías de Zapla, Jujuy, Argentina). *Madera y bosques*, 21(3), 137-148.
- Davey, J. W., & Blaxter, M. L. (2010). RADSeq: next-generation population genetics. *Briefings in functional genomics*, 9(5-6), 416-423.
- Dávila Lara, M. A. (2013). Establecimiento de un área semillera y pruebas de calidad con *Quercus resinosa* Liebm, procedente de Sierra de Alvarez.
- De Beaulieu, A. L. H., & Lamant, T. (2010). *Guide illustré des chênes*. Edilens.

- De guilloux, M. F., Pemonge, M. H., & Petit, R. J. (2004). Use of chloroplast microsatellites to differentiate oak populations. *Annals of Forest Science*, 61(8), 825-830.
- Deng, J. Y., Fu, R. H., Compton, S. G., Liu, M., Wang, Q., Yuan, C., & Chen, Y. (2020). Sky islands as foci for divergence of fig trees and their pollinators in southwest China. *Molecular Ecology*, 29(4), 762-782.
- Denk, T., Grimm, G. W., Manos, P. S., Deng, M., & Hipp, A. L. (2017). An updated infrageneric classification of the oaks: review of previous taxonomic schemes and synthesis of evolutionary patterns. *Oaks physiological ecology. Exploring the functional diversity of genus Quercus L.*, 13-38.
- Domínguez, J. A. E., Lupercio, A. Z., Reyna, J. V., & Quintanilla, J. A. V. (2007). Caracterización ecológica y diversidad de los bosques de encino de la sierra de Zapalinamé, Coahuila, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (81), 51-63.
- Escudero, M., & Hipp, A. (2013). Shifts in diversification rates and clade ages explain species richness in higher-level sedge taxa (*Cyperaceae*). *American Journal of Botany*, 100(12), 2403-2411.
- González, E. G. (2003). Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia*, 59(2-3), 377-388

González-Rodríguez, A., Arias, D. M., Valencia, S., & Oyama, K. (2004). Morphological and RAPD analysis of hybridization between *Quercus affinis* and *Q. laurina* (Fagaceae), two Mexican red oaks. *American Journal of Botany*, 91(3), 401-409.

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(11), 3467-3476.

Gugger, P. F., Fitz-Gibbon, S., Pellegrini, M., & Sork, V. L. (2016). Species-wide patterns of DNA methylation variation in *Quercus lobata* and their association with climate gradients. *Molecular Ecology*, 25(8), 1665-1680.

Harrison, R. G., & Larson, E. L. (2014). Hybridization, introgression, and the nature of species boundaries. *Journal of Heredity*, 105(S1), 795-809.

Hipp, A. L., Manos, P. S., González-Rodríguez, A., Hahn, M., Kaproth, M., McVay, J. D., & Cavender-Bares, J. (2018). Sympatric parallel diversification of major oak clades in the Americas and the origins of Mexican species diversity. *New Phytologist*, 217(1), 439-452.

Holderegger, R., Kamm, U., & Gugerli, F. (2006). Adaptive vs. neutral genetic diversity: implications for landscape genetics. *Landscape Ecology*, 21(6), 797-807.

Holycross, A. T., & Douglas, M. E. (2007). Geographic isolation, genetic divergence, and ecological non-exchangeability define ESUs in a threatened sky-island rattlesnake.

Biological conservation, 134(1), 142-154.

Howard, D. J., Preszler, R. W., Williams, J., Fenchel, S., & Boecklen, W. J. (1997). How discrete are oak species? Insights from a hybrid zone between *Quercus grisea* and *Quercus gambelii*. *Evolution*, 51(3), 747-755.

Hughes, A. R., Inouye, B. D., Johnson, M. T., Underwood, N., & Vellend, M. (2008).

Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology letters*, 11(6), 609-623.

Kappelle, M., Van Uffelen, J. G., & Cleef, A. M. (1995). Altitudinal zonation of montane *Quercus* forests along two transects in Chirripó National Park, Costa Rica. *Vegetation*, 119(2), 119-153.

Kessler, M., Grytnes, J. A., Halloy, S. R., Kluge, J., Krömer, T., León, B., ... & Young, K. R. (2012). Gradientes de diversidad vegetal: Patrones y procesos locales. *Cambio climático y biodiversidad en los Andes tropicales*, 235.

Körner, C., & Paulsen, J. (2004). A world-wide study of high altitude treeline temperatures. *Journal of biogeography*, 31(5), 713-732.

Körner, C., Paulsen, J., & Spehn, E. M. (2011). A definition of mountains and their bioclimatic belts for global comparisons of biodiversity data. *Alpine Botany*, 121(2), 73.

Korshikov, I. I., & Mudrik, E. A. (2006). Elevation-dependent genetic variation of plants and seed embryos in the Crimea Mountain population of *Pinus pallasiana* D. Don. *Russian Journal of Ecology*, 37(2), 79-83.

Kremer, A., & Hipp, A. L. (2020). Oaks: an evolutionary success story. *New Phytologist*, 226(4), 987-1011.

Kremer, A., & Petit, R. J. (1993). Gene diversity in natural populations of oak species. In *Annales des sciences forestières* (Vol. 50, No. Supplement, pp. 186s-202s). *EDP Sciences*.

Lagache, L., Klein, E. K., Guichoux, E., & Petit, R. J. (2013). Fine-scale environmental control of hybridization in oaks. *Molecular Ecology*, 22(2), 423-436.

Li, C., Zhang, X., Liu, X., Luukkanen, O., & Berninger, F. (2006). Leaf morphological and physiological responses of *Quercus aquifolioides* along an altitudinal gradient. *Silva Fennica*, 40(1), 5.

Li, J., Milne, R. I., Ru, D., Miao, J., Tao, W., Zhang, L., & Mao, K. (2020). Allopatric divergence and hybridization within *Cupressus chengiana* (Cupressaceae), a threatened conifer in the northern Hengduan Mountains of western China. *Molecular Ecology*, 29(7), 1250-1266

Luna-Vega, I., Alcántara-Ayala, O., Ruíz-Jiménez, C. A., & Contreras-Medina, R. (2006). Composition and structure of humid montane oak forests at different sites in central and eastern Mexico. In *Ecology and conservation of neotropical montane oak forests* (pp. 101-112). Springer, Berlin, Heidelberg.

Matesanz, S., Gimeno, T. E., de la Cruz, M., Escudero, A., & Valladares, F. (2011). *Competition may explain the fine-scale spatial patterns and genetic structure of two co-occurring plant congeners. Journal of Ecology*, 99(3), 838-848.

McCauley, R. A., Cortés-Palomec, A. C., & Oyama, K. (2019). Species diversification in a lineage of Mexican red oak (*Quercus* section *Lobatae* subsection *Racemiflorae*)—the interplay between distance, habitat, and hybridization. *Tree Genetics & Genomes*, 15(2), 1-23.

McIntyre, D. J., Christie, R. L., & McMillan, N. J. (1991). Pollen and spore flora of an Eocene forest, eastern Axel Heiberg Island, NWT. *Geological Survey of Canada, Bulletin*, 403, 83-97.

Mittermeier, R. A., Turner, W. R., Larsen, F. W., Brooks, T. M., & Gascon, C. (2011). *Global biodiversity conservation: the critical role of hotspots. In Biodiversity hotspots* (pp. 3-22). Springer, Berlin, Heidelberg.

Morrone, J. J. (2019). Regionalización biogeográfica y evolución biótica de México: encrucijada de la biodiversidad del Nuevo Mundo. *Revista mexicana de biodiversidad*, 90.

Nixon, K. C. (2006). Global and neotropical distribution and diversity of oak (genus *Quercus*) and oak forests. In *Ecology and conservation of neotropical montane oak forests* (pp. 3-13). Springer, Berlin, Heidelberg.

Nixon, K.C., y C.H. Muller, 1993. The *Quercus hypoxantha* complex (Fagaceae) in Northeastern Mexico. *The New York Botanical Garden. Brittonia* 45(2):146-153.

Ohsawa, T., Tsuda, Y., Saito, Y., Sawada, H., & Ide, Y. (2007). Altitudinal genetic diversity and differentiation of *Quercus crispula* in the Chichibu Mountains, central Japan. *International Journal of Plant Sciences*, 168(3), 333-340.

Oney-Birol, S., Fitz-Gibbon, S., Chen, J. M., Gugger, P. F., & Sork, V. L. (2018). Assessment of shared alleles in drought-associated candidate genes among southern California white oak species (*Quercus* sect. *Quercus*). *BMC genetics*, 19(1), 1-12.

Ortego, J., Gugger, P. F., Riordan, E. C., & Sork, V. L. (2014). Influence of climatic niche suitability and geographical overlap on hybridization patterns among southern Californian oaks. *Journal of Biogeography*, 41(10), 1895-1908.

Peñaloza-Ramírez, J. M., Rodríguez-Correa, H., González-Rodríguez, A., Rocha-Ramírez, V., & Oyama, K. (2020). High genetic diversity and stable Pleistocene distributional ranges in the widespread Mexican red oak *Quercus castanea* Née (1801) (Fagaceae). *Ecology and Evolution*, 10(10), 4204-4219

- Pérez-Nasser, N., & Piñero, D. (1997). Isoenzimas. *Botanical Sciences*, (60), 77-84.
- Petit, R. J., Bodénès, C., Ducousso, A., Roussel, G., & Kremer, A. (2004). Hybridization as a mechanism of invasion in oaks. *New Phytologist*, 161(1), 151-164.
- Petit, R. J., Brewer, S., Bordács, S., Burg, K., Cheddadi, R., Coart, E., ... & Kremer, A. (2002). Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest ecology and management*, 156(1-3), 49-74.
- Pflieger, S., Lefebvre, V., & Causse, M. (2001). The candidate gene approach in plant genetics: a review. *Molecular breeding*, 7(4), 275-291.
- Potter, K. M., Jetton, R. M., Bower, A., Jacobs, D. F., Man, G., Hipkins, V. D., & Westwood, M. (2017). Banking on the future: progress, challenges and opportunities for the genetic conservation of forest trees.
- Poulos, H. M., Goodale, U. M., & Berlyn, G. P. (2007). Drought response of two Mexican oak species, *Q. laceyi* and *Q. sideroxyla* (Fagaceae), in relation to elevational position. *American Journal of Botany*, 94(5), 809-818

Price, M., Gratzner, G., Alemayehu Duguma, L., Kohler, T., & Maselli, D. (2011). Mountain Forests in a Changing World= Realizing Values, Addressing Challenges. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) and Centre of Development and Environment (CDE).

Quirós-Camacho, X. (2001). Variación natural en cuatro especies de roble, *Quercus* spp. en la Cordillera de Talamanca, Costa Rica.

Rahbek, C. (2005). The role of spatial scale and the perception of large-scale species-richness patterns. *Ecology Letters*, 8(2), 224-239.

Ramírez, V. M. P., & Bonfíl, C. (2003). Efecto del fuego en la estructura poblacional y la regeneración de dos especies de encinos (*Quercus liebmanii* Oerst. y *Quercus magnoliifolia* Née) en la región de La Montaña (Guerrero), México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (72), 5-20.

Ramírez-Toro, W., Torres-Miranda, A., González-Rodríguez, A., Ruiz-Sanchez, E., Luna-Vega, I., & Oyama, K. (2017). A multicriteria analysis for prioritizing areas for conservation of oaks (*Fagaceae: Quercus*) in Oaxaca, Southern Mexico. *Tropical Conservation Science*, 10, 1940082917714227.

Ramos-Ortiz, S., Oyama, K., Rodríguez-Correa, H., & González-Rodríguez, A. (2016). Geographic structure of genetic and phenotypic variation in the hybrid zone between *Quercus affinis* and *Q. laurina* in Mexico. *Plant Species Biology*, 31(3), 219-232.

Riordan, E. C., Gugger, P. F., Ortego, J., Smith, C., Gaddis, K., Thompson, P., & Sork, V. L. (2016). Association of genetic and phenotypic variability with geography and climate in three southern California oaks. *American Journal of Botany*, 103(1), 73-85.

Rodríguez-Alcántar, O., Figueroa-García, D., & Herrera-Fonseca, M. J. (2018). Catálogo de los hongos del Volcán de Tequila, municipio de Tequila, Jalisco, México. *Polibotánica*, (45), 15-35.

Rodríguez-Correa, H., Oyama, K., MacGregor-Fors, I., & González-Rodríguez, A. (2015). How are oaks distributed in the Neotropics? A perspective from species turnover, areas of endemism, and climatic niches. *International Journal of Plant Sciences*, 176(3), 222-231.

Rodríguez-Gómez, F., Oyama, K., Ochoa-Orozco, M., Mendoza-Cuenca, L., Gaytán-Legaria, R., & González-Rodríguez, A. (2018). Phylogeography and climate-associated morphological variation in the endemic white oak *Quercus deserticola* (Fagaceae) along the Trans-Mexican Volcanic Belt. *Botany*, 96(2), 121-133.

Rubio-Licon, L. E., Romero-Rangel, S., & Rojas-Zenteno, E. C. (2011). Estructura y composición florística de dos comunidades con presencia de *Quercus* (Fagaceae) en el Estado de México. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, 17(1), 77-90.

Rzedowski J. 1991. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta Botanica Mexicana* 14:3-21.

Scheffers, B. R., Phillips, B. L., Laurance, W. F., Sodhi, N. S., Diesmos, A., & Williams, S. E. (2013). Increasing arboreality with altitude: a novel biogeographic dimension.

Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 280(1770), 20131581.

Scotti-Saintagne, C., Mariette, S., Porth, I., Goicoechea, P. G., Barreneche, T., Bodénes, C., & Kremer, A. (2004). Genome scanning for interspecific differentiation between two closely related oak species [*Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl.]. *Genetics*, 168(3), 1615-1626.

Seehausen, O. (2004). Hybridization and adaptive radiation. *Trends in ecology & evolution*, 19(4), 198-207.

Shen, D., Bo, W., Xu, F., & Wu, R. (2014). Genetic diversity and population structure of the Tibetan poplar (*Populus szechuanica* var. *tibetica*) along an altitude gradient. *BMC Genetics* (Vol. 15, No. S1, p. S11). BioMed Central.

Slate, J., Gratten, J., Beraldi, D., Stapley, J., Hale, M., & Pemberton, J. M. (2009). Gene mapping in the wild with SNPs: guidelines and future directions. *Genetica*, 136(1), 97-107.

Sork, V. L. (2016). Gene flow and natural selection shape spatial patterns of genes in tree populations: implications for evolutionary processes and applications. *Evolutionary Applications*, 9(1), 291-310.

Uribe-Salas, D., España-Boquera, M. L., & Torres-Miranda, A. (2019). Aspectos biogeográficos y ecológicos del género *Quercus* (Fagaceae) en Michoacán, México. *Acta botánica mexicana*, (126).

Uribe-Salas, D., Saenz-Romero, C., González-Rodríguez, A., Tellez-Valdez, 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(12), 2121-2126.

Valencia-A, S. (2004). Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. *Botanical Sciences*, (75), 33-53.

Valencia-Cuevas, L., Piñero, D., Mussali-Galante, P., Valencia-Ávalos, S., & Tovar-Sánchez, E. (2014). Effect of a red oak species gradient on genetic structure and diversity of *Quercus castanea* (Fagaceae) in Mexico. *Tree Genetics & Genomes*, 10(3), 641-652

Altitudinal patterns of genetic differentiation among white oak species along an altitudinal gradient in México

Sandra Luz Estrada-Téllez¹, Yurixhi Maldonado-López², Antonio González-Rodríguez³

¹Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, San Juanito Itzicuaró s/n Col. Nva. Esperanza, 58337, Morelia, Michoacán, México.

²CONACyT-Instituto de Investigaciones sobre los Recursos Naturales, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Juanito Itzicuaró n/n, Col. Nueva Esperanza, 58330 Morelia, Michoacán, México.

³Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Antigua Carretera a átzcuaro 8701, Morelia, Michoacán 58190, México

*Corresponding author: agrodrig@cieco.unam.mx

Abstract

Analyzing the processes that promote genetic differentiation between oak populations is fundamental for understanding how species identity is maintained despite potentially high levels of interspecific gene flow. It has been hypothesized that genomic regions involved in functional differences among species experience a much lower introgression rate and therefore maintain a higher interspecific differentiation than neutral regions. To test this hypothesis, we evaluated neutral and potentially adaptive genetic differentiation between white oak species, and their association with environmental conditions along the altitudinal gradient of the Tequila volcano in Western Mexico. We amplified 9 neutral simple sequence repeats (SSRs) and 10 expressed sequence tags (EST-SSRs) for 98 samples of four white oak species distributed along the gradient. Most microsatellites were slightly differentiated between species, and two EST-SSRs under selection linked to genes related to hydric stress showed significantly lower genetic differentiation than the rest, probably because of adaptive introgression among the four oak species. Our results suggest that different adaptive processes occur within species that contribute to strengthening boundaries between them.

Keywords: *Quercus magnoliifolia*, *Quercus resinosa*, *Quercus obtusata*, *Quercus rugosa*, outlier loci, hydric stress, EST-SSRs

Introduction

The genus *Quercus* (oaks) has recently become a model group for ecological and evolutionary studies (Petit *et al.*, 2013; Cavender-Bares, 2019). This group of trees and shrubs with Holarctic distribution is notable for its high species diversity and enormous ecological and economic importance (Luna-Vega *et al.*, 2006). Additionally, one of the most distinctive biological characteristics of oaks is the high frequency of hybridization and introgression even between species that are not closely related and clearly morphologically and ecologically differentiated (Valencia-A, 2004). For this reason, oaks are considered as one of the “horror stories” of botany (Rieseberg *et al.*, 2006). Some authors have even discussed some species concepts (i.e. the “ecological” species concept) considering the case of oaks as a reference (Van Valen, 1976). With the advent of molecular markers, it has been possible to confirm that the degree of genetic differentiation among oak species is in general low. Particularly, chloroplast DNA variation is usually extensively shared among sympatric oak species belonging to the same taxonomic section (Dumolin-Lapegue *et al.*, 1999; Ramos-Ortiz *et al.*, 2016). On the other hand, in the case of the nuclear genome, low but significant differentiation levels have been found using microsatellites and other neutral markers (González-Rodríguez *et al.*, 2004; Ramos-Ortiz *et al.*, 2016).

One of the relevant questions that arise from the above-described scenario is: which are the mechanisms that allow the maintenance of species identity in oaks despite high levels of introgressive gene flow? (Petit *et al.*, 2013; Cannon & Petit 2020). One hypothesis is that, in hybridizing oaks, a limited number of loci are under the action of divergent natural selection while, in contrast, most of the genome is permeable to interspecific gene flow (Lexer *et al.*, 2006). In other words, those genes that constitute the basis of functional differences among species, related to adaptation to different ecological niches, experience a much lower introgression rate and therefore maintain a higher interspecific differentiation than neutral markers such as microsatellites and other noncoding regions

(Scotti-Saintagne *et al.*, 2004). However, tests to this model have been limited. For example, in European oaks *Quercus petraea* and *Q. robur* it has been shown that genes related to their contrasting response to soil flooding contribute significantly to differentiation between both species (Le Provost *et al.*, 2011). In other studies, it has been shown that besides niche divergence, asynchrony in floral phenology contributes to explain the maintenance of differences between closely related oak species such as *Q. geminata* and *Q. virginiana* (Cavender-Bares & Pahlich, 2009). However, these studies have not been extended beyond considering pairs of species. Some analyses of genetic differentiation have been performed considering three or four species (Peñaloza-Ramírez *et al.*, 2010), but no studies have simultaneously quantified functional and genetic differentiation among several species coexisting throughout a well-defined environmental gradient so far. This would allow to evaluate more clearly ecological and genetic mechanisms that contribute to the origin and maintenance of species diversity in *Quercus* and other plant groups with similar biological characteristics.

Mexico represents the most important center of secondary radiation for the genus *Quercus* after the radiation of monophyletic groups of oaks (Manos *et al.*, 1999). In the country there are more than 160 species, with ~109 endemics (Valencia-A, 2004). Additionally, oak species in México are morphologically and ecologically diverse as they have developed throughout the country's rugged topography (Valencia-A, 2004). The high species concentration in some regions of the country is also of great interest (Rodríguez-Correa *et al.*, 2015), where more than 10 species can be found in close proximity in relatively small areas, particularly within altitudinal or other environmental gradients. For example, in the Tequila Volcano in Jalisco, Mexico, 13 oak species inhabit in sympatry (Hernández-Calderón *et al.*, 2014). At this site, low genetic differentiation and high introgression between the white oaks *Q. magnoliifolia* and *Q. resinosa* has been previously documented but with clear morphological, phenological and ecological distinctiveness (Albarrán-Lara *et al.*, 2010; Hernández-Calderón *et al.*, 2013, 2014).

In this study, we extended the analysis of genetic differentiation patterns across the whole altitudinal gradient of the Tequila Volcano including the four most common white oak species (*Q. magnoliifolia*, *Q. resinosa*, *Q. obtusata* and *Q. rugosa*) (Hernández-Calderón *et al.*, 2014). We used sequence repeats (SSRs) and expressed sequence tags EST-SSRs. The later are microsatellites associated to coding DNA and thus can be considered “functional markers” that directly sample variation in genes and are, therefore, valuable for analyzing the genetic basis of adaptation (Durand *et al.*, 2010). The specific questions addressed were 1) What are the levels and patterns of genetic variation and differentiation among the four species along the elevation gradient; and 2) Are EST-SSR markers more differentiated than neutral SSRs as expected under the action of divergent selection on functional loci?

Materials and Methods

Study site

This study was conducted at the Tequila Volcano, Jalisco, México (20°50' N, 103°50' W). This volcano is part of the western region of the Trans-Mexican Volcanic Belt and shows an elevational gradient from approximately 700 to 2890 m. asl. The soils are luvisols and pheozem. The mean annual precipitation is 849 mm with rains concentrated within the summer. The remnants of natural vegetation at the lower parts of the volcano are constituted by tropical dry forest species, while from about 1400 m to the top of the mountain the dominant vegetation is oak forest (Hernández-Calderón *et al.*, 2014). Previous vegetation surveys have reported 13 oak species distributed along the elevational gradient, including seven belonging to section *Lobatae* (red oaks) and six belonging to section *Quercus* (white oaks) (Hernández-Calderón *et al.*, 2014). At the volcano, mean temperature 19.5°C has been shown to decrease by 0.59 °C for every 100 m of

increase in elevation but precipitation does not change consistently along the gradient (Hernández-Calderón *et al.*, 2013). Soil water potential at the peak of the dry season (May) changed from -10.4 Mpa at 1450 m to -2.9 Mpa at 2110 m, indicating the existence of a steep gradient of soil water availability during the driest period of the year (Hernández-Calderón *et al.*, 2013).

Characterization of oak communities and sample collection

The structure and composition of white oak communities throughout the altitudinal gradient was determined by counting the number of individuals from each species in seven 20 x 100 m transects placed every 200 m of elevation, from 1530 to 2730 m. Simultaneously, we sampled leaves from ten randomly chosen individuals for each species at each transect, or from all individuals in cases where less than ten trees per species were present. Approximately ten intact young leaves were taken per tree and placed in plastic bags on ice and later stored at -80 °C in the laboratory.

DNA extraction and microsatellite genotyping

DNA was extracted from approximately 100 mg of leaf tissue using the modified CTAB protocol of Lefort & Douglas (1999). Nine nuclear microsatellite loci that gave consistent results in the four oak species studied were selected and amplified in multiplex polymerase chain reactions (PCR). Eight of these loci (quru-GA-OC19, -2M04, -OM05, -OM07, -IF02, -OI01, -OC11 and -IC06) were previously characterized from *Q. rubra* (Aldrich *et al.*, 2002) and one (ZAG 96) from *Q. robur* (Kampfer *et al.*, 1998). Four groups of primer pairs were assembled, as follows: a) quru-GA-OC19 and 2M04, b) -OM07 and -IF02, c) -OI01 and -OM05 and d) -OC11, IC06 and ZAG 96. Similarly, we tested 17 EST-SSRs markers developed for *Q. robur* and *Q. petraea* (Durand *et al.*, 2010; Ueno *et al.*, 2012) from which ten were selected and assembled in three multiplex reactions:

a) FIR015, FIR024, FIR030, FIR031 and FIR039; b) VIR057, WAG005, GOT009; and c) GOT040 and VIT107. The PCR reaction was composed of 3 μ L of Multiplex PCR Master Mix, 1.4 μ L of deionized water, 0.3 μ L of BSA, 0.6 μ L of microsatellite primer and 1 μ L of DNA. In all cases, forward primers were fluorescently labeled. The amplification program for all PCR reactions consisted of a denaturation step at 94 °C for 4 min, followed by 35 cycles with denaturation at 94 °C for 30 s, annealing at 55 °C for 45 s and extension at 72 °C for 1 min. A final extension step at 72 °C for 10 min was included. PCR products were combined with Hi-Di formamide and GeneScan 600 LIZ as size standard and analyzed using Applied Biosystem 3500 sequencer. Resulting electropherograms were analyzed with the Genemarker program (Holland *et al.*, 2011) for allele size and genotype assignment.

Data analysis

To assess the presence and frequency of null alleles in the microsatellite loci employed, the FreeNA software (Chapuis & Estoup, 2007) was used, which is based on the expectation maximization algorithm (Dempster *et al.*, 1977). Tests of Hardy–Weinberg and pairwise linkage equilibria among loci were performed using the program Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier & Lischer, 2010). Genetic diversity statistics were calculated separately for nSSRs and EST-SSRs markers using GENALEX ver. 6.5 (Peakall *et al.*, 2006). For each species and elevation, we estimated the mean number of alleles per locus (N_a), the mean number of effective alleles per locus (N_e), mean observed and expected heterozygosity (H_o and H_e , respectively) and the inbreeding coefficient (F). Global values were also obtained for each species.

The magnitude of genetic differentiation among species was determined with analyses of molecular variance (AMOVA) in ARLEQUIN ver.3.0 (Excoffier *et al.*, 2005) using the infinite

alleles mutation model (IAM) to estimate a global and pairwise F_{ST} among all species. Significance levels were obtained on the basis of 10,000 permutations.

Patterns of genetic structure were analyzed with the Bayesian assignment method implemented in the STRUCTURE software (Pritchard *et al.*, 2009). This program uses Markov chain Monte Carlo (MCMC) simulations to infer the number of genetic groups in a sample of individuals, assigning individuals to K populations based on their multilocus genotypes. The program was executed under the admixture model, assuming correlated allelic frequencies. Based on preliminary runs, the value of K was set from 1 to 5, and five independent runs for each value of K. Each run consisted in a burn in of 500,000 steps and 1,000,000 MCMC iterations. The most likely value of K was determined with the ΔK method (Evanno *et al.*, 2005) implemented in the online tool STRUCTURE HARVESTER (Earl & von Holdt, 2012). Separate STRUCTURE analyses were performed for the SSRs and EST-SSRs data sets. To assess if any of the analyzed loci shows higher or lower genetic differentiation than expected under neutrality among species, the finite island model was used and included 150 000 simulations at a 95% confidence interval under the stepwise mutation model. This analysis was performed in ARLEQUIN using SSR and EST-SSRs data simultaneously.

Results

Species distribution along the altitudinal gradient

A total of 473 individuals of the four white oak species were identified throughout the altitudinal gradient. At the first elevation (1530 m), 171 *Q. magnoliifolia* individuals (100%) were identified. At the second elevation (1730 m), 81 *Q. resinosa* individuals (95%) and 4 *Q. obtusata* individuals

(5%) were recorded. In the third transect (1930 m), 53 individuals of *Q. resinosa* (70%) and 22 individuals of *Q. obtusata* (29%) were counted. In the fourth (2130 m) and fifth (2330 m) transects, only *Q. obtusata* (100%) was found (68 and 40 individuals, respectively). At 2530 m of elevation 11 individuals of *Q. rugosa* (100%) were found. Finally, at 2730 m, 3 *Q. obtusata* individuals (43%) and 4 *Q. rugosa* individuals (57%) were recorded (Figure 2).

Genetic diversity

The tests for Hardy-Weinberg equilibrium indicated that all loci showed significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium in at least one species/elevation combination. However, deviations were not consistently observed in the same loci. The analysis in FreeNA detected the presence of null alleles at most loci, but in general with a low frequency in each species/elevation combination. Finally, the linkage disequilibrium test did not detect a consistent pattern of pairwise linkage among loci across species/elevation combinations, suggesting the absence of physical linkage among the markers used. Genetic diversity estimates were in general elevated for the four species based on both SSRs and EST-SSRs, but with slightly higher values for later (Table 1). In the case of SSRs, the mean number of alleles per locus ranged from 4.8 (*Q. magnoliifolia*) to 12.8 (*Q. obtusata*) and H_E ranged between 0.58 and 0.72 also in these two species. N_A in EST-SSRs varied between 7.1 (*Q. magnoliifolia*) and 15.4 (*Q. obtusata*) and H_E between 0.77 (*Q. resinosa*) and 0.83 (*Q. rugosa*). Genetic diversity estimates by elevation for the three species that were present in more than one transect (*Q. resinosa*, *Q. obtusata* and *Q. rugosa*) did not indicate a pattern of increase or decrease of genetic diversity along the gradient (Table 1).

Overall differentiation values obtained from the AMOVA among the four oak species were $F_{ST} = 0.106$ ($P < 0.001$) and $R_{ST} = 0.15$ ($P < 0.001$) for the SSRs. The corresponding values for the

EST-SSRs were $F_{ST} = 0.084$ ($P < 0.001$) and $R_{ST} = 0.223$ ($P < 0.001$). Pairwise differentiation values were significant in most comparisons (Table 2), except for the R_{ST} between *Q. resinosa* and *Q. rugosa* calculated from SSRs, and the R_{ST} between *Q. resinosa* and *Q. obtusata* from EST-SSRs (Table 2). In all cases, higher differentiation values were observed between *Q. magnoliifolia* and the other three species.

The results of STRUCTURE for the SSRs, analyzed with the ΔK statistic in STRUCTURE HARVESTER indicated $K = 3$ as the most likely number of genetic groups (Figure 3). In general, a high proportion of the red group was present in *Q. magnoliifolia* (0.89) and *Q. resinosa* (0.72), while the green and blue groups predominated in *Q. obtusata* (0.53 and 0.33, respectively) and in *Q. rugosa* (0.36 and 0.58). The pattern of change in the frequency of the genetic groups is somewhat clinal, with the red genetic group decreasing and the blue group increasing with elevation, while the green group first increased in frequency at intermediate elevations and then decreased at the highest elevations (Figure 4).

In the case of the EST-SSRs markers the analyses also indicated a $K = 3$ as the most likely number of genetic groups (Figure 4), but the pattern was somewhat different in comparison to the SSRs results. The distinction between *Q. magnoliifolia* and *Q. resinosa* was clearer, since the blue genetic group predominated in the second species (with a frequency of 0.76), while the ancestry of the first species was composed of both the green and the blue genetic groups (0.56 and 0.41, respectively). The red genetic group was in high frequency in *Q. obtusata* (0.71) and, finally, *Q. rugosa* showed a combination of the red (0.52), green (0.36) and blue groups (0.12).

Outlier loci

Two markers, ZAG96 ($F_{ST} = 0.292$, $P = 0.001$) and FIR015 ($F_{ST} = 0.226$, $P = 0.001$) were detected as outlier loci under divergent selection among species (Figure 5). In contrast, four markers were found to show lower than expected differentiation, GOT040 ($F_{ST} = 0.034$, $P = 0.001$), FIR030 ($F_{ST} = 0.034$, $P = 0.0001$), WAG005 ($F_{ST} = 0.023$, $P = 0.001$) and IF02 ($F_{ST} = 0.021$, $P = 0.01$) suggesting extensive allele sharing among species and the action of stabilizing selection.

Discussion

In this study, we evaluated the patterns of genetic diversity and differentiation among white oaks species distributed along an altitudinal gradient in the Tequila volcano, Mexico. The census data indicated that the four species analyzed clearly differ in their altitudinal distribution. As previously recorded at this site (Hernández-Calderón *et al.*, 2014; Aguilar-Peralta *et al.*, 2016), the white oak species present at the lowest elevation was *Q. magnoliifolia*, followed by *Q. resinosa*. The species with the broadest altitudinal distribution was *Q. obtusata* and, finally, *Q. rugosa* was found at the two transects of highest elevation. These well-defined distributions suggest the action of strong environmental filters constraining the altitudinal interval occupied by each species along the environmental gradient. At the small spatial scale involved (a few kilometers) limited seed dispersal is probably not the explanation for the staggered distribution of the species. Therefore, selection pressures associated to abiotic or biotic factors that vary with elevation and determine differential establishment and survival may be the cause of this pattern.

Previous studies (Hernández-Calderón *et al.*, 2013) have documented changes in temperature, precipitation and soil water potential with elevation between 1450 and 2110 m at the Tequila volcano. While precipitation did not change consistently, mean temperature showed the expected decrease of about 0.59 °C per 100 m of elevation. Interestingly, during the driest season soil water potential

changed from -10.4 MPa at 1450 m to -2.9 Mpa at 2110 m, suggesting that soil water availability is probably one of the most important environmental constraints for oak species at this site.

The genetic results of our study indicated high levels of genetic diversity in the four species analyzed as is usually observed in oak species (Sullivan *et al.*, 2016; Ohsawa *et al.*, 2008). At the species level, although these estimates are probably affected by sample size, the mean number of alleles per locus for SSR markers had the lowest value in *Q. magnoliifolia* and the highest value in *Q. obtusata*. A similar trend was observed for EST-SSRs, but with higher number of alleles in general. Expected heterozygosity also followed the same pattern. Unlike previous reports that have found reduced genetic variation for EST-SSRs in comparison to SSRs (Durand *et al.*, 2010), here we found the opposite pattern, with EST-SSRs showing a higher number of alleles and heterozygosity. However it is also true that an ascertainment bias in loci selection for the study might have been involved.

We found significant and considerable differentiation values among the four oak species, particularly with the RST estimator. The global value obtained for EST-SSRs ($RST = 0.223$) was higher than the corresponding value for SSRs (0.15), providing support to the expectation of a higher differentiation level at markers associated to functional genetic variation than at neutral markers. However, this pattern was not observed with FST . In turn, pairwise differentiation among species showed significant values in all comparisons, except for the RST value between *Q. resinosa* and *Q. rugosa* calculated from SSRs, and the RST between *Q. resinosa* and *Q. obtusata* from EST-SSRs. Conversely, *Q. magnoliifolia* was the species that showed the greatest differentiation with the rest of the species for both SSRs and EST-SSRs. Even though these patterns were not clearly associated with the distribution of the species along the altitudinal gradient, it is interesting that *Q. magnoliifolia* is the only species present at the lowest elevation at the volcano. Therefore, probably both neutral and selective factors may be responsible of the increased differentiation of this species with the other three. For example, differences in flowering phenology related to environmental variation may reduce the

possibility of interspecific gene flow via pollen between this species and the others. Previously, strong differences in foliar phenology among populations of *Q. magnoliifolia* and *Q. resinosa* have been reported (Hernández-Calderón *et al.*, 2013) and it is possible that a similar pattern occurs with flowering phenology. Additionally, this species probably experiences the harshest environment in terms of high temperatures and low soil water availability, what probably results in divergent selection pressures that maintain genetic differentiation between *Q. magnoliifolia* and the species inhabiting at higher elevations, particularly at loci related to adaptations to these environmental conditions.

The outlier loci detection test identified two loci with high genetic differentiation among species. The first was the “neutral” SSR locus ZAG96 ($F_{ST} = 0.292$) and the second was the EST-SSR locus FIR015 ($F_{ST} = 0.226$). ZAG96 has been repeatedly identified as an outlier locus in several interspecific comparisons of oak species (Gugerli *et al.*, 2007; Neophytou *et al.*, 2010). Even though it is an SSR marker, ZAG96 appears to be in close physical proximity to a locus involved in controlling leaf morphological traits (Saintagne *et al.*, 2004; Bodénès *et al.* 2012). This result contradicts the distinction between SSRs and EST-SSRs that we assumed for this study and highlights the necessity of not considering markers individually but in terms of their genomic context. The FIR015 locus is within a locus identified as related to the THO complex subunit 4A-like in *Q. ruber*, which has the function of producing protective compounds by activating the proteasome, facilitating the response to stressful conditions (Sullivan *et al.*, 2003).

In contrast, four loci showed reduced differentiation, suggesting that these may be under balancing selection, or in other words, that favorable alleles are shared by all species. The FIR030 marker occurs within the NADH dehydrogenase gene, which is related to vegetative growth, allowing resistance to severe drought episodes (Sweetman *et al.*, 2019) and the WAG005 marker is in a gene coding for a glycine-rich RNA-binding protein, which has been implicated in metabolic processes

related to the response to several types of stress, including water stress and temperature stress (Yang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2018).

In conclusion, we have shown that four species of Mexican white oak species show in general significant genetic differentiation along and altitudinal gradient at the Tequila volcano. Even though there is a proportion of genetically intermediate individuals indicating that hybridization occurs between various species pairs, in general species identity is maintained. However, individual genetic markers indicate that divergent selection, balancing selection and neutral processes could be influencing the amount and pattern of differentiation in this system. Some loci with exceptionally high differentiation probably contain alleles that are favorable for certain species and at specific elevations, what contributes to strengthen the boundaries between them. On the contrary, other loci with very low differentiation probably contain alleles that are favorable for several of the species and at various elevations. Hybridization and introgression are the processes that probably modulate genetic variation sharing in oaks, facilitating the interaction between gene flow and natural selection in multispecies systems.

Referencias

- Aguilar-Peralta, J. S., González-Rodríguez, A., González-Esquivel, J. G., & Cuevas-Reyes, P. (2016). Patrones de depredación de bellotas en especies del género *Quercus* (Fagaceae) a lo largo de un gradiente altitudinal en el volcán de Tequila, Jalisco. *Biológicas Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias*, 18(1), 1-9.
- Aldrich, P. R., Michler, C. H., Sun, W., & Romero-Severson, J. (2002). Microsatellite markers for northern red oak (*Fagaceae*= *Quercus rubra*). *Molecular Ecology Notes* 2(4), 472-474.

Bodénès, C., Chancerel, E., Gailing, O., Vendramin, G. G., Bagnoli, F., Durand, J., ... & Plomion, C. (2012). Comparative mapping in the Fagaceae and beyond with EST-SSRs. *BMC plant biology*, 12(1), 1-18.

Cannon, C. H., & Petit, R. J. (2020). The oak syngameon: more than the sum of its parts. *New Phytologist*, 226(4), 978-983.

Cavender-Bares, J. (2019). Diversification, adaptation, and community assembly of the American oaks (*Quercus*), a model clade for integrating ecology and evolution. *New Phytologist*, 221(2), 669-692.

Cavender-Bares, J., & Pahlich, A. (2009). Molecular, morphological, and ecological niche differentiation of sympatric sister oak species, *Quercus virginiana* and *Q. geminata* (Fagaceae). *American Journal of Botany*, 96(9), 1690-1702.

Chapuis, M. P., & Estoup, A. (2007). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular biology and evolution*, 24(3), 621-631

Dempster, A. P., Laird, N. M., & Rubin, D. B. (1977). Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 39(1), 1-22

Dumolin-Lapègue, S., Kremer, A., & Petit, R. J. (1999). Are chloroplast and mitochondrial DNA variation species independent in oaks? *Evolution*, 53(5), 1406-1413.

Durand, J., Bodénès, C., Chancerel, E., Frigerio, J. M., Vendramin, G., Sebastiani, F., ... & Mattioni, C. (2010). A fast and cost-effective approach to develop and map EST-SSR markers= oak as a case study. *BMC genomics*, 11(1), 1-13.

Earl, D. A. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation genetics resources*, 4(2), 359-361.

Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 14(8), 2611-2620.

Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2005). Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics*, 1, 117693430500100003.

González-Rodríguez, A., Arias, D. M., Valencia, S., & Oyama, K. (2004). Morphological and RAPD analysis of hybridization between *Quercus affinis* and *Q. laurina* (Fagaceae), two Mexican red oaks. *American Journal of Botany*, 91(3), 401-409.

Gugerli, F., Walser, J. C., Dounavi, K., Holderegger, R., & Finkeldey, R. (2007). Coincidence of small-scale spatial discontinuities in leaf morphology and nuclear microsatellite variation of *Quercus petraea* and *Q. robur* in a mixed forest. *Annals of Botany*, 99(4), 713-722.

- Hernández-Calderón, E., González-Rodríguez, A., Méndez-Alonzo, R., Vega-Peña, E., & Oyama, K. (2013). Contrasting leaf phenology in two white oaks, *Quercus magnoliifolia* and *Quercus resinosa*, along an altitudinal gradient in Mexico. *Canadian Journal of Forest Research*, 43(2), 208-213.
- Hernández-Calderón, E., Méndez-Alonzo, R., Martínez-Cruz, J., González-Rodríguez, A., & Oyama, K. (2014). Altitudinal changes in tree leaf and stem functional diversity in a semi-tropical mountain. *Journal of vegetation science*, 25(4), 955-966.
- Holland, M. M., & Parson, W. (2011). GeneMarker® HID: A reliable software tool for the analysis of forensic STR data. *Journal of forensic sciences*, 56(1), 29-35.
- Kampfer, S., Lexer, C., Glossl, J., & Steinkellner, H. (1998). Brief report characterization of (GA) n microsatellite loci from *Quercus robur*. *Hereditas*, 129(183), 1-86.
- Le Provost, G., Sulmon, C., Frigerio, J. M., Bodénès, C., Kremer, A., & Plomion, C. (2012). Role of waterlogging-responsive genes in shaping interspecific differentiation between two sympatric oak species. *Tree Physiology*, 32(2), 119-134.
- Lexer, C., Kremer, A., & Petit, R. J. (2006). Shared alleles in sympatric oaks: recurrent gene flow is a more parsimonious explanation than ancestral polymorphism. *Molecular Ecology*, 15(7), 2007-2012.
- Luna-Vega, I., Alcántara-Ayala, O., Ruíz-Jiménez, C. A., & Contreras-Medina, R. (2006). Composition and structure of humid montane oak forests at different sites in central and eastern

Mexico. In *Ecology and conservation of neotropical montane oak forests* (pp. 101-112). Springer, Berlin, Heidelberg.

Manos, P. S., Doyle, J. J., & Nixon, K. C. (1999). Phylogeny, biogeography, and processes of molecular differentiation in *Quercus* subgenus *Quercus* (Fagaceae). *Molecular phylogenetics and evolution*, 12(3), 333-349.

Neophytou, C., Aravanopoulos, F. A., Fink, S., & Dounavi, A. (2010). Detecting interspecific and geographic differentiation patterns in two interfertile oak species (*Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Q. robur* L.) using small sets of microsatellite markers. *Forest Ecology and Management*, 259(10), 2026-2035.

Ohsawa, T., Saito, Y., Sawada, H., & Ide, Y. (2008). Impact of altitude and topography on the genetic diversity of *Quercus serrata* populations in the Chichibu Mountains, central Japan. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 203(3), 187-196.

Peakall, R. O. D., & Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes*, 6(1), 288-295.

Peñaloza-Ramírez, J. M., González-Rodríguez, A., Mendoza-Cuenca, L., Caron, H., Kremer, A., & Oyama, K. (2010). Interspecific gene flow in a multispecies oak hybrid zone in the Sierra Tarahumara of Mexico. *Annals of botany*, 105(3), 389-399.

Petit, R. J., Carlson, J., Curtu, A. L., Loustau, M. L., Plomion, C., González-Rodríguez, A., ... & Ducousso, A. (2013). Fagaceae trees as models to integrate ecology, evolution and genomics. *New Phytologist*, 197(2), 369-371.

Pritchard, J. K. (2009). STRUCTURE ver. 2.3. <http://pritch.bsd.uchicago.edu/>.

Ramos-Ortiz, S., Oyama, K., Rodríguez-Correa, H., & González-Rodríguez, A. (2016). Geographic structure of genetic and phenotypic variation in the hybrid zone between *Quercus affinis* and *Q. laurina* in Mexico. *Plant Species Biology*, 31(3), 219-232.

Rieseberg, L. H., Wood, T. E., & Baack, E. J. (2006). The nature of plant species. *Nature*, 440(7083), 524-527.

Rodríguez-Correa, H., Oyama, K., MacGregor-Fors, I., & González-Rodríguez, A. (2015). How are oaks distributed in the Neotropics? A perspective from species turnover, areas of endemism, and climatic niches. *International Journal of Plant Sciences*, 176(3), 222-231.

Saintagne, C., Bodénès, C., Barreneche, T., Pot, D., Plomion, C., & Kremer, A. (2004). Distribution of genomic regions differentiating oak species assessed by QTL detection. *Heredity*, 92(1), 20-30.

SAS Institute. 2008. JMP 8.0. SAS Institute, Cary, North Carolina, USA

- Scotti-Saintagne, C., Mariette, S., Porth, I., Goicoechea, P. G., Barreneche, T., Bodénes, C., ... & Kremer, A. (2004). Genome scanning for interspecific differentiation between two closely related oak species [*Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl.]. *Genetics*, 168(3), 1615-1626.
- Sullivan, J. A., Shirasu, K., & Deng, X. W. (2003). The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants. *Nature Reviews Genetics*, 4(12), 948-958.
- Sullivan, A. R., Owusu, S. A., Weber, J. A., Hipp, A. L., & Gailing, O. (2016). Hybridization and divergence in multi-species oak (*Quercus*) communities. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1), 99-114.
- Sweetman, C., Waterman, C. D., Rainbird, B. M., Smith, P. M., Jenkins, C. D., Day, D. A., & Soole, K. L. (2019). AtNDB2 is the main external NADH dehydrogenase in mitochondria and is important for tolerance to environmental stress. *Plant physiology*, 181(2), 774-788
- Ueno, S., Moriguchi, Y., Uchiyama, K., Ujino-Ihara, T., Futamura, N., Sakurai, T., ... & Tsumura, Y. (2012). A second generation framework for the analysis of microsatellites in expressed sequence tags and the development of EST-SSRS markers for a conifer, *Cryptomeria japonica*. *BMC genomics*, 13(1), 1-16.
- Valencia-A. S. 2004. Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 75:33 - 53
- Van Valen, L. (1976). Ecological species, multispecies, and oaks. *Taxon*, 233-239.

Wang, B., Wang, G., Shen, F., & Zhu, S. (2018). A glycine-rich RNA-binding protein, CsGR-RBP3, is involved in defense responses against cold stress in harvested cucumber (*Cucumis sativus* L.) fruit. *Frontiers in plant science*, 9, 540.

Yang, K. Y., & Kang, H. (2014). Expression of Arabidopsis glycine-rich RNA-binding protein AtGRP2 or AtGRP7 improves grain yield of rice (*Oryza sativa*) under drought stress conditions. *Plant Science*, 214, 106-112.

Table 1. Genetic diversity estimates in four white oak species along an altitudinal gradient at the Tequila volcano, calculated for SSRs and EST-SSRs. Values are shown for each altitudinal gradient and overall values for species. Na = mean number of alleles per locus, Ne = mean number of effective alleles per locus; Ho = mean observed heterozygosity; He = mean expected heterozygosity.

Species and elevations	SSRs				EST-SSRs			
	Na	Ne	Ho	He	Na	Ne	Ho	He
<i>Q. magnoliifolia</i>								
1530	4.8	2.8	0.32	0.58	7.1	4.6	0.4	0.8
<i>Q. resinosa</i>								
1730	8	3.4	0.43	0.65	9.8	5.1	0.48	0.78
1930	5.4	3.5	0.4	0.68	6.5	4.1	0.49	0.75
Overall	10	3.7	0.42	0.67	11.7	5.4	0.48	0.77
<i>Q. obtusata</i>								
1730	3.4	2.8	0.45	0.6	2.8	2.4	0.28	0.55
1930	6.4	4.1	0.4	0.72	8.3	5.6	0.44	0.79
2130	6.6	3.9	0.33	0.69	7.0	4.7	0.43	0.71
2330	4.7	3.4	0.42	0.63	5.7	4.7	0.58	0.76
2530	6.2	4.4	0.45	0.79	7.4	5.7	0.45	0.84
2730	1.9	1.9	0.22	0.48	2.6	2.4	0.45	0.70
Overall	12.8	5.6	0.39	0.72	15.4	7.3	0.44	0.80
<i>Q. rugosa</i>								
2330	3.7	3.1	0.44	0.63	4.8	4.1	0.51	0.83
2530	1.8	1.6	0.33	0.35	2.2	2.1	0.2	0.65
2730	7.2	4.1	0.50	0.68	8.2	5.6	0.43	0.81
Overall	9.5	4.1	0.46	0.68	10.5	6.5	0.42	0.83

Table 2. Interspecific differentiation values among four white oak species at the Tequila volcano. A) SSRs and B) EST-SSRs, above diagonal correspond to F_{ST} and below diagonal to R_{ST} values. Values in red were not significant ($P > 0.05$).

A)

	<i>Q. magnoliifolia</i>	<i>Q. resinosa</i>	<i>Q. obtusata</i>	<i>Q. rugosa</i>
<i>Q. magnoliifolia</i>	-	0.088	0.162	0.200
<i>Q. resinosa</i>	0.329	-	0.091	0.136
<i>Q. obtusata</i>	0.226	0.029	-	0.055
<i>Q. rugosa</i>	0.284	0.011	0.033	-

B)

	<i>Q. magnoliifolia</i>	<i>Q. resinosa</i>	<i>Q. obtusata</i>	<i>Q. rugosa</i>
<i>Q. magnoliifolia</i>	-	0.065	0.115	0.106
<i>Q. resinosa</i>	0.437	-	0.098	0.083
<i>Q. obtusata</i>	0.423	0.013	-	0.039
<i>Q. rugosa</i>	0.218	0.064	0.061	-

Figure legends

Figure 1. Geographic location of the four species of white oaks in the mountainous area of the volcano of Tequila Jalisco, where seven altitudinal transects were studied.

Figure 2. Arboreal composition through the altitudinal gradient of the tequila volcano where *Quercus magnoliifolia* is observed at an altitude of 1530 with red coloration, at 1735 and 1930 masl it is observed in green coloration, *Quercus resinosa* and *Quercus obtusata* in blue coloration, From altitudes 2130, 2330, 2530 and 2730 meters above sea level, *Quercus obtusata* and *Quercus rugosa* were observed in color yellow.

Figure 3. Genetic structure among four species of white oaks according to a Bayesian assignment analysis based on SSRs (a) STRUCTURE plot of individual assignment (b) Delta K analysis in Structure Harvester showing the most probable value of K.

Figure 4. Genetic structure among four species of white oaks according to a Bayesian assignment analysis based on EST-SSRs (a) STRUCTURE plot of individual assignment (Delta K analysis in Structure Harvester showing the most probable value of K.

Figure 5. Distribution of the F_{ST} values for each locus as a function of locus heterozygosity based on microsatellites data from four species of white oak. Candidate loci are in blue (positive selection) and black regions (equilibrium selection) with neutral loci in the white region with a confidence level of 99.5%.

Figure 1.

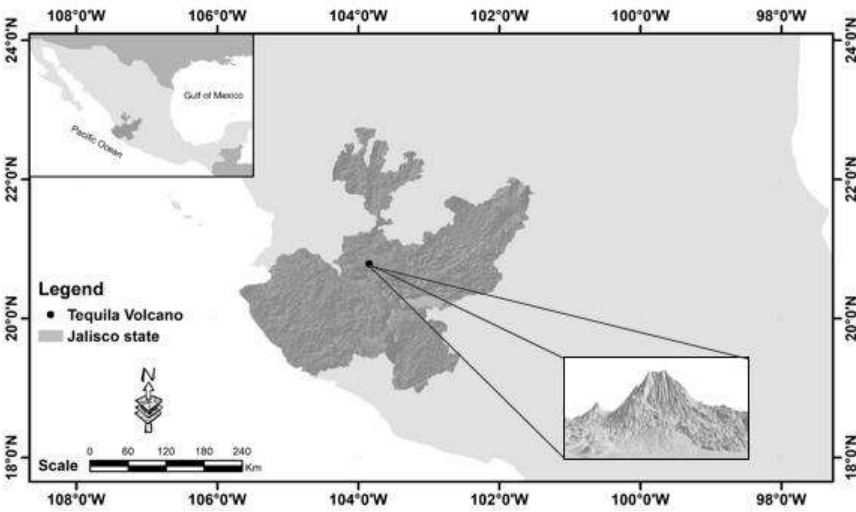


Figure 2.

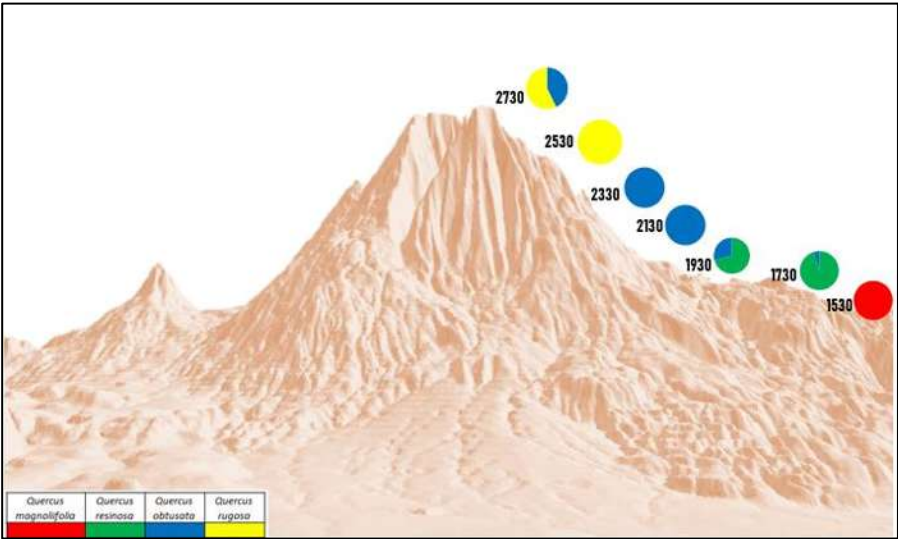


Figure 3.

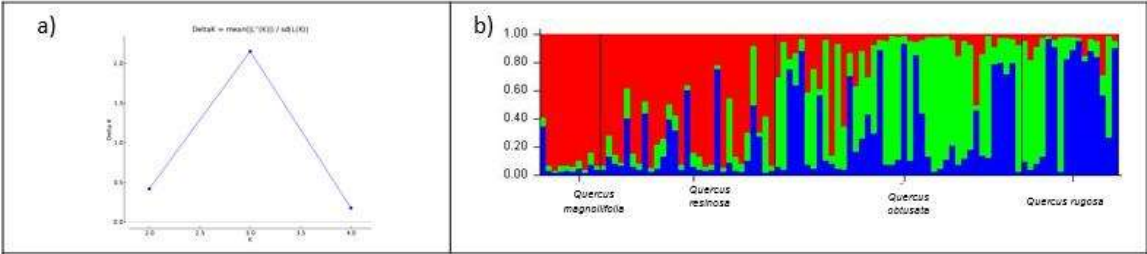


Figure 4.

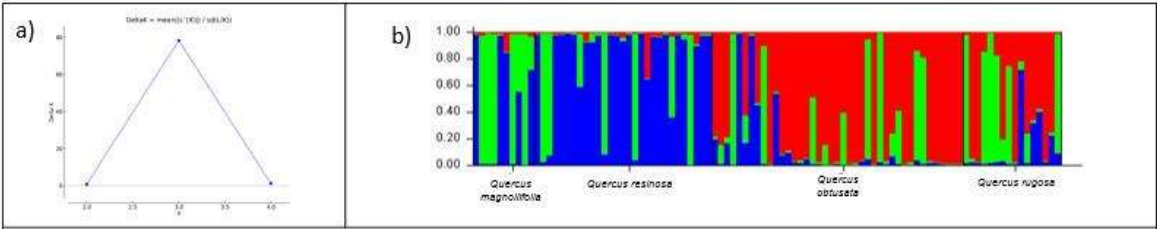
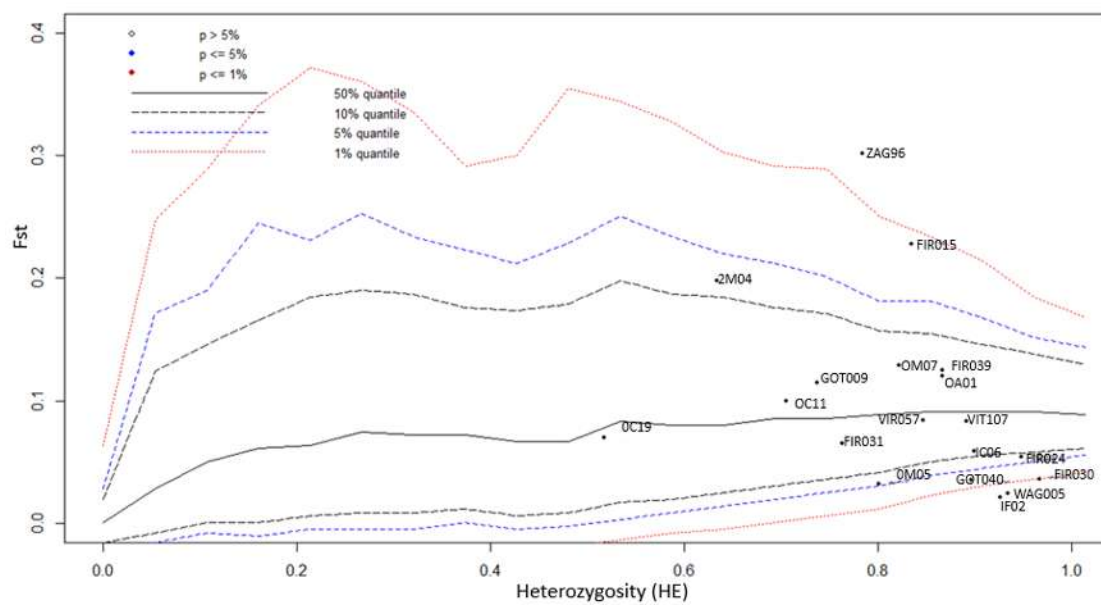


Figure 5.



Discusión general

La geografía de México ha proporcionado diversos escenarios naturales que han permitido estudiar múltiples encinos, desarrollados bajo factores abióticos únicos (Pérez-García *et al.*, 2012). Diversos estudios con especies de encinos han demostrado que la estructura y variación genética entre sus poblaciones se debe a la simpatría en las que crecen, en conjunto con el acoplamiento en sus periodos de floración y los factores abióticos diversos en los que se desarrollan (González-Rodríguez *et al.*, 2004; McCauley *et al.*, 2019; Oyama *et al.*, 2018). Características han generado cambios genéticos adaptativos, dando origen a una variación y estructura genética heterogénea (Lee *et al.*, 2011). Estos estudios muestran características afines a las especies de este estudio, donde *Quercus magnoliifolia* y *Quercus obtusata* comparten la misma área geográfica y podrían mostrar un acoplamiento floral con *Quercus rugosa* y *Quercus resinosa* modificando la estructura y la variación genética a lo largo del volcán de Tequila.

En nuestro estudio las especies mostraron dos agrupaciones, observándose en los marcadores nSSR tres grupos genéticos, donde el mayor porcentaje de individuos puros se muestran en *Quercus magnoliifolia* con un mayor flujo genético hacia las especies *Quercus obtusata* y *Quercus rugosa* a lo largo del volcán de Tequila, conforme va incrementando la altitud. Mientras que en los marcadores EST-SSRs se observaron tres grupos genéticos donde el flujo de genes se observa de las especies de menor altitud hacia las especies de mayor altitud, mostrando mayor número de individuos puros en los extremos altitudinales tanto en las especies *Quercus magnoliifolia* y *Quercus rugosa*.

Los resultados están posiblemente relacionados con la adaptación local que posiblemente existe en el volcán de Tequila. Se han presentado cambios graduales en la morfología de *Quercus magnoliifolia* y *Quercus resinosa*, de una especie a otra a lo largo del gradiente altitudinal, posiblemente relacionado con las condiciones ambientales, además de observarse que los fenotipos parentales puros se

encuentran mayormente en los extremos del gradiente y las zonas intermedias favorecen a los fenotipos intermedios (Albarrán-Lara *et al.*, 2010). Características que están fomentando cambios en la fenología foliar en *Quercus magnoliifolia* y *Quercus resinosa* que al parecer les ha permitido adaptarse a las condiciones locales del volcán de Tequila (Hernández -Calderón *et al.*, 2014). Adaptaciones locales que ya se han observado en otros estudios del género *Quercus*, entre ellos el realizado en *Quercus petraea* y *Quercus crispula*, en los bosques templados de Europa y América, donde se descubrió que ambas especies mostraban un flujo genético entre sus poblaciones, las cuales se distribuyen a lo largo de diversos gradientes altitudinales y que han mostrado adaptaciones fenotípicas del sistema foliar y radicular, lo que ha aumentado la capacidad de las poblaciones para responder a los factores abióticos (Alberto *et al.*, 2013).

El flujo de genes ha favorecido procesos de adaptación de las poblaciones de los encinos, mostrando una mejor respuesta a las condiciones abióticas en las que se desarrollan híbridos entre diferentes especies de encinos que llegan a encontrarse en simpatria (Kremer & Le Corre, 2012). Estudios realizados en California con *Quercus berberidifolia*, *Quercus cornelius-mulleri* y *Quercus engelmannii*, encontraron que han compartido once genes relacionados con la tolerancia al estrés hídrico, entre las tres especies, permitiéndoles desarrollarse en las condiciones ambientales actuales en las que se desarrollan, dado que este grupo de especies se distribuye en zonas desérticas (Oney-birol *et al.*, 2018). Las adaptaciones que se han observado en otros encinos como *Quercus faginea*, *Quercus suber* y *Quercus ilex* representadas en su fenología foliar modificando el tamaño, grosor y dirección de las hojas, características que al encontrarse en condiciones de estrés hídrico, las especies optimizan la asimilación del CO₂ y las relaciones hídricas a nivel de todo el dosel, adaptándose a condiciones abióticas extremas a lo largo de un gradiente ambiental (Mediavilla *et al.*, 2019).

En nuestro estudio, el flujo de genes ha permitido el movimiento de alelos neutrales y adaptativos a lo largo del gradiente altitudinal, en especial los alelos adaptativos (EST-SSRs) en el caso específico,

FIR015 está asociado a la producción de compuestos protectores en las plantas para adaptarse a condiciones de estrés hídrico (Sullivan *et al.*, 2003), WAG005 está involucrado en la adaptación a cambios bruscos de temperatura a través de la proteína RZ1A (Wang *et al.*, 2018) y FIR030 el cual ayuda a que los encinos se sobrepongan a las sequías generando una mayor tolerancia a la fotoinhibición (Sweetman *et al.*, 2019). Estos alelos son transmitidos entre los encinos blancos, permitiéndoles una mayor tolerancia al estrés hídrico (Durand *et al.*, 2010). Investigaciones pioneras del género *Quercus* han encontrado que además de manifestar flujos de genes interespecíficos entre ellos, los encinos blancos han mostrado un mayor rango adaptativo a los múltiples factores abióticos en comparación con los encinos rojos (Lepais *et al.*, 2009 y Lind & Gailing 2013). En nuestro estudio, en el volcán de Tequila se observa a lo largo del gradiente altitudinal, que en las zonas intermedias (1730-2130 msnm) hay un mayor número de especies con alto flujo de genes entre ellas. Lo anterior, genera una mayor frecuencia de híbridos, mientras que en los extremos del gradiente se encuentran individuos puros que tienen mayor adecuación local a las condiciones ambientales. Dichas adecuaciones les han permitido diferenciarse y conquistar nuevos nichos ecológicos como se ha mencionado en trabajos previos de Albarrán-Lara (2010) y Hernández -Calderón (2014) donde ambos concluyen que la diversidad genética adaptativa en genes funcionales y la plasticidad fenotípica son la base para que los encinos se adapten a múltiples cambios ambientales y gradientes altitudinales mostrando un efecto en los caracteres funcionales de hojas y tallos de los encinos.

Con los efectos del cambio climático donde se prevé que vaya en incremento la producción de gases como el CO₂, incrementando las temperaturas de un 1.5-4.5 °C en todo el mundo (Change, 2007), existe una alta preocupación por los encinos ya que son organismos de lento crecimiento y con paulatina propagación sexual (Kremer *et al.*, 2010). En consecuencia, se han realizado diversos estudios sobre cómo los encinos podrían adaptarse a los diversos cambios climáticos, encontrando que la selección divergente y el flujo de polen permitirá que las poblaciones de árboles se adapten a las

condiciones cambiantes (Kremer *et al.*, 2010). En concreto, un estudio realizado en la meseta tibetana en la especie *Quercus aquifolioides* identificó dos genes favorables que se correlacionaron con gradientes climáticos, lo que le ha permitido adaptarse localmente a la sequía (Du *et al.*, 2020). Caso similar el de *Quercus acutissima* en el cual también se encontraron dos grupos de genes, los cuales desempeñan un papel en la fenología foliar y la adaptación ambiental relacionado con la tolerancia a la sequía y la salinidad, particularidades que le han permitido a *Quercus acutissima* distribuirse a lo largo de Asia (Gao *et al.*, 2021). Así mismo, en *Quercus ilex* se encontró que la adaptación a su ambiente se puede deber a que modifican su tasa fotosintética y cierran sus estomas foliares al exponerse a altas temperaturas (Gimeno *et al.*, 2009).

Adaptaciones locales que posiblemente se estén presentando a través de la introgresión entre estas cuatro especies, estén compartiendo alelos que puedan asignar una tolerancia al estrés hídrico, característica que ha sido una limitante en otras especies y que ha provocado la reducción de sus poblaciones. Lo que en un futuro les podría proveer una ventaja adaptativa a los cambios climáticos sobre otras especies arbóreas, por las elevadas temperaturas debido al calentamiento global y posiblemente la conquista de nuevos nichos, generando migraciones hacia gradientes altitudinales menores.

En conclusión, encontramos que las cuatro especies de encinos blancos estudiadas muestran diferenciación genética significativa a lo largo del gradiente altitudinal del volcán de Tequila. Si bien es cierto que existe una cierta proporción de individuos genéticamente intermedios, lo cual indica que ocurre hibridación entre las especies involucradas, en general, la identidad de cada especie se mantiene. Por su parte, los loci individuales indicaron que la selección divergente, balanceadora y los procesos neutrales pueden estar influenciando el nivel y patrón de diferenciación en este sistema. Algunos loci con diferenciación excepcionalmente alta probablemente están asociados con alelos que son favorables para ciertas especies y en elevaciones específicas, lo que contribuye a reforzar las

barreras interespecíficas. Por el contrario, otros loci con muy baja diferenciación probablemente están asociados con alelos que son favorables para varias especies y en diferentes elevaciones. La hibridación y la introgresión son los procesos que probablemente modulan el intercambio de variación genética en los encinos, facilitando la interacción entre el flujo génico y la selección natural en sistemas multiespecies.

Referencias

Albarrán-Lara, A. L., Mendoza-Cuenca, L., Valencia-Avalos, S., Gonzalez-Rodriguez, A., & Oyama, K. (2010). Leaf fluctuating asymmetry increases with hybridization and introgression between *Quercus magnoliifolia* and *Quercus resinosa* (Fagaceae) through an altitudinal gradient in Mexico. *International Journal of Plant Sciences*, 171(3), 310-322.

Alberto, F. J., Aitken, S. N., Alía, R., González-Martínez, S. C., Hänninen, H., Kremer, A., & Savolainen, O. (2013). Potential for evolutionary responses to climate change—evidence from tree populations. *Global Change Biology*, 19(6), 1645-1661.

Arizaga, S. (2009). Manual de la biodiversidad de encinos michoacanos. Instituto Nacional de Ecología

Change, C. (2007). Climate change impacts, adaptation and vulnerability. *Science of the Total Environment*, 326(1-3), 95-112.

Du, F. K., Wang, T., Wang, Y., Ueno, S., & de Lafontaine, G. (2020). Contrasted patterns of local adaptation to climate change across the range of an evergreen oak, *Quercus aquifolioides*. *Evolutionary applications*, 13(9), 2377-2391.

Durand, J., Bodénès, C., Chancerel, E., Frigerio, J. M., Vendramin, G., Sebastiani, F., ... & Plomion, C. (2010). A fast and cost-effective approach to develop and map EST-SSRS markers: oak as a case study. *BMC genomics*, 11(1), 1-13.

Gao, J., Liu, Z. L., Zhao, W., Tomlinson, K. W., Xia, S. W., Zeng, Q. Y., ... & Chen, J. (2021). Combined genotype and phenotype analyses reveal patterns of genomic adaptation to local environments in the subtropical oak *Quercus acutissima*. *Journal of Systematics and Evolution*, 59(3), 541-556.

Gimeno, T. E., Pias, B., Lemos-Filho, J. P., & Valladares, F. (2009). Plasticity and stress tolerance override local adaptation in the responses of Mediterranean holm oak seedlings to drought and cold. *Tree Physiology*, 29(1), 87-98.

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(11), 3467-3476.

Hernández-Calderón, E., Méndez-Alonzo, R., Martínez-Cruz, J., González-Rodríguez, A., & Oyama, K. (2014). Altitudinal changes in tree leaf and stem functional diversity in a semi-tropical mountain. *Journal of vegetation science*, 25(4), 955-966.

Kremer, A., & Le Corre, V. (2012). Decoupling of differentiation between traits and their underlying genes in response to divergent selection. *Heredity*, 108(4), 375-385.

Kremer, A., Ronce, O., Robledo-Arnuncio, J. J., Guillaume, F., Bohrer, G., Nathan, R., ... & Schueler, S. (2012). Long-distance gene flow and adaptation of forest trees to rapid climate change. *Ecology letters*, 15(4), 378-392

LEE, C. R., & MITCHELL-OLDS, T. H. O. M. A. S. (2011). Quantifying effects of environmental and geographical factors on patterns of genetic differentiation. *Molecular ecology*, 20(22), 4631-4642.

Lepais, O., Petit, R. J., Guichoux, E., Lavabre, J. E., Alberto, F., Kremer, A., & Gerber, S. (2009). Species relative abundance and direction of introgression in oaks. *Molecular Ecology*, 18(10), 2228-2242.

Lind, Jennifer F., and Oliver Gailing. "Genetic structure of *Quercus rubra* L. and *Quercus ellipsoidalis* EJ Hill populations at gene-based EST-SSRS and nuclear SSR markers." *Tree genetics & genomes* 9.3 (2013): 707-722.

McCauley, R. A., Cortés-Palomec, A. C., & Oyama, K. (2019). Species diversification in a lineage of Mexican red oak (*Quercus* section *Lobatae* subsection *Racemiflorae*)—the interplay between distance, habitat, and hybridization. *Tree Genetics & Genomes*, 15(2), 1-23.

Mediavilla, S., Martín, I., Babiano, J., & Escudero, A. (2019). Foliar plasticity related to gradients of heat and drought stress across crown orientations in three Mediterranean *Quercus* species. *PloS one*, 14(10), e0224462.

Oney-Birol, S., Fitz-Gibbon, S., Chen, J. M., Gugger, P. F., & Sork, V. L. (2018). Assessment of shared alleles in drought-associated candidate genes among southern California white oak species (*Quercus* sect. *Quercus*). *BMC genetics*, 19(1), 1-12

Oyama, K., Ramírez-Toro, W., Peñaloza-Ramírez, J. M., Pérez Pedraza, A. E., Torres-Miranda, C. A., Ruiz-Sánchez, E., & González-Rodríguez, A. (2018). High genetic diversity and connectivity among populations of *Quercus candicans*, *Quercus crassifolia*, and *Quercus castanea* in a heterogeneous landscape in Mexico. *Tropical Conservation Science*, 11, 1940082918766195.

Pérez-García, E. A., Meave, J. A., & Cevallos-Ferriz, S. R. (2012). Flora and vegetation of the seasonally dry tropics in Mexico: origin and biogeographical implications. *Acta botánica mexicana*, (100), 149-193.

Sullivan, J. A., Shirasu, K., & Deng, X. W. (2003). The diverse roles of ubiquitin and the 26S proteasome in the life of plants. *Nature Reviews Genetics*, 4(12), 948-958.,

Sweetman, C., Waterman, C. D., Rainbird, B. M., Smith, P. M., Jenkins, C. D., Day, D. A., & Soole, K. L. (2019). AtNDB2 is the main external NADH dehydrogenase in mitochondria and is important for tolerance to environmental stress. *Plant physiology*, 181(2), 774-788

Wang, B., Wang, G., Shen, F., & Zhu, S. (2018). A glycine-rich RNA-binding protein, CsGR-RBP3, is involved in defense responses against cold stress in harvested cucumber (*Cucumis sativus* L.) fruit. *Frontiers in plant science*, 9, 540.