

# UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

## TESIS

Diferenciación morfológica y genética de  
especies de *Quercus* L., en el predio  
Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

**JOSÉ WILLIAMS LÓPEZ-SANTIAGO**

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Noviembre de 2022





# UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS

INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

## TESIS

Diferenciación morfológica y genética de  
especies de *Quercus* L., en el predio  
Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

**JOSÉ WILLIAMS LÓPEZ-SANTIAGO**

Directora

DRA. LORENA RUIZ MONTOYA  
EL COLEGIO DE LA FRONTERA SUR

Asesor interno

DR. EDUARDO E. MEDINILLA ESPINOZA  
INSTITUTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, UNICACH

Asesora externa

DRA. NAYELY MARTÍNEZ MELÉNDEZ  
SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE E HISTORIA NATURAL



Tuxtla Gutiérrez, Chiapas

Noviembre de 2022



**UNIVERSIDAD DE CIENCIAS Y ARTES DE CHIAPAS**  
**SECRETARÍA GENERAL**  
**DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES**  
**DEPARTAMENTO DE CERTIFICACIÓN ESCOLAR**  
**AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN**

Lugar: Tuxtla Gutiérrez, Chiapas  
Fecha: 18 de noviembre de 2022

C. José Williams López Santiago

Pasante del Programa Educativo de: Licenciatura en Biología

Realizado el análisis y revisión correspondiente a su trabajo recepcional denominado:

Diferenciación morfológica y genética de especies de *Quercus* L.,

en el predio Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas

En la modalidad de: Tesis Profesional

Nos permitimos hacer de su conocimiento que esta Comisión Revisora considera que dicho documento reúne los requisitos y méritos necesarios para que proceda a la impresión correspondiente, y de esta manera se encuentre en condiciones de proceder con el trámite que le permita sustentar su Examen Profesional.

ATENTAMENTE

**Revisores**

M. en C. Ana Guadalupe Rocha Loredo

Mtro. Manuel Martínez Meléndez

Dr. Eduardo Estanislao Espinoza Medinilla

**Firmas:**

[Firma]  
[Firma]  
[Firma]

Ccp. Expediente

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mis padres Oscar y Sandra, a mis hermanos JeLo Sant y Dani junto con su pequeña gran familia, a mis tíos, tías y demás familiares, así como a mi novia Ariadna y a su familia, por creer siempre en mí, por apoyarme en todo momento y alentarme a alcanzar mis sueños. A todos mis maestros a lo largo de mi formación educativa, gracias por todas las enseñanzas, en especial a aquellos quiénes se han dedicado a enseñarme y acercarme al fantástico mundo de las ciencias. A mi familia Tuxtleca: Doña Luisita Campuzano, Doña Lily Campuzano, a Lupita López, Susana Nucamendi Campuzano, Mario Nucamendi Campuzano y Doris Damas. A todos mis amigos, en especial a mis amigos de la secundaria, de la orquesta de Sancris y de Tuxtla, de la universidad, de inglés y demás, a todos aquellos quiénes me han acompañado durante el caminar de la vida, les estoy infinitamente agradecido.

Esta investigación es producto del trabajo colaborativo con mi directora Lorena Ruiz Montoya del Departamento de Conservación de la Biodiversidad de El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), unidad San Cristóbal. A quien agradezco todas sus enseñanzas, pero sobre todo la confianza, disposición y paciencia para realizar este proyecto en conjunto. Un especial agradecimiento al Ocotones team: Nayely Martínez-Meléndez María Fernanda Cruz-Jiménez, Víctor Daniel Castillo Amaya y a Elián Villalobos, principalmente por su amistad sincera, por compartir tantas aventuras y por su colaboración durante los muestreos en campo. Asimismo, a los trabajadores del predio: Jorge Jiménez Guillen, Miguel Gómez López y Juan Gómez Girón “El Alemán” por apoyarnos en los muestreos, ser guías en campo y por compartirnos amablemente su conocimiento.

Agradezco al Ing. Ariel Gómez Jiménez propietario del predio Los Ocotones (Plan Maestro Los Ocotones, S.P.R. de C.V. de R.L.), y a Víctor E. Gómez, por los permisos otorgados para realizar este trabajo, así como las facilidades de transporte, hospedaje y atención por parte de su equipo de trabajo en el predio. A la bióloga Maricela García Bautista por sus asesorías y apoyo en los análisis genéticos dentro del laboratorio de genética de ECOSUR. A Diana Yaneth Sánchez Molina por apoyarme con la herborización de las muestras en el herbario de ECOSUR, Unidad San Cristóbal. A la Dra. Nayely Martínez-Meléndez, Dr. Neptalí Ramírez Marcial y a la

Dra. Susana Valencia- Ávalos por su ayuda en la determinación taxonómica. Al Dr. Miguel Ángel Peralta-Meixueiro por sus asesorías en los análisis estadísticos. A Ana Cristina Ruíz-Domínguez por sus asesorías en la realización de la tesis. A Derio A. Jiménez-López por la elaboración del mapa de la localización del predio Los Ocotones. A mis asesores: Dra. Nayely Martínez-Meléndez y Dr. Eduardo Medinilla-Espinosa, a mis revisores y sinodales: M. en C. Ana Guadalupe Rocha-Loredo y Biól. Manuel Martínez-Meléndez por su tiempo y observaciones aportadas a este documento.

Este estudio se realizó con apoyo de las actividades de tesis de la Dra. Nayely Martínez-Meléndez como parte del programa Doctorado en Ciencias en Ecología y Desarrollo Sustentable de El Colegio de la Frontera Sur. Asimismo, agradezco a la Subsecretaria de Educación Superior, a través de su Coordinación Nacional de Becas de Educación Superior por el apoyo otorgado BECA PARA INICIAR A TITULACIÓN 2019. Y así también al Instituto de Ciencia, Tecnología e Innovación del Estado de Chiapas (ICTIECH) a través de su Dirección de Fortalecimiento Científico y Tecnológico por el apoyo otorgado BECA TESIS LICENCIATURA 2022.

### **Productividad científica y tecnológica relacionada con el tema de tesis**

- Artículo de divulgación científica: Martínez-Meléndez, N. y López-Santiago, J. W. (2019) - Diversidad de encinos en un refugio de la Sierra Madre de Chiapas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. *Revista Desde el Herbario CICY*. 11: 102–107. Disponible en: [http://www.cicy.mx/sitios/desde\\_herbario/](http://www.cicy.mx/sitios/desde_herbario/) ISSN: 2395-8790
- Constancia como ponentes en la modalidad de CARTEL en el XXI Congreso Mexicano de Botánica, con el trabajo titulado “Riqueza de encinos en un predio con manejo forestal en el sureste de Chiapas”, otorgado por La Sociedad Botánica de México el 26 de octubre de 2019.
- Constancia por la asistencia al taller “Identificación de Encinos Mexicanos” otorgado por La Sociedad Botánica de México y el Instituto Politécnico Nacional, llevado a cabo del 1 al 3 de octubre del 2018 en las instalaciones del CIIDIR unidad Oaxaca.



¿Con qué he de irme?  
¿Nada dejaré en pos de mí sobre la tierra?  
¿Cómo ha de actuar mi corazón?  
¿A caso en vano vinimos a vivir,  
a brotar sobre la tierra?  
Dejemos al menos flores  
Dejemos al menos cantos.

Nezahualcōyōtl  
“Un recuerdo que dejo”

# ÍNDICE GENERAL

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>II</b>
<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>V</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b>	<b>IX</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>X</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>XII</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>II. MARCO TEÓRICO</b>	<b>4</b>
2.1. CLASIFICACIÓN DE ESPECIES .....	4
2.2. LA TAXONOMÍA INTEGRATIVA Y SISTEMÁTICA MOLECULAR.....	5
2.3. CONCEPTO DE ESPECIE .....	6
2.4. DIVERSIDAD Y DISTRIBUCIÓN DEL GÉNERO <i>QUERCUS</i> .....	8
2.5. DESCRIPCIÓN DEL GÉNERO <i>QUERCUS</i> .....	9
2.6. ECOLOGÍA DE LOS ENCINOS.....	10
2.7. USOS DE LOS ENCINOS.....	11
2.8. IDENTIFICACIÓN DE ENCINOS.....	11
2.9. PCR, UN MÉTODO DE ANÁLISIS MOLECULAR PARA DISTINGUIR ESPECIES.....	13
2.10. EL CÓDIGO DE BARRAS EN <i>QUERCUS</i> .....	14
2.11. COMPONENTES PRINCIPALES PARA LA PCR.....	15
2.12. PASOS DE LA PCR.....	15
<b>III. ANTECEDENTES</b>	<b>17</b>
<b>IV. OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
<b>V. ZONA DE ESTUDIO</b>	<b>20</b>
5.1. CLIMA.....	21
5.2. GEOLOGÍA Y EDAFOLOGÍA .....	21
5.3. TIPOS DE VEGETACIÓN .....	22

## **VI. MÉTODO** \_\_\_\_\_ **22**

6.1. MUESTREO DE ESPECIES.....	22
6.2. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES CON BASE EN CARACTERES MORFOLÓGICOS Y MORFOMÉTRICOS FOLIARES .....	23
6.2.1. Identificación de las especies colectadas .....	23
6.2.2. Estimación de los caracteres morfométricos simples y combinados. ...	23
6.2.3. Análisis de medidas de dispersión (medias estadísticas).....	25
6.2.4. Análisis de componentes principales.....	25
6.2.5. Análisis discriminante (AD).....	25
6.3. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES CON BASE EN DATOS GENÉTICOS .....	26
6.3.1. Extracción de Ácido Desoxirribonucleico (ADN) .....	26
6.3.2. Cuantificación de ADN.....	26
6.3.3. Visualización de ADN .....	27
6.3.4. Amplificación y secuenciación .....	28
6.3.5. Marcadores ribosomales nucleares ITS 1-2 e ITS 3-4 (espaciadores transcritos internos por sus siglas en inglés). .....	29
6.3.6. Marcador molecular cloroplástico Maturase K (MatK) .....	29
6.3.7. Marcador molecular cloroplástico CD_CD (trNL) .....	30
6.3.8. Revisión, corrección y alineación de secuencias de marcadores moleculares .....	30
6.4. ANÁLISIS DE IDENTIDAD DE SECUENCIAS DE ADN .....	31
6.5. FILOGENIA MOLECULAR.....	31

## **VII. RESULTADOS** \_\_\_\_\_ **32**

7.1. DIFERENCIACIÓN DE LAS ESPECIES DE <i>QUERCUS</i> PRESENTES EN EL PREDIO LOS OCOTONES, CON BASE EN CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS Y MORFOMÉTRICAS FOLIARES .....	32
7.1.1. Variación morfológica .....	32
7.1.2. Variación morfométrica.....	32
7.1.2.1. Análisis de componentes principales.....	37



7.1.2.2. Análisis Discriminante (AD) utilizando las hojas de 30 individuos de las 13 especies colectadas. ....	39
7.1.2.3. Análisis Discriminante (AD) utilizando el promedio de las hojas por individuo (árbol) de las 13 especies colectadas .....	41
7.2. DIFERENCIACIÓN DE LAS ESPECIES DE <i>QUERCUS</i> PRESENTES EN EL PREDIO LOS OCOTONES, CON BASE EN ANÁLISIS GENÉTICOS .....	43
7.2.1. Extracción y amplificación de ADN .....	43
7.2.2. Análisis de identidad de secuencias mediante Blast GenBank NCBI ...	43
7.2.3. Nivel de diferenciación genética y establecimiento de relaciones filogenéticas entre especies de <i>Quercus</i> presentes en el predio Los Ocotones .....	44
7.2.3.1. Diversidad genética y filogenia de la región de ADN cloroplástico CD_CD (tRNL).....	44
7.2.3.2. Análisis diversidad genética y filogenia de la región de ADN cloroplástico Maturase K (MatK).....	47
7.2.3.3. Análisis de diversidad genética y filogenia de las regiones de ADN cloroplástico Maturase K (MatK) y CD_CD (tRNL) concatenados.....	50
7.2.3.4. Análisis de diversidad genética y filogenia de las regiones de ADN ribosomal ITS 1-2 e ITS 3-4 concatenados .....	53
<b>VIII. DISCUSIÓN</b> .....	<b>56</b>
8.1. ESPECIES Y MORFOESPECIES CON BASE EN SUS CARACTERES MORFOLÓGICOS FOLIARES .....	56
8.1.2. Reconocimiento de un híbrido de <i>Quercus</i> con base en sus caracteres morfológicos y morfométricos foliares .....	58
8.1.3. Variación morfométrica.....	59
8.1.4. Mecanismos morfológicos de respuesta al ambiente .....	61
8.2. ESPECIES Y MORFOESPECIES CON BASE EN LOS ANÁLISIS GENÉTICOS .....	63
8.2.1. Identidad de secuencias ADN de cloroplasto y ADN ribosomal nuclear.....	63
8.2.2. Análisis de diversidad genética.....	64
8.2.3. Relaciones filogenéticas entre las especies de <i>Quercus</i> del predio .....	66
8.2.4. Reconocimiento del individuo híbrido en el predio Los Ocotones .....	68

8.2.5. Reconocimiento del Flujo de genes en el predio Los Ocotones .....	70
8.3. ECOLOGÍA Y CONSERVACIÓN DE LAS ESPECIES DE <i>QUERCUS</i> PRESENTES EN EL PREDIO .....	72
<b>IX. CONCLUSIONES</b> _____	<b>77</b>
<b>X. RECOMENDACIONES</b> _____	<b>80</b>
<b>XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES</b> _____	<b>81</b>
<b>XII. ANEXOS</b> _____	<b>92</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Caracteres morfométricos foliares utilizados para discriminar entre especies de <i>Quercus</i> . _____	24
Cuadro 2. Medias aritméticas y desviaciones estándar de 9 caracteres morfológicos y 4 caracteres combinados de los 30 individuos. _____	36
Cuadro 4. Análisis discriminante de la variación morfológica foliar entre especies de <i>Quercus</i> . *valor de funciones con mayor peso en la discriminación de las especies. _____	39
Cuadro 5. Coeficientes de la función discriminante de la variación morfológica foliar entre especies de <i>Quercus</i> . _____	40
Cuadro 6. Análisis discriminante de la variación morfológica foliar entre individuos de especies de <i>Quercus</i> . _____	41
Cuadro 7. Coeficientes de la función discriminante de la variación morfológica entre especies de <i>Quercus</i> . _____	42
Cuadro 8. Diversidad genética de la región de ADN cloroplasto CD_CD (tRNL), de las especies de <i>Quercus</i> identificadas en el predio Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas. _____	44
Cuadro 9. Diversidad genética de la región de ADN cloroplasto Maturase K (MatK), de las especies de <i>Quercus</i> identificadas en el predio Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas. _____	47
Cuadro 10. Diversidad genética de las regiones de ADN cloroplástico Maturase K (MatK) y CD_CD (tRNL) concatenadas de las especies de <i>Quercus</i> identificadas en el predio Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas. _____	50
Cuadro 11. Diversidad genética de las secuencias concatenadas de las regiones de ADN ribosomal ITS 1-2 e ITS 3-4 para <i>Quercus</i> , de las especies de <i>Quercus</i> identificadas en el predio Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas. _____	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización del predio Los Ocotones, municipio de Cintalapa de Figueroa, Chiapas, México. _____	20
Figura 2. Caracteres morfométricos simples foliares medidos en 10 hojas colectadas de cada uno de los 30 individuos muestreados de las especies de <i>Quercus</i> , presentes en el predio Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas. _____	24
Figura 3. Visualización de muestras de ADN en gel de agarosa al 1%, de algunos individuos de <i>Quercus</i> presentes en el predio Los Ocotones. _____	27
Figura 4. Visualización de productos de amplificación de las secuencias ITS 1-2 en gel de agarosa al 2% de algunos individuos de <i>Quercus</i> del predio Los Ocotones. _____	28
Figura 5. Variación morfológica del género <i>Quercus</i> en el predio Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas. _____	34
Figura 6. Diagramas de cajas y bigotes (box-plot) de los nueve caracteres morfométricos analizados en las 13 unidades taxonómicas operativas (taxa) presentes en el predio Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas. _____	35
Figura 7. Componentes principales con base en 9 caracteres morfométricos 13 taxa de <i>Quercus</i> del predio Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas. _____	37
Figura 8. Funciones discriminantes con base en caracteres morfométricos de 10 hojas de 30 individuos correspondientes a 13 taxa de <i>Quercus</i> identificados en el predio el predio Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas. _____	40
Figura 9. Funciones discriminantes de caracteres morfométricos de 30 individuos correspondientes a 13 taxa de <i>Quercus</i> identificados en el predio Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas. _____	42
Figura 10. Red de cinco haplotipos únicos generado a partir de 25 secuencias del marcador CD_CD (tRNL) en 12 taxa de <i>Quercus</i> . _____	45

- Figura 11. Árbol filogenético con base en 25 secuencias del marcador CD\_CD (tRNL) de 12 taxa de *Quercus*, a través el método del vecino más cercano (NJ) y el parámetro 2-kimura. \_\_\_\_\_ 46
- Figura 12. Red de seis haplotipos únicos generado a partir de 26 secuencias del marcador Maturase K (MatK) en 12 taxa de *Quercus*. \_\_\_\_\_ 48
- Figura 13. Árbol filogenético con base en 26 secuencias del marcador Maturase K (MatK) de 12 taxa de *Quercus*, a través el método del vecino más cercano (NJ) y el parámetro 2-kimura. \_\_\_\_\_ 49
- Figura 14. Red de ocho haplotipos únicos generado a partir de 22 secuencias de las regiones de ADN cloroplasto Maturase K (MatK) y CD\_CD (tRNL) concatenadas en 11 taxa de *Quercus*. \_\_\_\_\_ 51
- Figura 15. Árbol filogenético con base en 22 secuencias concatenadas de las regiones de ADN cloroplasto Maturase K (MatK) y CD\_CD (tRNL), de 11 taxa de *Quercus*, a través el método del vecino más cercano (NJ) y del parámetro 2-kimura. \_\_\_\_\_ 52
- Figura 16. Red de 21 haplotipos únicos generado a partir de 21 secuencias concatenadas de las regiones de ADN ribosomal ITS 1-2 e ITS 3-4 pertenecientes a 10 taxa de *Quercus*. \_\_\_\_\_ 524
- Figura 17. Árbol filogenético con base en 21 secuencias concatenadas de las regiones de ADN ribosomal ITS 1-2 e ITS 3-4 de 9 taxa de *Quercus*, a través el método del vecino más cercano (NJ) y del parámetro 2-kimura. \_\_\_\_\_ 55

## RESUMEN

Los encinares son comunidades vegetales típicas de México y son consideradas especies clave debido a los servicios ecosistémicos que ofrecen. Se estima que varias especies de *Quercus* se encuentran en peligro de extinción, principalmente debido a cambios de uso de suelo y aprovechamiento no sostenible. El reconocimiento confiable de las especies presentes en un área geográfica determinada es necesario, ya que la actualización de listas de especies, además del conocimiento sobre su ecología, son el fundamento de las iniciativas para su conservación. Con la finalidad de identificar y diferenciar a las especies del género *Quercus* presentes en el predio Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas, (México), el cual se encuentra sometido a un aprovechamiento forestal, se realizó un estudio taxonómico integral, para ello se usaron datos cualitativos, morfométricos y genéticos. Se realizaron seis muestreos entre agosto de 2018 y abril de 2019. Se obtuvieron muestras foliares en 30 individuos con un diámetro a la altura del pecho (DAP) >12.73 cm, de 13 taxa distintos (diez especies formalmente descritas y tres que por sus características notablemente diferentes se asumen como dos morfoespecies y un individuo potencialmente híbrido entre *Q. peduncularis* y *Q. glaucescens*). Las hojas se herborizaron y con un vernier milimétrico se midieron en 10 hojas de cada individuo los caracteres morfométricos más importantes para la determinación de especies en *Quercus*. Además, se extrajo ADN de los individuos analizados, se amplificó con marcadores de cloroplasto (MatK y trnL) y ribosomal nuclear (ITS1-2 e ITS 3-4), se confirmó su identidad mediante comparación con las almacenadas en el GenBank, y finalmente se realizaron análisis de filogenia.

Todos los análisis fueron congruentes al separar a los 13 taxa dentro de los subgéneros *Lobatae* (encinos rojos) y *Quercus* (encinos blancos). De las diez especies reconocidas formalmente, seis pertenecen a la sección *Lobatae* y cuatro a la sección *Quercus*. Dos especies: *Q. glabrescens* Benth. y *Q. rubramenta* Trel. son nuevos registros para el predio. Los caracteres más útiles para separar las especies fueron: Largo de la lámina (LL), Largo del pecíolo (LP), Largo total de la hoja (LTH), Largo de la lámina/ Ancho máximo (LL/AM) y Longitud de la base al ancho máximo\* 100/ Largo total de la hoja y (LBAM\*100/ LTH). Estos caracteres pudieron ser capaces de explicar >81.81% de la variación morfométrica foliar de las especies. El análisis discriminante a partir de medias aritméticas distinguió claramente: *Q. acutifolia* mfsp.2, *Q. calophylla* mfsp.1 y mfsp.2, *Q. rubramenta* y *Q. scytophylla*, y en menor grado: *Q. acutifolia* mfsp.1 y *Q. glaucescens*. Genéticamente 37 de las 99 secuencias analizadas (MatK, ITS 1-2 e ITS 3-4), coinciden con secuencias de la misma especie o con las especies presentes en el predio: *Q. acutifolia*, *Q. candicans* (sinonimia de *Q. calophylla*) y *Q. elliptica*. El único taxa que pudo ser distinguido tanto genéticamente como morfológicamente fue *Quercus scytophylla*. Finalmente se encontró que *Q. acutifolia*, *Q. rubramenta* y *Q. vicentensis*, están considerados como Vulnerables

(VU) por la Unión Internacional para La conservación de la Naturaleza (IUCN), por lo cual se recomienda tomar acciones especiales de conservación para dichas especies.

**Palabras clave:** Encinos, marcadores cloroplásticos, marcadores ribosomales, morfología, morfometría.

# I. INTRODUCCIÓN

La clasificación de las especies tiene como objetivo crear un sistema lógico de categorías, en las cuales pueden incluirse seres vivos con suficientes caracteres comunes como para permitir una única referencia (González-Bueno, 1998). A pesar de ello, nuestros esfuerzos para clasificar y enlistar a la diversidad biológica en categorías que permitan establecer jerarquías parece estar alejada con la realidad (Barrientos-Llosa, 2003; Ruelas, 2018), ya que establecer los límites de una especie puede ser impreciso debido a que las características fenotípicas (morfología), la fenología, las características bioquímicas, etc., son altamente variables en la naturaleza (Barrientos-Llosa, 2003).

Los patrones de variación morfológica en poblaciones naturales son producto del flujo de genes, introgresión, selección natural, plasticidad fenotípica, deriva genética e hibridación (Borek y Silvieus, 2009). Esto ocasiona problemas taxonómicos que se ven reflejados en alto número de sinonimias que varias especies presentan, lo cual conduce a problemas de identificación principalmente en los estudios en campo, ya que se dificulta la asignación de especie a individuos con características distintas o intermedias entre dos o más especies (Valencia-Ávalos, 2004; Zúñiga *et al.*, 2009). Gran parte del arte de la taxonomía consiste en reconocer cuáles caracteres son menos variables e indicativos de una evolución de ancestría común, para utilizarlos como caracteres de diagnóstico (Borek y Silvieus, 2009). La capacidad de reconocerlos se adquiere mediante el uso de metodologías de observación y análisis de ejemplares tomados de intervalos amplios de distribución de todas las especies conocidas y potenciales. Según se recolectan más especímenes, se pone a prueba la descripción que hizo el autor de la especie, y en ocasiones, se llega al punto en que es necesario realizar una redesccripción de la misma (Borek y Silvieus, 2009).

El reconocimiento y la delimitación taxonómica de las especies, depende de la integración de toda la información que se genera del estudio de su ecología, etología, reproducción y de la variación de sus caracteres morfológicos en áreas geográficas específicas de interés (Castro-Campillo *et al.*, 1994; Valencia-Ávalos, 2004; Zúñiga *et al.*, 2009). En los últimos años, los avances tecnológicos y científicos, exigen que la taxonomía sea integrativa, por lo tanto, se requiere la incorporación y unificación del



conocimiento de disciplinas como la sistemática molecular, la genética, la filogeografía, la biogeografía, ecología, entre otras. Esto conduce a una mejor descripción, identificación y clasificación de linajes independientes (Martínez-López, 2015). De este modo en la actualidad para identificar y clasificar a las especies, se utilizan dos formas principales: la primera es mediante descripciones morfológicas tradicionales, y otra es el uso de datos basados en la molécula de ADN (Borek y Silvieus, 2009).

Con la llegada de las técnicas moleculares en el análisis de la variación de macromoléculas, surgieron diferentes marcadores “universales” del cambio evolutivo (Curtis *et al.*, 2008). Los primeros marcadores moleculares incluyeron lípidos, metabolitos secundarios, cariotipos, reacciones inmunogenéticas, electroforesis de proteínas (isoenzimas) y la electroforesis de fragmentos de ADN. Sin embargo, fueron la secuenciación de los ácidos nucleicos, la aplicación de la hibridación de ADN y el análisis de los polimorfismos de fragmentos de restricción, los que permitieron buscar homologías en el nivel más básico de la organización biológica (Gernandt *et al.*, 2007; Curtis *et al.*, 2008). La técnica conocida como código de barras de ADN, es una secuencia de una región de ADN corta y estandarizada, que identifica a un organismo individual como miembro de una especie en particular (Borek y Silvieus, 2009; Simeone *et al.*, 2013). Esta técnica se ha propuesto como una nueva herramienta para los taxónomos, y es denominada de esta manera debido a la analogía con el código de producto universal que los artículos en una tienda poseen (Simeone *et al.*, 2013).

La actualización y enriquecimiento de listas de especies, además de un conocimiento ecológico y biológico general de ellas, son el fundamento de las iniciativas nacionales para la conservación de la biodiversidad (Martínez-López, 2015). Sin embargo, en la actualidad se desconoce el número total de especies que conforman la biodiversidad mundial, lo cual ha sido reconocido como “impedimento taxonómico” (Sunderland, 2012). Debido a las actividades antropogénicas y el calentamiento global, se estima que muchas especies quedarán extintas incluso antes de que sean descritas (Martínez-López, 2015).

Los encinares o bosques de encino son comunidades vegetales típicas de México (Valencia-Ávalos, 2004; Rzedowski, 2006). Los árboles de encino son de los más importantes para el sustento rural, gracias a su amplio uso como leña y madera

(Oldfield y Eastwood, 2007). Sin embargo, actualmente aún no hay certeza del número exacto de especies de *Quercus*, no obstante, los especialistas consideran a México como el centro de diversificación del género, ya que es el país con la mayor riqueza y endemismo específico de *Quercus* en el mundo (Valencia-Ávalos, 2004; Romero *et al.*, 2015). Diversos problemas dificultan conocer el número exacto de especies del género: la gran variación morfológica específica (aun dentro del mismo individuo), la frecuente hibridación de las mismas, la escasez, carencia e inaccesibilidad del material tipo y de la literatura original, descripciones originales deficientes y principalmente, la diferencia de criterios para la identificación entre los especialistas del grupo, lo que conlleva a la sobredescripción de muchas de las especies (Valencia-Ávalos, 2004).

En los encinos el principal criterio para la delimitación de las especies radica en la morfología de las hojas (Bonfil, 1993). No obstante, han reportado que las hojas de los encinos son un órgano sumamente variable y sensible a las condiciones climáticas (González-Rodríguez y Oyama, 2005; Zúñiga *et al.*, 2009; Albarrán-Lara *et al.*, 2010; Núñez-Castillo *et al.*, 2011; Ruíz-Domínguez, 2016). A pesar de ello, en la identificación y reconocimiento de las especies del género *Quercus*, todos los caracteres morfológicos macroscópicos y microscópicos en las hojas (Valencia-Ávalos, 2018), así como los caracteres morfométricos que se puedan obtener de ellas (Bruschi *et al.*, 2003; Tovar-Sánchez y Oyama, 2004; González-Rodríguez y Oyama, 2005; Zúñiga *et al.*, 2009; Albarrán-Lara *et al.*, 2010). Además de la comparación de marcadores moleculares (Bellarosa *et al.*, 2005; Simeone *et al.*, 2013; Ruíz-Domínguez, 2016; Yang *et al.*, 2017), deben de ser tomados en cuenta.

La presente investigación tiene como objetivo general identificar a las especies de *Quercus* presentes en el predio particular bajo manejo forestal sustentable Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas (PMLO, 2013), diferenciándolas entre sí, con base en la comparación de caracteres morfológicos foliares y marcadores moleculares (MatK, tRNL, e ITS1-2, ITS 3-4). Además, se aportará información sobre la identidad taxonómica para facilitar la identificación de las especies en campo, de tal forma que el manejo forestal pueda reconocer e incluir la conservación de los encinos en vías de ubicarse en alguna categoría de riesgo. Finalmente, se proporcionará información con posible uso como base para estudios futuros sobre biosistemática y evolución de los encinos del predio.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Clasificación de especies

Desde los tiempos más antiguos el hombre tuvo la necesidad de ordenar y clasificar todo lo que le rodeaba, y más aún las formas de vida con las que tenía contacto día a día (Marzocca, 1985). La primera aproximación a una clasificación de los seres vivos estuvo íntimamente vinculada a la necesidad de reconocerlos, identificarlos y distinguirlos con fines utilitarios (González-Bueno, 1998). Los primeros registros de clasificación de especies, probablemente se encuentran en los grabados de cerámica, huesos y pintura que se han encontrado en las cavernas europeas y que fueron hechos por los cromañones, hace más de 10, 000 años. Ahí se documentan varias especies de insectos, plantas y vertebrados, como mamuts (Barrientos-Llosa, 2003). Hace alrededor de 5, 000 años, los chinos (y un poco después los antecesores de los actuales iraquíes y egipcios), elaboraron catálogos de flora y fauna, les daban nombre e incluían aplicaciones y explicaciones religiosas (Barrientos-Llosa, 2003). En culturas griegas y romanas, agrupaban a las plantas con base en sus usos medicinal, comestible o textil). Fue hasta el siglo XVI que la clasificación se realizó con base en los caracteres morfológicos de las plantas (Marzocca, 1985).

En la actualidad, una de las condiciones básicas del método científico es poder repetir los estudios y llegar a los mismos resultados, por lo tanto, una especie mal identificada puede llevar a grandes confusiones que invalidarían el trabajo realizado (Barrientos-Llosa, 2003). La clasificación de las especies tiene como objetivo crear un sistema lógico y natural de categorías, en las cuales pueden incluirse seres vivos con suficientes caracteres comunes como para permitir una única referencia (González-Bueno, 1998). A pesar de ello, nuestros esfuerzos para clasificar y enlistar a la diversidad biológica en categorías que permitan establecer jerarquías parece estar alejada con la realidad (Barrientos-Llosa, 2003; Ruelas, 2018), ya que establecer los límites de una especie puede ser impreciso debido a que las características fenotípicas (como la morfología, la fenología, las características bioquímicas, etc.) son altamente variables en la naturaleza (Barrientos-Llosa, 2003).

El número de nuevas especies descritas no ha aumentado significativamente en los últimos 70 años, lo cual está teniendo un tremendo impacto en la biología de la

conservación, ya que se cree que, debido a las actividades antropogénicas y el calentamiento global, se estima que muchas especies quedarán extintas antes de ser descritas (Martínez-López, 2015). En un país megadiverso como México, el avance en la descripción de especies es relativamente lento, por lo cual existe una necesidad permanente de realizar trabajos taxonómicos, que provean de información básica para la conservación y gestión sostenible de los recursos naturales que quedan, y que contribuyan a superar los retos que la conservación de la biodiversidad mundial (Sunderland, 2012; Martínez-López, 2015).

## **2.2. La taxonomía integrativa y sistemática molecular**

Los límites propuestos para una especie son estimaciones de lo que en realidad pasa en la naturaleza, con la recolecta de más especímenes se pone a prueba la descripción que hizo el autor de la especie, y en ocasiones se llega al punto en que es necesario realizar una redescrición (Barrientos-Llosa, 2003). Gran parte del arte de la taxonomía consiste en reconocer cuáles caracteres son menos variables y cuales son respuesta de una evolución de ancestría común, para utilizarlos como caracteres de diagnóstico (Borek y Silvieus, 2009). La capacidad de reconocerlos se adquiere con la práctica mediante el uso de metodologías de observación y análisis de ejemplares tomados de intervalos amplios de distribución de todas las especies conocidas y potenciales (González-Bueno, 1998; Borek y Silvieus, 2009).

En los últimos años los avances tecnológicos y de conocimientos, exigen que la taxonomía sea integrativa, por lo cual debe incorporar y unificar el conocimiento de disciplinas como la sistemática molecular, la genética, la filogeografía, la biogeografía, ecología, entre otras. Esto conduce a una mejor descripción, identificación y clasificación de linajes independientes (especies) (Martínez-López, 2015). Los taxónomos han reconocido el valor de tomar en cuenta datos tradicionales y moleculares simultáneamente, ya que, aunque el uso de secuencias de ADN puede ser considerada una manera directa de observar diferencias heredables entre especies, los caracteres tradicionales o morfológicos son determinados por los genes, de esta manera ambos son relevantes en la descripción y el reconocimiento de taxones (Gernandt *et al.*, 2007). El descubrimiento de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR a mediados de los 80's colocó al ADN como la fuente más importante para el

uso de datos moleculares en estudios de reconstrucción filogenética y de genética de poblaciones (Gernandt *et al.*, 2007). Al igual que la taxonomía, la sistemática molecular o filogenética molecular establece la clasificación con base en las relaciones filogenéticas entre organismos y así también, los procesos evolutivos responsables de las mismas (Gernandt *et al.*, 2007).

### **2.3. Concepto de especie**

La especie es una categoría clave y concepto básico más importante en la taxonomía que se ha debatido durante mucho tiempo (Barrientos-Llosa, 2003). Las especies representan un nivel de integración básico en la naturaleza, proveen las bases para describir la diversidad natural y en sí mismas son un instrumento para categorizar dicha diversidad (Valencia-Ávalos, 1991). En biología es casi imposible encontrar definiciones y conceptos de aplicación universal, a pesar de ello, se han propuesto distintos conceptos de especie con el fin de incorporar la diversidad de formas de vida hasta ahora conocidas: concepto evolutivo, ecológico, filogenético, morfológico, pragmático, paleontológico, etc., cada uno con un enfoque y percepción distinta en función del grupo de organismos a analizar, conocimiento y el aspecto o punto de vista desde el cual se estudian (Valencia-Ávalos, 1991; Castro-Campillo *et al.*, 1994; Barrientos-Llosa, 2003). Se dice que la especie taxonómica es una categoría artificial que en la mayoría de los casos no coincide con las unidades reales de la naturaleza (Valencia-Ávalos, 1991).

En años recientes ha surgido otra controversia en torno a la consideración de especie, ya que, aunque se han realizado esfuerzos para establecer un concepto de especie universal, hasta la fecha no existe uno aplicable a todos los organismos, debido que cada concepto fue creado para ser aplicado en un campo en particular y sigue un criterio diferente para definir lo que es una especie (Valencia-Ávalos, 1991). El reconocimiento de las especies y su delimitación, depende de la integración de información morfológica, ecológica, etológica, reproductiva, entre otros (Castro-Campillo *et al.*, 1994). Es así que los conceptos se pueden complementar, ya que no son exclusivos ni absolutos, sino interdependientes. No obstante, los conceptos de especie taxonómica y biológica son los más ampliamente utilizados y aceptados para definir especies (Valencia-Ávalos, 1991).

En este trabajo se hace uso la combinación los conceptos de especie taxonómica y biológica para definir a las especies analizadas, además, para evitar confusiones con aquellas especies que presentan dos morfotipos, se han nombrado en general como unidades taxonómicas operativas (taxa).

Algunos ejemplos de concepto de especie son:

**1) El concepto clásico de especie.** Dice que una especie es aquel grupo de individuos que puede potencialmente reproducirse entre sí y dar una descendencia fértil hasta la perpetuidad. Sin embargo, excluye a organismos con reproducción asexual como las medusas o las estrellas de mar, entre otros (Castro-Campillo *et al.*, 1994; Barrientos-Llosa, 2003).

**2) Concepto biológico.** Se basa en distinguir unidades bajo el criterio morfológico, separándolas entre ellas por su variación, por lo cual se considera un aspecto práctico. A pesar de ser el más usado hasta ahora para abordar las relaciones filogenéticas y evolutivas entre especies posee deficiencias; su principal desventaja es la subjetividad pues no determina objetivamente el grado de diferencias que debe tener la categoría de especie (Valencia-Ávalos, 1991). En la naturaleza existen diferentes especies que se parecen mucho, o bien, existen organismos que pertenecen a una misma especie, pero pueden ser diferentes entre sí (Castro-Campillo *et al.*, 1994).

**3) Concepto ecológico de especie.** Define a una especie como un linaje o conjunto de linajes afines, que evolucionan separadamente de otros y que ocupa una determinada zona adaptativa. Aquí se enfatiza que la especie ocupa un determinado nicho ecológico diferente al de otras especies, pero la dificultad práctica del concepto radica en que no existe una definición ni valoración operativa de "nicho ecológico" o de "zona adaptativa" (Van Valen, 1976; Castro-Campillo *et al.*, 1994).

**4) Concepto evolutivo.** Responde a la dificultad de aplicar el concepto biológico a especies que coexistieron en el pasado (especies no-dimensionales) y que tenemos conocimiento de ellas, gracias a los restos fósiles. En este concepto la especie implica una secuencia de ancestro-descendencia de poblaciones que evolucionan separadamente de otras secuencias y que posee tendencias evolutivas propias (Valencia-Ávalos, 1991, Castro-Campillo *et al.*, 1994).

#### **2.4. Diversidad y distribución del género *Quercus***

Los encinos o robles pertenecen al género *Quercus* L., y es uno de los grupos de plantas leñosas más importantes del hemisferio norte, este género presenta el mayor número de especies dentro de la familia Fagaceae, con alrededor de 500 especies en todo el mundo (Kaul, 1985; Romero *et al.*, 2015). Se estima, por el registro fósil, que se originaron hace unos 90 millones de años (Encina y Villarreal, 2002). Este género se encuentra en casi todos los bosques templados del Hemisferio Norte, así como en algunas regiones tropicales, subtropicales del mismo, e incluso existen algunas especies en hábitats secos en el sureste de Asia y nororiente de África. En América, se localiza desde Canadá hasta Colombia, incluyendo Cuba (Valencia-Ávalos, 2004).

Los encinares o bosques de encino son comunidades vegetales típicas de México, se presentan en casi toda la República Mexicana, con excepción de la península de Yucatán (Rzedowski, 2006). Se encuentran desde el nivel del mar hasta 3,500 msnm; Debe señalarse que el 95% se distribuye entre los 1,200 y 2,800 msnm (Valencia-Ávalos, 2004). Actualmente en México aún no hay certeza del número exacto de especies para el género, lo cual podría atribuirse a factores como la alta variabilidad morfológica específica (aun dentro del mismo individuo), y la frecuente hibridación del género; no obstante, los especialistas consideran a México como el centro de diversificación del género, ya que posee la mayor riqueza y endemismo específico de *Quercus* en el mundo (Valencia-Ávalos, 2004; Romero *et al.*, 2015).

De acuerdo con Nixon (1993) en México existían de 135 a 150 especies, además considera que la mayor diversidad se concentra en las áreas montañosas del centro y el este del país (Nixon, 1993). Valencia-Ávalos (2004) estima que en México existen 161 especies del género *Quercus*, ubicadas en tres secciones: 76 especies en la sección *Lobatae* (encinos rojos), 81 en la sección *Quercus* (encinos blancos) y cuatro en la sección *Protobalanus* (encinos intermedios). De las 161 especies, calculó que 109 son endémicas para el país (Valencia-Ávalos, 2004). Por su parte, Villaseñor (2016) reportó 174 especies para el país. En Chiapas, Breedlove (1986) registró 27 especies de *Quercus*, pero recientemente Villaseñor (2016), registró 44 especies para el estado, lo que representa una cuarta parte del total nacional (de las 44 especies, 17 son endémicas al país) (Villaseñor, 2016).

## 2.5. Descripción del género *Quercus*

El género *Quercus* posee hojas alternas perennifolias, subperennifolias o caducifolias de formas variables, por lo general son pecioladas y se disponen de forma alterna (Valencia-Ávalos, 2004). Aunque la consistencia de las hojas de la mayoría es coriácea, con experiencia se pueden reconocer diferencias (Valencia-Ávalos, 2018). Debe señalarse que las hojas de los encinos son un órgano sumamente variable y sensible a las condiciones climáticas, pueden variar considerablemente en la misma especie y en el mismo individuo (Valencia-Ávalos, 2004). La mayoría son árboles de talla mediana, sin embargo, hay especies de crecimiento arbustivo y algunas especies pueden llegar a ser árboles altos de gran porte (Encina y Villarreal, 2002; Valencia-Ávalos, 2004).

Son plantas monoicas, es decir, presentan pequeñas flores masculinas y femeninas de colores verdes o amarillas en el mismo árbol. Las flores masculinas forman amentos largos colgantes (inflorescencias formadas por muchas flores unisexuales), mientras que las flores femeninas se presentan en amentos cortos, o bien, pueden ser solitarias (Encina y Villarreal, 2002). Asimismo, se han descrito individuos hermafroditas en *Q. glaucoides*, *Q. rugosa* y *Q. chihuahuensis* (Romero *et al.*, 2015). Generalmente se recolectan ejemplares botánicos sin flores y sin frutos, ya que la floración se da en un corto periodo del año y además los árboles alcanzan grandes tallas, por lo que estas estructuras llegan a ser difíciles de coleccionar (Bonfil, 1993; Valencia-Ávalos, 2018; Romero *et al.*, 2015). Debido a que existe sincronía en la floración, y que la polinización es a través del viento (anemofilia), la hibridación en *Quercus* es frecuente, por lo cual las características florales resultan ser muy homogéneas lo cual limita su utilidad como criterio taxonómico (Romero *et al.*, 2015).

La característica más distintiva de este género es su fruto, también conocido como bellota o nuez, el cual mide de 1 a 5 cm de longitud, y está cubierto parcialmente en la base por una capa escamosa leñosa llamada pericarpo o comúnmente conocido como copa o cúpula (Valencia-Ávalos, 2018). El tamaño y forma de la cúpula, así como la forma y vellosidad de las escamas que cubren a las bellotas difieren entre las secciones, por lo cual son caracteres importantes en la identificación; La sección *Quercus* (encinos blancos) presenta un endocarpo glabro (liso), por su parte, en la



sección *Lobatae* (encinos rojos) es tomentoso (cubiertos de tricomas), mientras que en *Protobalanus* los tricomas que cubren a las escamas son dorados. Asimismo, las escamas de las copas son más delgadas en los encinos rojos que en los blancos, en estos las escamas frecuentemente son engrosadas o quilladas hacia la base (Encina y Villarreal, 2002; Valencia-Ávalos, 2018). Al igual que en otras plantas superiores, las bellotas contienen una plúmula o eje del embrión hacia el ápice y dos cotiledones, sin embargo, carecen de endospermo (Valencia-Ávalos, 2018). Las bellotas se dispersan simplemente por la gravedad (baricoria) pero también pueden ser dispersadas por escarabajos, ardillas e incluso aves como los carpinteros (Bonfil, 1993).

## **2.6. Ecología de los encinos**

Los robles son especies clave en una amplia gama de hábitats ya que son sostén, refugio y alimento de aves, mamíferos, reptiles, artrópodos y de microorganismos que se desarrollan en la rizósfera (Oldfield y Eastwood, 2007; Romero *et al.*, 2015). Sobre los encinos crece una gran variedad de epífitas como orquídeas, bromeliáceas, helechos, musgos y líquenes (Bonfil, 1993). También son formadores del suelo, son generadores de condiciones microambientales, modificadores o reguladores de incendios y de sus efectos en el bosque, así también son participantes activos en la infiltración de agua en cantidades importantes hacia el suelo (Romero *et al.*, 2015).

En todo el mundo, muchas especies de robles están en peligro de extinción, principalmente debido a cambios en el uso de la tierra, pastoreo de ganado y cosecha no sostenible (Oldfield y Eastwood, 2007). En México, los robles son un componente dominante en los bosques de montaña y bosques secos de tierras bajas (Oldfield y Eastwood, 2007), sin embargo, debido al aprovechamiento de su madera, un gran número de los bosques donde habitaban han desaparecido y otros presentan diferentes grados de deterioro (Romero *et al.*, 2015). Se estima que varias especies de *Quercus* deben considerarse amenazadas debido a su distribución restringida y a la escasez de los individuos, por lo cual es necesario intensificar su manejo de manera adecuada con las correspondientes acciones de conservación (Oldfield y Eastwood, 2007; Romero *et al.*, 2015), ya que su desaparición aumenta la susceptibilidad a la erosión, pérdida de micorrizas, de humedad, y alteraciones en el flujo de nutrientes y el desarrollo general del suelo (Romero *et al.*, 2015).

## 2.7. Usos de los encinos

Los encinos han servido en el desarrollo de las civilizaciones ya que durante siglos han proporcionado una importante fuente de madera para construcción, leña, carbón vegetal, etc., y a su vez, las bellotas han servido de alimento para la gente en tiempos de hambruna (Oldfield y Eastwood, 2007; Romero *et al.*, 2015). En la actualidad, los encinos son usados en Europa y Norteamérica industrialmente para obtener diversos productos maderables, entre los que destacan los muebles de alta calidad, la manufactura de chapa, la celulosa para papel, artesanías, barriles de encino blanco para añejamiento de vinos, así como revestimientos de suelo e interiores de casas (Romero *et al.*, 2015). Sus raíces se usan en medicina y sus frutos para la alimentación de ganado porcino (sobre todo en Europa). Su corteza tiene gran cantidad de taninos y sustancias astringentes que han sido utilizadas como curtientes naturales. De manera particular, la corteza de alcornoque mediterráneo (*Q. suber*), se ha utilizado para elaborar los corchos de las botellas de bebidas alcohólicas (Bonfil, 1993).

En México, los encinos son uno de los árboles más importantes para el sustento rural, gracias a su amplio uso como leña para cocinar y madera como material para construir (Oldfield y Eastwood, 2007). Algunas especies son de madera muy dura que puede ser utilizada para fabricar vigas, durmientes y otras estructuras de construcción (Bonfil, 1993). Dicha cualidad ha sido útil para salvar muchos bosques de encinos, ya que en el país existen pocos aserraderos con la tecnología para procesar y aprovechar adecuadamente esta madera (Bonfil, 1993). Así también diversas especies se utilizan para obtener pulpa para papel, mangos de herramientas, cajas de empaque, artesanías, juguetes como los trompos, e incluso instrumentos musicales (Romero *et al.*, 2015).

## 2.8. Identificación de encinos

La taxonomía de los encinos a diferencia de otros grupos de plantas superiores, se basa casi exclusivamente en la morfología de las hojas, ya que las flores aportan poca información para la taxonomía del género debido a la homogeneidad que la mayoría de las especies presentan (Bonfil, 1993; Romero *et al.*, 2015). Además, el género *Quercus* se considera taxonómicamente complicado gracias a su amplia gama fenotípica y gran variación morfológica foliar incluso dentro de un mismo individuo,

dependiendo de la edad y la posición de las hojas en él (Valencia-Ávalos, 2004). No obstante, toda la información que se puede obtener de ellas, permite diferenciar especies (Romero *et al.*, 2015).

Los caracteres foliares más útiles para el reconocimiento de especies del género *Quercus*, de acuerdo con Romero *et al.*, (2015) y Valencia-Ávalos (2018) son:

**1) Edad de la hoja.** En general los caracteres más útiles provienen de hojas maduras, ya que en las hojas jóvenes sufren cambios a lo largo de su desarrollo que no permiten comparar de forma equivalente entre especies. Por ejemplo, las hojas recién surgidas, son generalmente crasas y rojizas, cubiertas con abundantes tricomas, sin embargo, algunas especies tienden a perderlos, o bien las mantienen sólo en algunas partes de la hoja (Valencia-Ávalos, 2018).

**2) Tricomas.** Los principales tipos en encinos son: fasciculados estipitados, fasciculados sésiles, fasciculados contortos, estrellados multirradiados, estrellados fusionados en el centro, solitarios unicelulares y glandulares (Valencia-Ávalos, 2018).

**3) Haz y envés de la hoja.** En ellos se pueden observar el color o tono de verde, se puede observar si son lustrosas u opacas, si son rugosas o lisas, glabras o tomentosas. En el envés son importantes el tomento, su distribución, el tipo de tricomas y la presencia de cera o no (Valencia-Ávalos, 2018).

**4) Forma y tamaño de las hojas.** Es uno de los caracteres más usados para identificar especies de encinos, sin embargo, entre algunas especies es necesario una revisión más detallada bajo la lupa ya que las formas de las hojas se superponen entre sí. Las hojas pueden tener formas elípticas, ovadas, obovadas, lanceoladas, oblanceoladas, oblongas, entre otras (Valencia-Ávalos, 2018). Algunas especies presentan hojas pequeñas que apenas alcanzan 1 cm de largo como *Q. striatula*, o bien otras especies presentan hojas muy grandes que pueden medir más de 40 cm de largo como las de *Q. magnifolia* y *Q. resinosa* (Valencia-Ávalos, 2018).

**5) Venación.** El número de venas secundarias que presentan las hojas de una especie es característico y aunque se superponen en muchas de ellas, es importante junto con los demás caracteres para el reconocimiento de especies (Valencia-Ávalos, 2018).

**6) Tipo de margen.** Puede ser entero, dentado o crenado (lobado, lobulado), con mucrones o aristas, crispado o liso, revoluto o plano (Valencia-Ávalos, 2018). La

presencia de aristas resulta útil para la separación de las secciones: *Lobatae* (posee aristas) y *Quercus* (posee mucrones) (Romero *et al.*, 2015).

**7) Forma de la base y el ápice.** Pueden presentar bases cordadas, agudas, truncadas, etc. y ápices agudos, redondos, obtusos, mucronados, aristados, etc. En general, la base de la hoja es un carácter ligeramente menos variable que en ápice (Valencia-Ávalos, 2018).

**8) Peciolos.** Su longitud y grosor, así como la presencia o no de indumento son caracteres dignos de tomarse en cuenta (Valencia-Ávalos, 2018).

### **2.9. PCR, un método de análisis molecular para distinguir especies**

Actualmente, existen dos formas en que se pueden identificar a las especies, una es con base en características morfológicas, y otra es con base en caracteres moleculares del ácido desoxirribonucleico (ADN por sus siglas en español) (Borek y Silvieus, 2009). Con la llegada de las técnicas moleculares en el análisis de la variación de macromoléculas, surgieron diferentes marcadores “universales” del cambio evolutivo (Curtis *et al.*, 2008). Los primeros marcadores moleculares incluyeron lípidos, metabolitos secundarios, cariotipos, reacciones inmunogenéticas, electroforesis de proteínas y la electroforesis de fragmentos de ADN, sin embargo, fueron la secuenciación de los ácidos nucleicos, la aplicación de la hibridación de ADN y el análisis de los polimorfismos de fragmentos de restricción, los que permitieron buscar homologías en el nivel más básico de la organización biológica: el de los ácidos nucleicos (Gernandt *et al.*, 2007; Curtis *et al.*, 2008).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), es la técnica de laboratorio más importante y revolucionaria en la biología molecular ya que con ella se ha logrado la simplificación e innovación de muchas técnicas moleculares (Serrato *et al.*, 2014). La técnica ofrece un método simple para amplificar secuencias específicas de ADN. Permite generar millones o miles de millones de copias de un fragmento de ADN de interés a través de una síntesis *in vitro* (Passarge, 2009; Pérez-De Castro, 2011; Serrato *et al.*, 2014). Se dice que la sensibilidad del ADN hace posible detectar y amplificar una única molécula de ADN, o bien se puede acceder a un gen

que representa menos de una millonésima parte del ADN total de un organismo superior (Berg *et al.*, 2007; Pérez-De Castro, 2011).

### **2.10. El código de barras en *Quercus***

En los últimos años, las técnicas moleculares han proporcionado valiosos conocimientos sobre las relaciones genéticas entre distintos organismos, siendo objeto de estudio distintas especies de encinos, tal es el caso de *Quercus petraea* y *Q. pubescens* (Bruschi *et al.*, 2000). La técnica conocida como código de barras de ADN, es una secuencia de una región de ADN corta y estandarizada, que identifica a un organismo individual como miembro de una especie en particular (Borek y Silvieus, 2009; Simeone *et al.*, 2013), esta se ha propuesto como una nueva herramienta para los taxónomos, y es denominada de esta manera debido a la analogía con el código de producto universal que poseen los artículos en una tienda (Simeone *et al.*, 2013).

Para las plantas aún no existe un marcador universal para generar el código de barras de ADN (Borek y Silvieus, 2009), en contraste, se incluyen varias regiones de ADN de cloroplastos como la *rbcL* (una región de codificación universal, pero de evolución lenta), *matK* (una región de codificación de evolución relativamente rápida) y *trnH-psbA* (un espaciador intergénico de rápida evolución) (CBOL Plant Working Group, 2009). Recientemente se propuso el espaciador transcrito interno ribosomal nuclear (ITS, por sus siglas en inglés), especialmente la porción ITS2 como código de barras (CBOL Plant Working Group, 2009; ChinaPlant BOL Group, 2011; Simeone *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2017). Sin embargo, en *Quercus* estos marcadores moleculares no funcionan igual que en otras plantas, ya que se ha comprobado que los encinos carecen de códigos de barras de ADN específicos (Simeone *et al.*, 2013), lo cual es resultado de una taxonomía inconsistente y limitada, una hibridación interespecífica frecuente, una clasificación de linajes incompletos, polimorfismos ancestrales compartidos e introgresión, lo cual indica desafíos debido a la falta de marcadores eficientes para el código de barras del género *Quercus* (Simeone *et al.*, 2013). Es por ello, que recientemente se han realizado estudios moleculares con más marcadores moleculares, ya que este método ha demostrado una mejor separación de especies en encinos (Simeone *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2017).

### 2.11. Componentes principales para la PCR

Los componentes clave para una reacción de PCR son: ADN molde, los cuatro nucleótidos, la Taq polimerasa y los cebadores (Serrato *et al.*, 2014), los cuales se explican a continuación:

**1) ADN molde.** Es el ADN total extraído en un conjunto de células del tejido a analizar; También conocido como ADN blanco o plantilla (Serrato *et al.*, 2014).

**2) Nucleótidos.** Los desoxirribonucleósidos trifosfato (dNTP's) o nucleótidos, Son los cuatro bloques básicos del ADN: adenina (dATP), guanina (dGTP), citosina (dCTP) y timina (dTTP) (Serrato *et al.*, 2014).

**3) Taq polimerasa.** Enzima que produce nuevas cadenas de ADN mediante el uso de cadenas existentes como molde a través de la incorporación de nucleótidos al extremo 3' libre del cebador que se ha unido a la cadena molde (Serrato *et al.*, 2014); La PCR utiliza altas temperaturas repetidamente para desnaturalizar el molde de doble hélice de ADN y separar sus cadenas, por lo cual la Taq polimerasa es ideal gracias a la estabilidad térmica que esta proporciona (llamada de esa manera por la bacteria *Thermus aquaticus* de la que se aisló). Su mayor actividad se presenta cerca de los 70°C (temperatura a la que la ADN polimerasa del humano o de *E. coli* no funcionaría). Además, como cofactores de la polimerasa se añaden cationes divalentes, generalmente en forma de cloruro de magnesio (MgCl<sub>2</sub>) (Serrato *et al.*, 2014).

**4) Cebadores o primers.** Secuencia corta de oligonucleótidos (pedazos cortos de ADN de cadena sencilla de unos 20 nucleótidos de longitud), y que proporcionan un punto de partida para la síntesis de ADN. En cada reacción de PCR se utilizan dos cebadores que están diseñados para flanquear la región blanco (región que debe ser copiada), es decir, les agregan secuencias que harán que se unan a cadenas opuestas del molde de ADN sólo en los extremos de la región a copiar (Berg *et al.*, 2007; Passarge, 2009; Pérez-De Castro, 2011; Serrato *et al.*, 2014).

### 2.12. Pasos de la PCR

La reacción se efectúa en equipos conocidos como termocicladores que se programan para que produzcan los ciclos de temperatura a los que se realiza la amplificación (Espinosa, 2007). Los ingredientes se colocan en un tubo, junto con los cofactores que

necesite la enzima, y se someten a ciclos repetidos de calentamiento y enfriamiento a una temperatura y duración específica, los cuales permiten la síntesis del ADN. Las cadenas sintetizadas sirven de molde para la nueva síntesis de ADN, repitiéndose estos ciclos térmicos hasta 40 veces (Berg *et al.*, 2007; Passarge, 2009; Pérez-De Castro, 2011; Serrato *et al.*, 2014). En un ciclo térmico ocurren tres etapas y dan por resultado que la molécula de ADN de doble cadena sea copiada para producir 2 cadenas de ADN. En el segundo ciclo, las dos cadenas de ADN se convierten en 4, y así sucesivamente. Si la reacción es eficiente, con unos pocos miligramos de ADN pueden ser amplificados millones o billones de copias en cuestión de 2-4 horas, según la longitud de la región de ADN molde (Berg *et al.*, 2007; Passarge, 2009; Pérez-De Castro, 2011; Serrato *et al.*, 2014)

Las tres etapas anteriores se describen brevemente a continuación:

**1) Desnaturalización.** La síntesis de ADN requiere que el ADN molde sea primero desnaturalizado, esto significa separar las dos cadenas de ADN en hebras sencillas. La unión de las dos cadenas de la molécula de ADN dúplex es mantenida por enlaces de hidrógeno, y pueden ser fácilmente separadas una temperatura suficientemente alta entre 94-96°C para lograr este objetivo (Passarge, 2009; Serrato *et al.*, 2014).

**2) Templado o hibridación.** La ADN polimerasa tiene como función sintetizar ADN a partir del ADN blanco (del organismos de interés), y para ello requiere de una cadena preexistente de ADN desnaturalizado a la cual se une un pequeño segmento sintético complementario a la cadena molde para iniciar la síntesis, conocido como iniciador, cebador o "primer". Para unir o templar este iniciador con la molécula molde se requiere de una temperatura adecuada para que la hibridación ocurra, generalmente 55-65° C. A una menor temperatura se tiene mayor eficiencia, pero menor especificidad en la amplificación de ADN (Passarge, 2009; Serrato *et al.*, 2014).

**3) Elongación o extensión.** El tercer paso del ciclo es la extensión del iniciador en dirección 5' a 3' usando un ADN polimerasa y desoxirribonucleósidos trifosfatados (dNTP's). Esta extensión de los iniciadores resultará en la síntesis de una copia adicional de ADN entre éstos. La ADN polimerasa funciona en forma óptima a 72°C (Passarge, 2009; Serrato *et al.*, 2014).

### III. ANTECEDENTES

La situación taxonómica de los encinos aún no ha sido resuelta debido a su gran variabilidad morfológica ocasionada por el flujo de genes, selección natural, plasticidad fenotípica, variación intraespecífica, deriva genética e hibridación (Valencia-Ávalos, 2004; Zúñiga *et al.*, 2009). Al realizar un listado de la diversidad del género *Quercus* para México, Valencia-Ávalos (2004) documentó la complicada situación taxonómica de los encinos, ya que encontró un total de 774 sobre descripciones y/o sinonimias de especies, los cuales reclasificó en 161 especies de *Quercus* para México. En algunas especies como *Quercus rubramenta*, ninguna variedad y/o sinonimia fue reportada, sin embargo, en otras especies como *Q. gambelli Nutt, J. Acad.*, fueron reportadas hasta 34 sinonimias (Valencia-Ávalos, 2004). De esta manera, se han realizado distintos estudios para demostrar la amplia variación morfológica que algunas especies presentan o bien, para identificar correctamente entre especies mediante el análisis de características morfológicas (Bruschi *et al.*, 2003; Tovar-Sánchez y Oyama, 2004; González-Rodríguez y Oyama, 2005; Zúñiga *et al.*, 2009; Albarrán-Lara *et al.*, 2010) y más recientemente con caracteres moleculares (Bellarosa *et al.*, 2005; Simeone *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2017). Así también, se han combinado el uso de ambas herramientas con el fin de separar especies morfológicamente similares (Bruschi *et al.*, 2000; Ruíz-Domínguez, 2016). Y para detectar individuos híbridos entre dos o más especies de *Quercus* en áreas de distribución traslapadas (González-Rodríguez y Oyama, 2005; Albarrán-Lara *et al.*, 2010; Núñez-Castillo *et al.*, 2011).

En estudios de variación morfológica se han propuesto medir y calcular valores de distintos caracteres morfológicos y anatómicos, por ejemplo, se ha evaluado la variación morfológica foliar de seis poblaciones de *Q. laeta* en el Parque Nacional Los Mármoles, México, mediante la medición de 17 caracteres morfológicos en hojas de 47 árboles. Los resultados demuestran que la distancia entre la sutura apical y basal, distancia entre lóbulo apical y basal, y diámetro de las nervaduras son las características morfológicas de la hoja que diferencian las poblaciones entre las localidades analizadas (Zúñiga *et al.*, 2009). También se han examinado morfométricamente las hojas en dos especies de robles rojos mexicanos que presentan hibridación: *Q. affinis* y *Q. laurina*. Se obtuvieron medidas de nueve rasgos



en diez hojas elegidas al azar en 512 individuos de 16 poblaciones ubicadas a lo largo de su gradiente de distribución en México. Un análisis de agrupación (conglomerados) mostró dos grupos de poblaciones, que fueron congruentes con su asignación taxonómica (González-Rodríguez y Oyama, 2005).

Por otra parte, se ha evidenciado la importancia y necesidad de desarrollar más marcadores de ADN nuclear y de cloroplastos para identificar correctamente a los encinos alrededor del mundo. Por ejemplo, para determinar relaciones filogenéticas entre 12 especies de *Quercus* en Italia, se usaron secuencias de ADN ribosómico nuclear y espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2), lo cual demuestra la posible presencia de taxones no observados en reconstrucciones filogenéticas anteriores, además se demuestra la posible utilidad del marcador ITS para investigaciones en sistemática molecular en los robles (Bellarosa *et al.* 2005). Una investigación sobre el poder discriminatorio de un subconjunto de códigos de barras altamente variables (matK, trnH-psbA, ITS2), ha revelado conflictos entre el análisis taxonómico morfológico y de marcadores moleculares en *Quercus*. En el estudio, la asignación de especies al grupo infragenérico fue confiable, por lo que se recomendaron el desarrollo de más marcadores moleculares (Simeone *et al.*, 2013). Recientemente, Yang *et al.* (2017), han probado cinco marcadores de cloroplasto, un nuevo diseño de ITS y un gen nuclear de una sola copia (SAP) como códigos de barras de ADN para robles chinos; estos han demostrado que la combinación de los seis (psbA-trnH +matK-trnK +matK+ycf1 +ITS + SAP) de los siete marcadores muestran la mejor resolución de especies (84.85%).

Algunas investigaciones han combinado el uso de herramientas morfológicas y genéticas como son análisis de microsatélites (repeticiones de secuencias simples= SSR loci) para caracterizar y discriminar entre dos taxones estrechamente relacionados en el norte y centro de Italia: *Q. petraea* (Mat.) Liebl. y *Q. pubescens* Willd. Los resultados sugieren que las características micromorfológicas son las más efectivas para discriminar entre *Q. petraea* y *Q. pubescens* (Bruschi *et al.*, 2000). Más recientemente, en Chiapas, México, un estudio sobre variación genética y morfológica de 11 especies de *Quercus* presentes a través del análisis de 18 caracteres morfológicos foliares, ha demostrado que cinco caracteres morfológicos son los más

importantes para la discriminación de especies, además los caracteres morfológicos combinados pueden ser considerados como caracteres especie-específicos, lo que resulta útil para la discriminación de las especies estudiadas. Respecto a la variación genética se demuestra que el gen MatK es el recomendado para separar las especies (Ruíz-Domínguez, 2016).

## IV. OBJETIVOS

### 4.1. General

Determinar el nivel de diferenciación morfológica y genética de las especies de *Quercus* en el predio Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas (México).

### 4.2. Específicos

**4.2.1.** Diferenciar las especies de *Quercus* con base en características morfológicas y morfométricas foliares.

**4.2.2.** Amplificar secuencias de ADN de cloroplasto (MatK y tRNL) y ADN ribosomal (ITS1-2 e ITS 3-4) de especies de *Quercus* y compararlas con las almacenadas en el *National Center for Biotechnology Information* (GenBank NCBI).

**4.2.3.** Determinar el nivel de diferenciación genética de especies de *Quercus* mediante la comparación de secuencias de ADN de cloroplasto (MatK) y ADN ribosomal (ITS1-2 e ITS 3-4).

**4.2.4.** Establecer las relaciones filogenéticas entre las especies de *Quercus* con base en las secuencias de ADN de cloroplasto (MatK y tRNL) y ADN ribosomal nuclear (ITS1-2 e ITS 3-4).

**4.2.5.** Reconocer el estado de conservación actual e importancia ecología de las especies de *Quercus* analizadas para el predio.

## V. ZONA DE ESTUDIO

El estudio se realizó Los Ocotones, un predio con una superficie de 1 373 ha, localizado en el Municipio de Cintalapa de Figueroa, en el estado de Chiapas, al sur de México ( $16^{\circ} 47' 31.09''$  y  $16^{\circ} 47' 48.97''$  latitud N,  $94^{\circ} 01' 29.53''$  y  $94^{\circ} 02' 4.43''$  longitud W) Plan Maestro Los Ocotones (PMLO, 2013), a 36 km hacia el noroeste de la cabecera municipal de Cintalapa. La elevación en el sitio varía de 800 a 1 500 m.s.n.m., sin embargo, posee una altitud promedio de 1 080 m.s.n.m. (Figura 1). Los Ocotones forma parte del corredor biológico Chimalapas- Uxpanapa-El Ocote, y de la Región Terrestre Prioritaria “Selva Zoque-La Sepultura” (Arriaga *et al.*, 2000; PMLO, 2013; Caballero *et al.*, 2017).

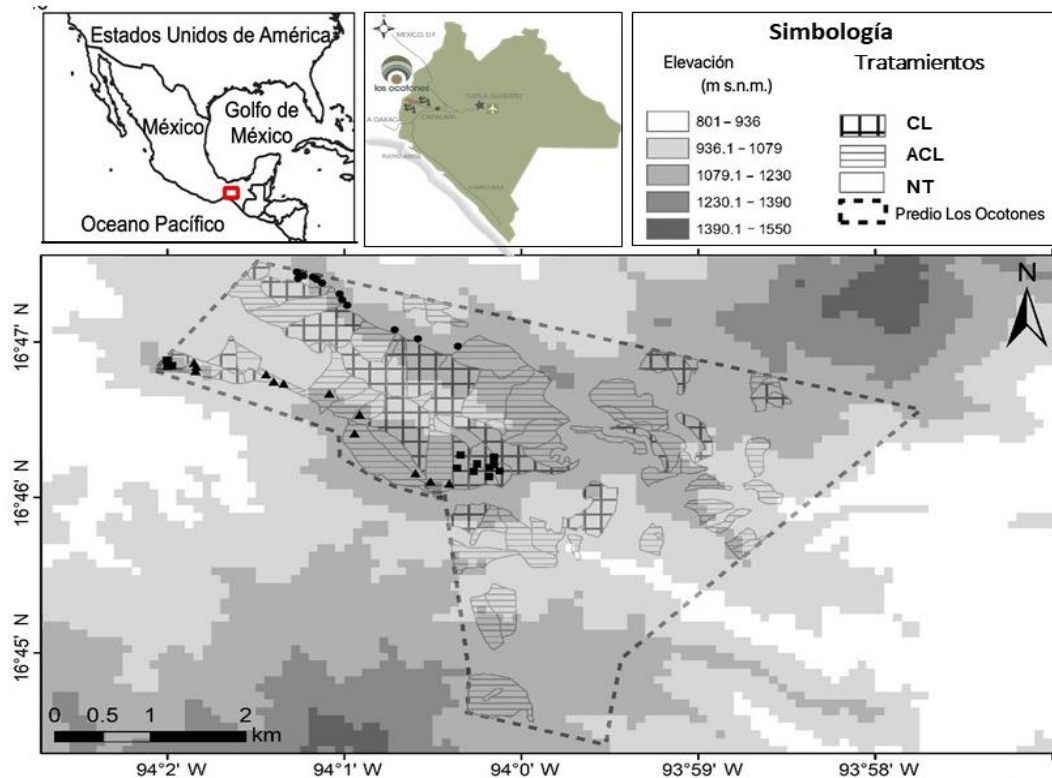


Figura 1. Localización del predio Los Ocotones, Municipio de Cintalapa de Figueroa, Chiapas, México. Zonificación del predio, de acuerdo con los tratamientos del manejo forestal = CL: Corta de liberación, ACL: Tratamiento aclareo, NT: Sin tratamiento. Puntos de Colecta= Triángulo: ACL, Cuadrado: CL y Círculo: NT. Elaborado por Derio A. Jiménez-López, a partir de Martínez-Meléndez *et al.* (2021).

El predio particular Los Ocotones se encuentra bajo manejo forestal sustentable desde el año 2003, y está certificado por la organización Rainforest Alliance por su manejo forestal sostenible; El plan de manejo incluye el aprovechamiento de árboles

maderables de *Pinus oocarpa*, *P. maximinoi* y en sus primeros años se contaba con el aprovechamiento y comercialización de carbón vegetal obtenido de encinos (*Quercus* spp.). Sin embargo, las carboneras con las que contaba el predio fueron derribados por un sismo en el 2017, por lo que desde entonces dejaron de aprovechar a los encinos (PMLO, 2013; Caballero *et al.*, 2017; Martínez-Meléndez *et al.*, 2021).

Los tratamientos principales del Método de desarrollo silvícola (MDS) son: Corta de liberación (CL), un tratamiento para liberar a los individuos menos deseables y así favorecer a las especies de árboles deseadas; Aclareos (ACL), un tratamiento para reducir la densidad de los árboles y con ello, mejorar el crecimiento, la salud del bosque o recuperar la mortalidad potencial; y áreas sin tratamiento silvícola (NT), es decir, áreas sin aprovechamiento forestal actual (PMLO, 2013).

### **5.1. Clima**

En general, el clima del predio es cálido-húmedo, con una temperatura media anual mayor a 22°C, siendo el mes más frío mayo con 18 °C, presenta lluvias en verano, el porcentaje de lluvia invernal va de 5 y 10.2%, con precipitación del mes más seco mayor a 60 mm. Cuenta con una oscilación anual de las temperaturas medias mensuales entre 5 y 7 °C, siendo el mes más caliente del año mayo (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática INEGI, 2000).

### **5.2. Geología y edafología**

El Predio bajo estudio se encuentra en rocas de la Era Paleozoica con clase Ígnea intrusiva del tipo granito (INEGI, 2000). De acuerdo al análisis de suelo realizado para el predio Los Ocotones por parte del laboratorio del Instituto tecnológico Agropecuario No. 23 de Oaxaca, en términos generales se trata de un suelo de textura arenoso franco, con un % de materia orgánica que va del 1.4 a 2.6, la textura y estructura permite un drenaje adecuado o que facilita la infiltración del agua hacia el subsuelo (Los Ocotones 2018). En el predio, se localizan los tipos de suelo Re+Bc+I/2/L, suelo primario: Regosol eútrico (Re), suelo secundario: Cambisol crómico (Bc), suelo terciario: Litosol (I). La clase textural es 2 (Media), y se refiere al contenido en la parte superficial del suelo (30 cm.) de partículas de diversos tamaños que en este caso corresponde con limo (INEGI, 2000; PMLO, 2013).

### 5.3. Tipos de vegetación

La vegetación en el predio es diversa, predominan el bosque de pino-encino, el bosque de encino-pino y el bosque tropical subcaducifolio (Rzedowski, 2006; PMLO, 2013). La vegetación primaria es bosque de pino encino, en la cual dominan las especies *Pinus maximinoi*, *P. oocarpa* (Breedlove, 1981; PMLO, 2013; Martínez-Meléndez *et al.*, 2021). Observaciones preliminares sugieren la presencia de *Quercus acutifolia* Née, *Q. calophylla* Née (antes *Q. candicans*; Valencia-Ávalos *et al.*, 2018), *Q. castanea* Née, *Q. crassifolia* Benth., *Q. crispifolia* Trel. *Q. dysophylla* Benth, *Q. elliptica* Née, *Q. glaucescens* Bonpl., *Q. peduncularis* Née, *Q. sapotifolia* Liebm., *Q. scytophylla* Liebm., y *Q. vicentensis* Trel. (Martínez-Meléndez y López-Santiago, 2019). Asimismo, se presume la presencia de *Q. corrugata* Hook. y *Q. skinnerii* Benth. (Martínez-Meléndez y López-Santiago, 2019).

## VI. MÉTODO

### 6.1. Muestreo de especies

Los muestreos se realizaron entre agosto de 2018 y abril de 2019. Se obtuvieron muestras foliares de 30 individuos adultos de las especies de encinos identificadas preliminarmente en campo (Martínez-Meléndez y López-Santiago, 2019), y de individuos con características distintas a los conocidos en la parte noroeste del predio forestal Los Ocotones, Cintalapa de Figueroa, Chiapas. Las muestras fueron recolectadas de árboles con una diámetro a la altura de pecho (DAP) >12.73 cm. En cada árbol muestreado, se colectaron cinco muestras con 10-15 hojas maduras, completas, sin herbivoría y sin marcas evidentes de plaga, dichas muestras fueron tomadas en ramas esparcidas de los mismos árboles.

Debido a que algunas especies no fueron abundantes en el predio, únicamente se colectaron hojas de un solo individuo, sin embargo, en otras especies se colectaron hasta tres individuos ya que estas fueron más abundantes. Asimismo, en algunas especies visualmente se notó una amplia variación intraespecífica, por lo cual se decidió colectar hojas de más individuos.

Las muestras de herbario fueron procesadas en el herbario institucional de El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Unidad San Cristóbal.

Para el análisis de marcadores moleculares, las muestras se obtuvieron de material recién colectado y con crecimiento reciente, por lo cual se obtuvieron los ápices de las ramas con hojas de rebrote u hojas nuevas, o bien con hojas maduras. Las muestras se almacenaron y etiquetaron en una bolsa de plástico hermética tipo ziploc. Las muestras fueron almacenadas en un congelador marca General Electric modelo FMC 9DTA WH, a -20 °C hasta su utilización en la extracción de ADN.

## **6.2. Identificación de especies con base en sus caracteres morfológicos y morfométricos foliares**

### **6.2.1. Identificación de las especies colectadas**

La identificación de las especies colectadas se realizó con apoyo de las bases de datos Trópicos (<https://www.tropicos.org>) y Plants of the World Online (POWO, 2022) (<http://www.plantsoftheworldonline.org/>). Asimismo, se revisaron las claves y guías de identificación de Valencia-Ávalos y Jiménez-Ramírez (1991), Sabás-Rosales *et al.*, (2015), y Valencia-Ávalos *et al.*, 2017).

Se hizo una breve descripción de los caracteres morfológicos foliares de las especies con base en la información de las claves y lo que se observó en los ejemplares colectados (Anexo 6). Se hicieron anotaciones de caracteres morfológicos atípicos respecto a los que se declaran en las descripciones formales de las especies.

### **6.2.2. Estimación de los caracteres morfométricos simples y combinados.**

De cada muestra herborizada se midieron los cinco caracteres morfométricos simples foliares más importantes para determinación de especies de *Quercus* de acuerdo con (Ruíz-Domínguez, 2016) (Cuadro 1, Figura 2), en 10 hojas colectadas de cada uno de los 30 individuos muestreados, esto con la ayuda de un calibrador milimétrico de carátula (vernier) marca Trupper con una precisión de 0.02 mm. A partir de los valores de los cinco caracteres morfométricos simples, se realizó la estimación de los cuatro caracteres morfométricos combinados (Cuadro 1), descritos por González-Rodríguez y Oyama (2005) mediante el software estadístico Microsoft Excel versión 2016.

Cuadro 1. Caracteres morfométricos foliares utilizados para discriminar entre especies de *Quercus*.  
Modificado de González-Rodríguez y Oyama (2005) y Ruíz-Domínguez (2016)

Caracteres morfométricos	Abreviación
<b>Simples</b>	
Largo de la lámina	(LL)
Largo del pecíolo	(LP)
Largo total de la hoja	(LTH)
Longitud de la base al ancho máximo	(LBAM)
Ancho máximo	(AM)
<b>Combinados</b>	
Largo de la lámina – Largo del pecíolo	(LL-LP)
Largo de la lámina / Ancho máximo	(LL/AM)
Largo del pecíolo * 100 / Largo total de la hoja	(LP*100/LTH)
Longitud de la base al ancho máximo * 100 / Largo total de la hoja	(LBAM*100/LTH)

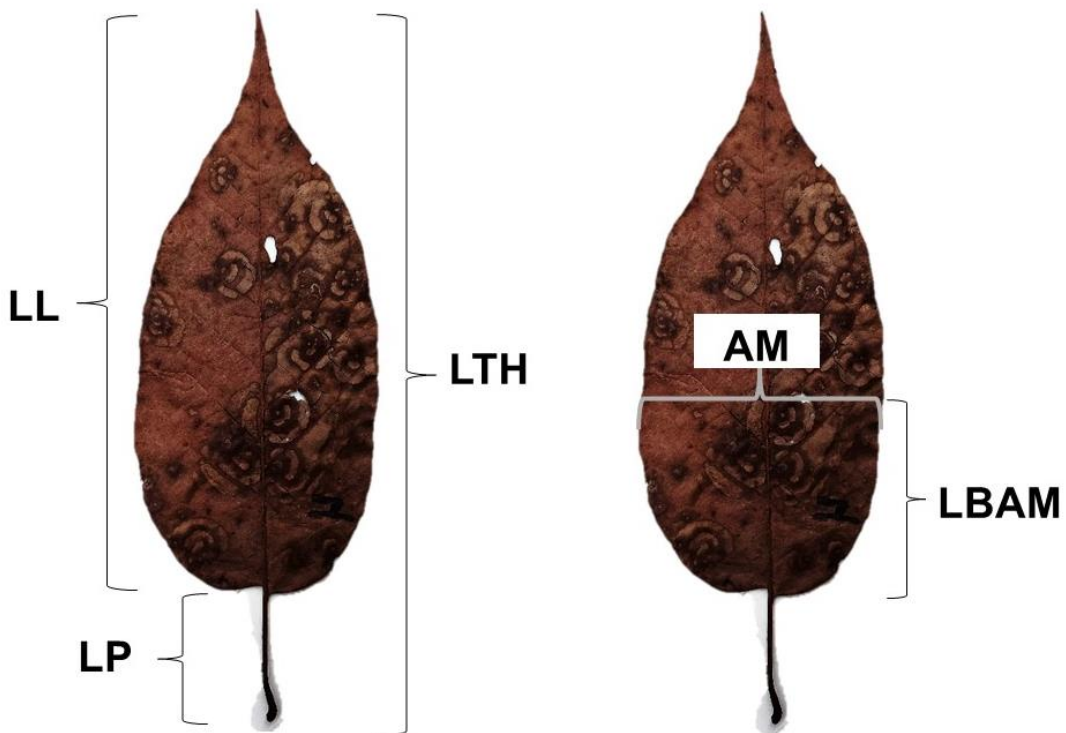


Figura 2. Caracteres morfométricos simples foliares medidos en 10 hojas colectadas de cada uno de los 30 individuos muestreados de las especies de *Quercus*, presentes en el predio Los Ocotones

### **6.2.3. Análisis de medidas de dispersión (medias estadísticas)**

Se obtuvieron los estadísticos descriptivos: media aritmética, desviación estándar y coeficiente de variación, de los nueve rasgos morfométricos foliares para discriminar entre especies de *Quercus* (González-Rodríguez y Oyama 2005; Ruíz-Domínguez, 2016), con el fin de evaluar la variación morfológica. Se obtuvieron los estadísticos descriptivos para 30 individuos colectados, sin embargo, debido al traslape de los valores intra especie, se procedió a obtener el promedio (media aritmética) de los individuos de cada especie. Este segundo análisis indicó una amplia variación morfológica dentro de las 13 entidades taxonómicas, no obstante, la diferencia entre ellas fue estadísticamente significativo con un nivel de confianza del 95.0%. Dicho análisis se realizó mediante las funciones del software estadístico Microsoft Excel versión 2016.

Los datos se presentan mediante diagramas de caja y bigote (box-plot). Las especies fueron ordenadas de acuerdo a la sección que corresponden (*Lobatae* o *Quercus*), y seguido se ordenaron de mayor a menor de acuerdo con el valor de su media aritmética. Los diagramas de caja y bigote se realizaron con el software estadístico STATGRAPHICS (StatPoint Technologies Inc., 1982-2012).

### **6.2.4. Análisis de componentes principales.**

El análisis de componente principales se realizó para reconocer la variable morfológica que influye mayormente en la variación morfológica descrita con las características de la hoja. En este análisis se utilizaron los valores medidos en 10 hojas de 30 individuos en 13 especies de *Quercus*. El análisis se realizó con software estadístico STATGRAPHICS (StatPoint Technologies Inc., 1982-2012).

### **6.2.5. Análisis discriminante (AD)**

Es un método estadístico usado principalmente para la clasificación de individuos o unidades experimentales en dos o más grupos definidos de manera única, representando gráficamente la dispersión del conjunto de datos. Se utilizaron a los caracteres para la discriminación de especies evaluando variable por variable; Para el análisis se introdujo un valor de tolerancia de 0.001, y una  $P < 0.05$ , con la finalidad de establecer un nivel de confianza. Para desarrollar el modelo discriminante entre los 13



taxa, se analizaron 10 hojas por individuo (30 individuos), y 9 variables predictivas; Sin embargo, debido a los resultados obtenidos, se procedió a realizar un análisis discriminante a partir de la media aritmética de los datos morfométricos de las 10 hojas por cada árbol, tomando de esta manera a cada árbol como individuo para el análisis. Dichos análisis se realizaron mediante el software estadístico STATGRAPHICS (StatPoint Technologies Inc., 1982-2012).

### **6.3. Identificación de especies con base en datos genéticos**

#### **6.3.1. Extracción de Ácido Desoxirribonucleico (ADN)**

Las extracciones de las muestras se realizaron utilizando dos protocolos Kit de extracción de ADN: kit comercial DNeasy Plant Mini Kit de la marca QUIAGEN® y método de extracción modificado CTAB 2X (Doyle y Doyle, 1987). Las extracciones de ADN obtenidas con el kit comercial DNeasy Plant Mini Kit (marca Quiagen®), fueron de baja concentración y así también la integridad del ADN se observó degradado, por lo cual dicho ADN no se consideró aceptable para la amplificación de los marcadores (Matk, tRNL e ITS). De esta manera, las extracciones de ADN presentadas en los resultados se realizaron siguiendo el método de extracción CTAB 2X (Doyle y Doyle, 1987), modificado por el laboratorio de genética de El Colegio de La Frontera Sur ECOSUR para hojas de *Quercus* (Anexo 2).

#### **6.3.2. Cuantificación de ADN**

Se realizó en el espectrofotómetro Nanodrop 2000 de la marca *Thermo Scientific®*, agregando 1 µl de cada muestra. La pureza de la muestra está relacionada con el valor de máxima absorbancia de los ácidos nucleicos detectada a una longitud de onda de 260 nm. La relación de las absorbancias A260/A280 permite conocer si el ADN obtenido está contaminado por la presencia de compuestos secundarios, ya que estos absorben a una longitud de onda de 280 nm. Esta relación es estable y en general se considera que el ADN es de calidad óptima cuando la relación A260/A280 es mayor de 1.8; sin embargo, una relación A260/A280 mayor de 2.1 es indicativa de una presencia de ARN en la muestra. Por el contrario, si esta relación es baja (A260/A280 menor a 1.6) la muestra está contaminada por proteínas y fenoles. En el caso de

contaminación por proteínas o fenoles será necesario llevar a cabo un tratamiento adicional para eliminarlas de la solución de ADN (Red Nacional de Biobancos, 2011).

### 6.3.3. Visualización de ADN

Para evaluar presencia y calidad del ADN extraído de las muestras se realizó una visualización mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % (P/V) en *buffer* TAE 1X, teñido con bromuro de etidio (bromuro de 3,8 diamino -6-etil-5- fenilfenantridio) (Anexo 3), el cual es un colorante fluorescente y cancerígeno (Valadez y Kahl, 2000) y visualizado con luz ultravioleta; Las muestras íntegras presentan una banda de ADN única perfectamente definida en la parte superior del gel de agarosa. Una muestra de ADN degradada presenta una estela o “*smear*” a lo largo del gel, la cual es más pronunciada cuanto mayor sea la degradación de la muestra (Red Nacional de Biobancos, 2011), o bien, se puede observar dicha estela también es debida a las impurezas que no pudieron ser limpiadas con el método de extracción debido a la gran cantidad de componentes como proteínas y metabolitos secundarios presentes en las muestras (Figura 3). En cada pozo se cargaron 4µl de ADN y 2µl del colorante marcador *Blue orange*, y el corrimiento del gel fue de 30-40 min a un voltaje constante de 86V. La imagen fue captada por un fotodocumentador marca KODAK® modelo ESDAS 290, conectado a una computadora, en donde con ayuda del software se editaron y almacenaron.

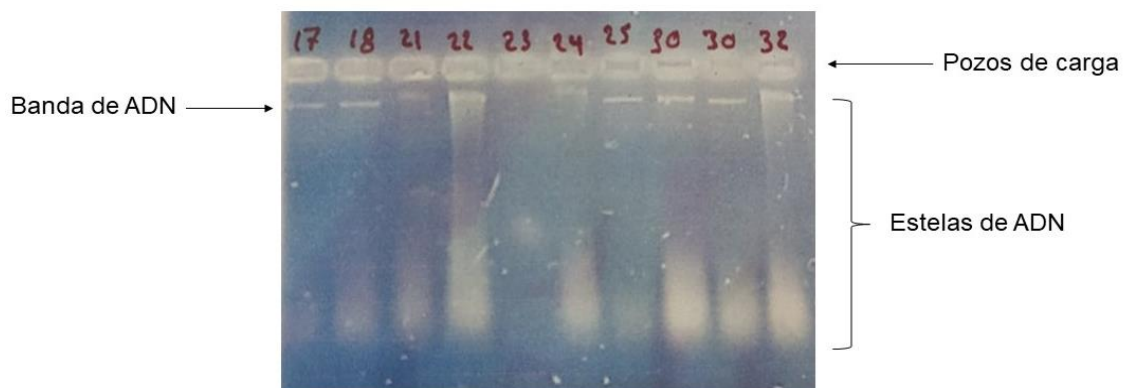


Figura 3. Visualización de muestras de ADN en gel de agarosa al 1%, de algunos individuos de *Quercus* presentes en el predio Los Ocotones

#### 6.3.4. Amplificación y secuenciación

La amplificación de ADN se realizó con la ayuda de un termociclador de punto final modelo T100 *Thermal Cycler* de la marca BIO-RAD®, mediante una reacción en cadena de polimerasa (PCR por sus siglas en inglés). Se siguió la técnica modificada de Erlich y Arnheim (1992).

Las reacciones se realizaron con el kit comercial PCR Master Mix, compuesta por una mezcla de solución *Master Mix* de PROMEGA® y agua libre de nucleasas (Nuclease-Free Water). Cada reacción incluyó 2 µl de ADN de cada muestra, 12 µl de solución Green Master Mix, 10 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl de cada primer (forward y reverse), dando un volumen final de 26 µl. Los productos de amplificación de las secuencias fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa 2 % (P/V) en buffer TAE 1X, teñido con bromuro de etidio (bromuro de 3,8 diamino -6-etil-5- fenilfenantridio) (Anexo 4). Utilizando un tampón de carga de 3 µl de ADN, 2 µl del colorante marcador (Blue orange), y 2 µl de ladder 100 BP (BP, pares de bases por sus siglas en inglés), en un tiempo de corrimiento aproximado de 35 min a 89 volts (Figura 4).

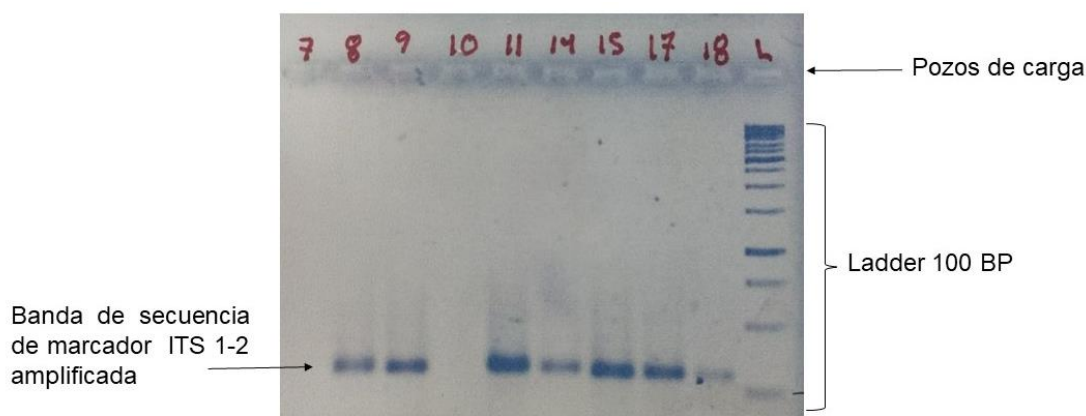


Figura 4. Visualización de productos de amplificación de las secuencias ITS 1-2 en gel de agarosa al 2% de algunos individuos de *Quercus* del predio Los Ocotones

### **6.3.5. Marcadores ribosomales nucleares ITS 1-2 e ITS 3-4 (espaciadores transcritos internos por sus siglas en inglés).**

Se utilizaron dos oligonucleótidos (*primers* en inglés): El espaciador transcrito interno ITS 1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) -2 (GCTGCGTTCTTCATCGATGC) (Anexo 5), y el espaciador transcrito interno ITS 3 (GCATCGATGAAGAACGCAGC) -4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (Anexo 5), ambos diseñados por White *et al.* (1990), los cuales, a pesar de haber sido diseñados inicialmente para realizar filogenias en hongos, son utilizados también en plantas, ya que ambos pertenecen a una región del ADN nuclear, por lo que su herencia es biparental y casi universal para plantas (Álvarez y Wendel, 2003). Las condiciones estándares de amplificación de ambos ITS fueron: temperatura de desnaturalización de 95°C por 3 min, seguido de 35 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 95°C por 30 segundos, un alineamiento (temperatura específica para que se adhiriera el primer a la cadena sencilla de ADN) de 57°C para el ITS 1-2 y de 52°C para el ITS 3-4, por 30 segundos y una extensión de 72°C por 2 min. La extensión final fue de 72°C por 10 min (Anexo 5).

Aunque el producto de PCR obtenido en la primera amplificación fue de buena calidad, el ADN de 20 secuencias para el gen ITS 1-2 y otras 20 secuencias para el ITS 3-4 (40 secuencias), resultó con características que generaron duda, por lo cual, todo el lote se trabajó nuevamente desde la amplificación, y se envió nuevamente a purificar y secuenciar por segunda vez.

### **6.3.6. Marcador molecular cloroplástico Maturase K (MatK)**

Debido que no se logró amplificar la región de cloroplasto MatK con el oligonucleótido utilizado al comienzo White *et al.*, (1990), este se sustituyó por el oligonucleótido cloroplástico Maturase K (MatK) diseñado por Yang *et al.* (2017), para robles chinos, (ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGGTTC) (CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG). Las condiciones estándares de amplificación de MatK fueron: temperatura de desnaturalización de 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos, con una temperatura de desnaturalización de 94°C por 1 min, un alineamiento de 55°C por 1 min y una extensión de 72°C por 2 min. La extensión final fue de 72°C por 7 min (Anexo 5).

### **6.3.7. Marcador molecular cloroplástico CD\_CD (tRNL)**

Así también se agregó al análisis genético el marcador molecular cloroplástico CD\_CD (tRNL), diseñado por Yang *et al.* (2017), para robles chinos. C (CTTGACAGGGCGGTGCTCT) –D (TAATGGGGACGGACTGTAAAT) (Anexo 5). Las condiciones estándares de amplificación de CD\_CD fueron: temperatura de desnaturalización de 94°C por 2 min, seguido de 30 ciclos, con una temperatura de desnaturalización de 94°C por 1 min, un alineamiento de 55°C por 1 min y una extensión de 72°C por 1 min. La extensión final fue de 72°C por 7 min (Anexo 5).

Posterior a su amplificación, un total de 110 muestras correspondientes a los cuatro marcadores moleculares se mandaron a purificar y secuenciar a la empresa MacroGen Inc®, en Seúl, Corea (Cuadro 6). La secuenciación se realizó mediante electroforesis capilar (Sanger®), utilizando el kit de secuenciación ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kits y el secuenciador ABI PRISM 3730XL Analyzer (96 capillary type).

### **6.3.8. Revisión, corrección y alineación de secuencias de marcadores moleculares**

Mediante la revisión visual de cromatogramas a través del programa Chromas v. 2.4.4 (McCarthy 1998- 2016), se revisó que las secuencias amplificadas mostraran características aceptables de ciertos parámetros, tales como bases nucleotídicas reconocidas de acuerdo a la señal que éstas emiten, así como la no presencia de picos (señal de bases) dobles a lo largo de las secuencias.

El posterior alineamiento de las secuencias aceptables se realizó mediante el programa Clustal\_X v. 2.1 (Thompson *et al.*, 1997), durante este proceso se revisó que las secuencias fueran lo más homogéneas posible, es decir, sin numerosas y amplias regiones de huecos (*gaps*) y/o dificultades para reconocer la base presente; En dichos casos se procedió a realizar una nueva revisión de los cromatogramas para disminuir el sesgo debido a deficiencias en la secuenciación. Para todas las secuencias se eliminaron un aproximado de 20 bases al inicio, ya que al comienzo de las secuencias presentan notorias irregularidades, así también se eliminó una cantidad variable al final de las mismas (entre 100 y 700 pb), y se cuidó mantener las secuencias con una longitud acorde al diseño de los marcadores moleculares (Anexo 5).

#### **6.4. Análisis de identidad de secuencias de ADN**

Luego de que las secuencias fueron editadas mediante el programa Chromas v. 2.4.4 (McCarthy 1998- 2016), cada secuencia fue comparada de manera individual mediante un *Blast* con las colecciones de nucleótidos de la base internacional GenBank NCBI (*National Center for Biotechnology Information* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para contrastar el porcentaje de correspondencia al género *Quercus*, y así también comparar la identidad de las secuencias amplificadas con las especies registradas en la base.

#### **6.5. Filogenia molecular**

Los parámetros de diversidad genética de las especies analizadas se obtuvieron mediante el programa DnaSP Versión 5.0 (Librado y Rozas, 2009). A partir de las secuencias alineadas se realizó un análisis de parsimonia y una reconstrucción filogenética a través de un análisis de similitud entre secuencias mediante el algoritmo Neighbor-Joining (NJ) o vecino más cercano, y la confiabilidad de los nodos se determinó a través de una prueba de bootstrap con 1000 repeticiones. También se obtuvieron las distancias genéticas, utilizando el modelo de sustitución de Kimura 2-parámetros (Kimura, 1980; Martínez-Castilla, 2007). Estos análisis se llevaron a cabo mediante el programa PAUP versión 4.0 (Swofford y Bell, 2017).

Los árboles de Neighbor-Joining de los marcadores moleculares cloroplásticos Maturase K (MatK) y CD\_CD (tRNL), fueron elaborados a partir de 26 y 25 secuencias amplificadas respectivamente. No se presentan análisis individuales de los marcadores moleculares ribosomales nucleares ITS 1-2 e ITS 3-4, debido a que el análisis de filogenia molecular por separado no logró encontrar diferencias significativas para separar a los taxones analizados. La concatenación (unión) de 22 secuencias de los marcadores moleculares cloroplásticos Maturase K (MatK) y CD\_CD (tRNL) y de 21 secuencias pares de los marcadores moleculares ribosomales ITS 1-2, e ITS 3-4 fueron utilizadas para generar 2 árboles de Neighbor-Joining (en ambos casos disminuyó el número de secuencias utilizadas debido a no se tuvieron ambas secuencias para todas las muestras, Anexos 7-10).

## VII. RESULTADOS

### 7.1. Diferenciación de las especies de *Quercus* presentes en el predio Los Ocotones, con base en características morfológicas y morfométricas foliares

#### 7.1.1. Variación morfológica

Se identificaron y se describieron a 10 especies de *Quercus* presentes en el predio Los Ocotones (Figura 5 A-M, Anexo 6), seis especies pertenecen a la sección *Lobatae* (encinos rojos): *Q. acutifolia* Née. (Figura 5 A y B), *Q. calophylla* Trel. (antes *Q. candicans*; Valencia-Ávalos *et al.*, 2018) (Figura 5 C y D); *Q. elliptica* Née. (Figura 5 E), *Q. rubramenta* Trel. (Figura 5 I), *Q. sapotifolia* Liebm. (Figura 5 J), *Q. scytophylla* Liebm (Figura 5 K), y cuatro especies a la sección *Quercus* (encinos blancos): *Q. glabrescens* Benth. (Figura 5 F); *Q. glaucescens* Humb. (Figura 5 G); *Q. peduncularis* Née. (Figura 5 H); y *Q. vicentensis* Trel. (Figura 5 L); Por su parte, *Quercus calophylla* (Figura 5 A y B) y *Q. acutifolia* (Figura 5 C y D), presentaron dos morfotipos, que, debido a sus características diferenciadas entre sí, se separaron y analizaron como dos morfoespecies para cada caso (mfsp.1 y mfsp.2 respectivamente). Asimismo, se reconoce un posible individuo híbrido: *Q. peduncularis* x *glaucescens* (Figura 5 M). Los dos morfotipos y el híbrido se tomaron como unidades taxonómicas operativas (taxa) adicionales a las 10 especies formalmente reconocidas (Figura 5 A-M).

#### 7.1.2. Variación morfométrica

La variación morfométrica fue distinta para cada entidad taxonómica y para cada característica analizada, por lo cual, el orden de jerarquía es diferente en cada análisis (Figura 6 A-I). *Q. rubramenta* presentó el mayor largo de lámina (LL) y *Q. glabrescens* el menor (Cuadro 2). Respecto al largo del pecíolo (LP), *Q. rubramenta* presentó los valores más altos, y *Q. peduncularis* presentó los valores más bajos (Cuadro 2). Así también *Q. rubramenta* presentó el mayor largo total de la hoja (LTH), pero *Q. elliptica* el menor (Cuadro 2). Respecto al ancho máximo (AM), *Q. calophylla* mfsp.1 presentó las hojas más anchas y *Q. acutifolia* mfsp.2 las de menor ancho (Cuadro 2). Por último, *Q. glaucescens* presentó la mayor longitud de la base al ancho máximo

(LBAM), y por el contrario, *Q. glabrescens* presentó la menor longitud (Cuadro 2, Figuras 5 A-M y 6 A-I).

El análisis de medidas de dispersión (medias estadísticas) de las nueve variables morfométricas indicó una amplia variación morfológica dentro de las 13 entidades taxonómicas, sin embargo, la diferencia entre estas es estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95.0% (Cuadro 2, Figura 6 A-I). La separación de especies dentro de la sección que corresponden (*Lobatae* o *Quercus*) no permite diferenciarlas entre sí (Cuadro 2, Figura 6 A-I). La amplia variación morfológica por cada especie se ve reflejada en la heterogeneidad e inconsistencia en el orden jerárquico observado dentro de los gráficos (Figura 6 A-I), así como en la extensión de los bigotes superior e inferior de las cajas, así como en los valores atípicos (representados con puntos) por encima y por debajo de los extremos de los bigotes, lo cual provocó traslapes en las nueve variables morfométricas analizadas, no obstante, resultaron más notables en (LBAM) y (LL/AM) (Figura 6 A-I, Cuadro 2). Las diferencias estadísticas en análisis morfométricos individuales fueron pronunciadas en las especies que se encuentran en los extremos y sutiles entre las especies dentro de los intervalos, un ejemplo del primer caso es la evidente diferencia entre las especies de la misma sección en el carácter LP\*100/ LTH y como ejemplo del segundo caso, la poca/nula diferencia en el tamaño de Largo de Pecíolo (LP) para ocho de las 13 entidades taxonómicas analizadas (Figura 6 B).

El coeficiente de variación de las 13 unidades taxonómicas osciló entre 7 % y 51 % (Cuadro 2, Figura 6 A-I). De manera particular, *Q. calophylla* mfsp.1 presentó el mayor coeficiente de variación para (LL) y (LL/AM), *Q. calophylla* mfsp.2 el mayor coeficiente de variación para (AM), *Q. glaucescens* el mayor coeficiente de variación para (LL-LBAM), (LP\*100/LTH) y (LBAM\*100/LTH), *Q. sapotifolia* el mayor coeficiente de variación para (LP) y (LTH) y *Q. scytophylla* presentó el mayor coeficiente de variación para (LBAM) (Cuadro 2, Figura 6 A-I). Por otra parte, *Q. elliptica* presentó el menor coeficiente de variación para (LL-LBAM), *Q. rubramenta* el menor coeficiente de variación para (LL), (LP), (LTH), (AM) y (LP\*100/LTH), *Q. scytophylla* el menor coeficiente de variación para (LL/AM) y, por último, el híbrido presentó el menor coeficiente de variación para (LBAM) y (LBAM\*100/ LTH) (Cuadro 2, Figura 6 A-I).



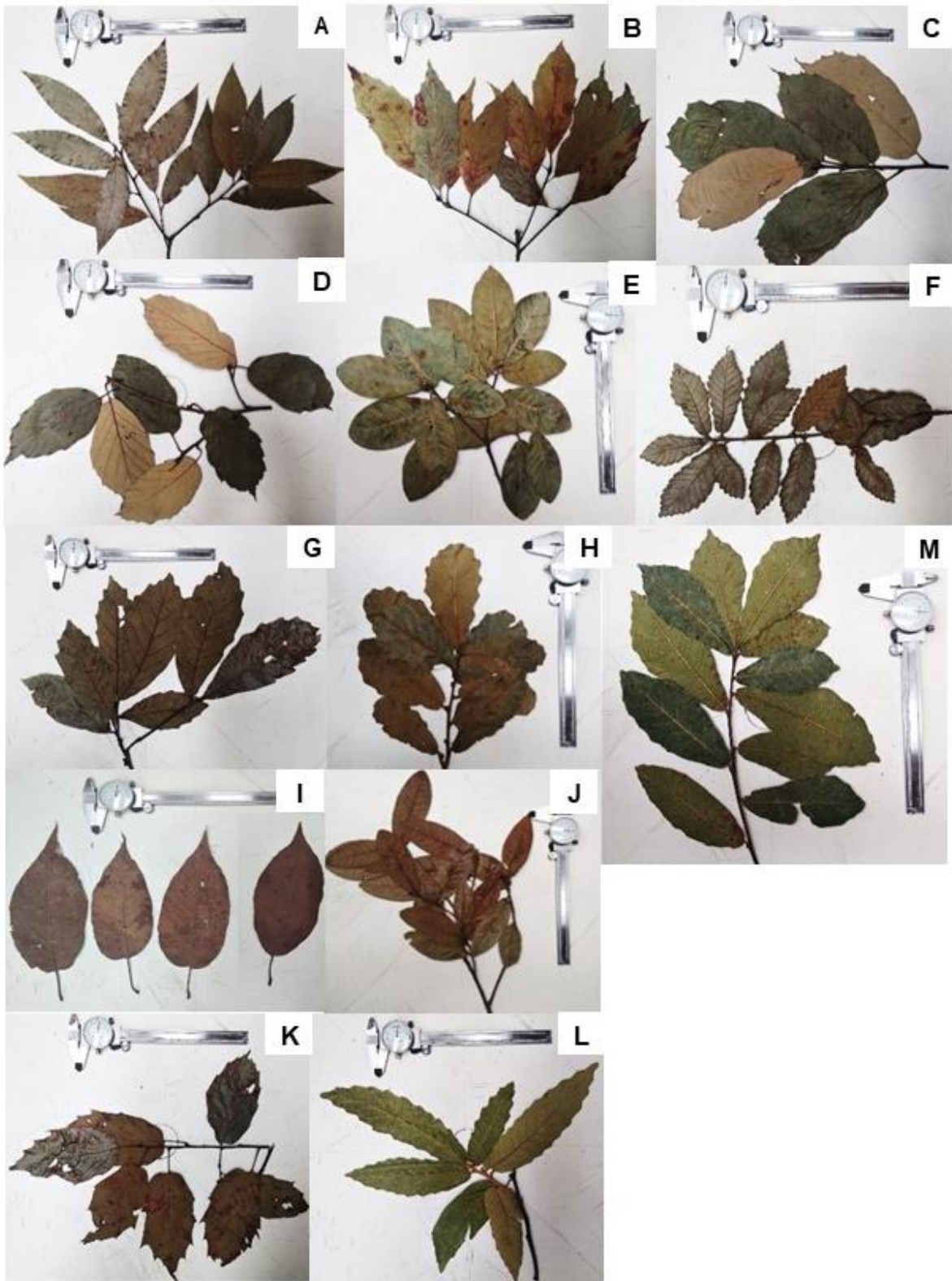


Figura 5. Variación morfológica del género *Quercus* en el predio Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas.

**A-** *Q. acutifolia* mfsp.1; **B-** *Q. acutifolia* mfsp.2; **C-** *Q. calophylla* mfsp.1; **D-** *Q. calophylla* mfsp. 2;  
**E-** *Q. elliptica*; **F-** *Q. glabrescens*; **G-** *Q. glaucescens*; **H-** *Q. peduncularis*; **I-** *Q. rubramenta*;  
**J-** *Q. sapotifolia*; **K-** *Q. scytophylla*; **L-** *Q. vicentensis*; **M-** *Q. híbrido* (*Q. glaucescens* x *peduncularis*).

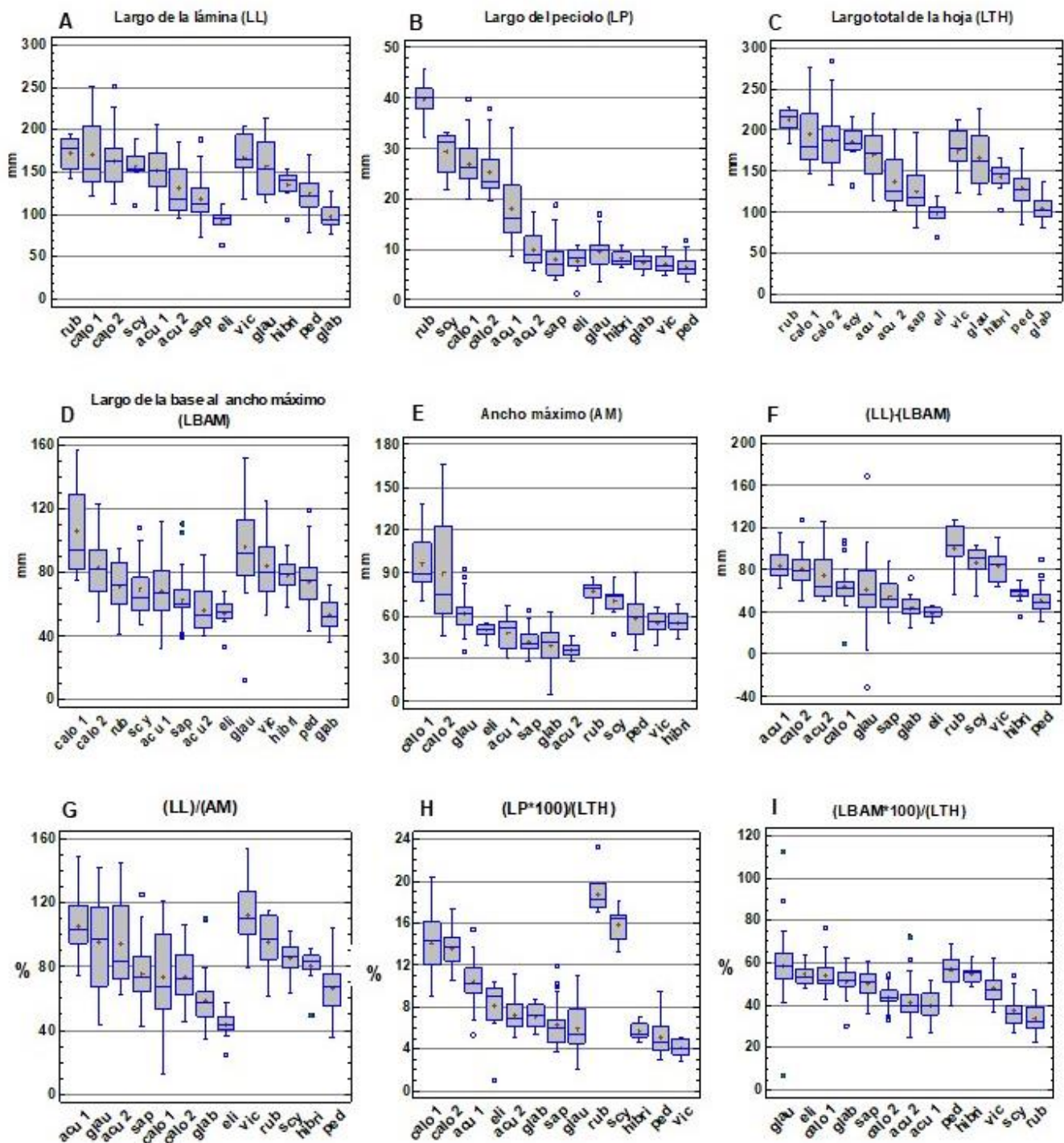


Figura 6. Diagramas de cajas y bigotes (Box-plot) de los nueve caracteres morfométricos analizados en las 13 unidades taxonómicas operativas (taxa) presentes en el predio Los Ocotones. (acu 1) *Q. acutifolia* mfsp.1; (acu 2) *Q. acutifolia* mfsp.2; (calo 1) *Q. calophylla* mfsp.1; (calo 1) *Q. calophylla* mfsp.2; (eli) *Q. elliptica*; (glab) *Q. glabrescens*; (glau) *Q. glaucescens*; (ped) *Q. peduncularis*; (rub) *Q. rubramenta*; (sap) *Q. sapotifolia*; (scy) *Q. scytophylla*; (vic) *Q. vicentensis*; (hibri) *Q. híbrido (Q. glaucescens x peduncularis)*

Cuadro 2. Medias aritméticas y desviaciones estándar de 9 caracteres morfológicos y 4 caracteres combinados de los 30 individuos.

\*, valores mínimos; \*\*, valores máximos. En rojo están los coeficientes de variación menor y mayor

CARACTERES MORFOLÓGICOS ESPECIES	Largo de la lámina (LL)			Largo del peciolo (LP)			Largo total de la hoja (LTH)			Largo de la base al ancho máximo (LBAM)			Ancho máximo (AM)		
	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
<i>Q. acutifolia</i> mfsp.1	152.64	24.72	16.19%	18.05	5.88	32.56%	170.49	28.48	16.70%	68.59	19.24	28.05%	47.71	10.73	22.49%
<i>Q. acutifolia</i> mfsp.2	130.47	28.03	21.49%	10.06	3.27	32.49%	138.03	28.87	20.92%	55.90	12.79	22.88%	36.05 *	4.71	13.06%
<i>Q. calophylla</i> mfsp.1	170.39	39.84	23.38% **	27.04	5.19	19.19%	196.01	41.48	21.16%	105.72 **	28.46	26.92%	96.52 **	19.35	20.05%
<i>Q. calophylla</i> mfsp.2	163.49	31.12	19.03%	25.33	4.50	17.77%	188.43	34.09	18.09%	83.23	19.68	23.64%	89.92	34.46	38.32% **
<i>Q. elliptica</i>	93.18 *	12.98	13.93%	7.82	2.81	35.90%	99.47 *	13.92	14.00%	54.48	9.49	17.42%	49.63	5.02	10.11%
<i>Q. glabrescens</i>	97.64	13.47	13.79%	7.47	1.62	21.75%	104.67	14.47	13.82%	53.09 *	9.38	17.66%	38.91	12.80	32.90%
<i>Q. glaucescens</i>	156.71	30.44	19.43%	9.48	3.00	31.69%	165.87	30.32	18.28%	96.16	26.32	27.37%	61.30	11.68	19.37%
<i>Q. peduncularis</i>	124.44	20.66	16.60%	6.61 *	1.97	29.81%	130.68	21.21	16.23%	74.38	16.24	21.83%	58.61	13.90	23.72%
<i>Q. rubramenta</i>	172.17 **	19.31	11.22% *	39.73 **	3.85	9.68% *	212.51 **	14.92	7.02% *	71.60	16.44	22.95%	76.96	7.48	9.72% *
<i>Q. sapotifolia</i>	117.42	23.96	20.41%	8.11	3.95	48.73%**	125.44	27.08	21.58% **	62.85	14.28	22.72%	41.77	8.12	19.44%
<i>Q. scytophylla</i>	156.41	20.25	12.95%	29.35	4.23	14.41%	185.24	22.80	12.31%	69.79	20.32	29.12% **	71.07	11.04	15.53%
<i>Q. vicentensis</i>	167.16	27.66	16.54%	7.23	1.94	26.77%	174.79	28.03	16.04%	83.81	21.89	26.12%	55.09	8.20	14.88%
Híbrido <i>Q. glaucescens</i> x <i>glabrescens</i>	135.67	17.60	12.98%	8.19	1.52	18.59%	143.27	17.61	12.29%	78.22	12.14	15.52% *	55.29	7.41	13.40%

Cuadro 2. Continuación

CARACTERES MORFOLÓGICOS ESPECIES	Largo de la lámina (LL) – largo de la base al ancho máximo (LBAM)			Largo de la lámina (LL)/ ancho máximo (AM)			Largo del peciolo (LP) * 100/Largo total de la hoja (LTH)			Largo de la base al ancho máximo (LBAM) *100/ largo total de la hoja (LTH)		
	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación	Promedio	Desviación Estándar	Coefficiente de Variación
<i>Q. acutifolia</i> mfsp. 1	84.05 **	14.53	17.28%	104.93 **	16.53	15.76%	10.47	2.25	21.48%	39.88	7.31	18.34%
<i>Q. acutifolia</i> mfsp. 2	74.57	22.71	30.45%	94.42	25.74	27.26%	7.24	1.56	21.59%	41.38	9.57	23.14%
<i>Q. calophylla</i> mfsp. 1	64.67	21.69	33.54%	73.87	29.07	39.35% **	14.14	2.91	20.59%	53.82	7.87	14.62%
<i>Q. calophylla</i> mfsp. 2	80.26	15.94	19.86%	73.57	15.88	21.58%	13.54	1.52	11.24%	43.92	5.01	11.41%
<i>Q. elliptica</i>	38.70 *	5.67	14.65% *	43.56 *	9.07	20.83%	8.03	2.78	34.60%	54.66	5.45	9.97%
<i>Q. glabrescens</i>	44.54	10.67	23.95%	58.73	16.3	27.76%	7.12	1.13	15.87%	50.96	7.11	13.96%
<i>Q. glaucescens</i>	60.56	30.63	50.58% **	95.42	27.6	28.93%	5.93	2.23	37.61% **	58.62 **	14.91	25.43% **
<i>Q. peduncularis</i>	50.06	10.98	21.93%	65.83	14.46	21.97%	5.12	1.57	30.68%	56.71	6.59	11.62%
<i>Q. rubramenta</i>	100.57	23.51	23.38%	95.21	19.4	20.37%	18.73 **	1.84	9.82% *	33.60 *	7.28	21.68%
<i>Q. sapotifolia</i>	54.58	14.40	26.38%	75.65	17.88	23.63%	6.27	2.05	32.65%	50.44	6.44	12.76%
<i>Q. scytophylla</i>	86.63	17.29	19.96%	85.34	10.31	12.08% *	15.88	1.61	10.16%	37.47	8.60	22.96%
<i>Q. vicentensis</i>	83.36	14.87	17.84%	112.07	23.07	20.58%	4.14 *	0.84	20.41%	47.60	7.26	15.25%
Híbrido <i>Q. glaucescens</i> x <i>glabrescens</i>	57.45	9.78	17.02%	80.37	12.02	14.96%	5.73	0.87	15.19%	54.55	4.14	7.59% *

### 7.1.2.1. Análisis de componentes principales

Los tres primeros componentes proporcionan el mayor peso en la discriminación de los caracteres morfométricos, capturando entre ellos el 93.9% de la variación (Figura 7, Cuadro 3). El primer componente concentró 52.4% de la variación morfológica, en él, la mayoría de los caracteres se correlacionaron positivamente, excepto  $(LBAM*100)/(LTH)$ , para este componente el carácter que más aportó a la variación fue Largo total de la hoja (LTH) (0.451704) (Cuadro 3). El componente 2 comprendió el 23.5% de la variación, en él, la mitad de los caracteres se correlacionaron negativamente y para este componente el carácter que más contribuyó fue  $(LBAM*100)/(LTH)$  (0.634621) (Cuadro 3). El componente 3 concentró 18.03% de la variación, y para este componente el carácter que más contribuyó fue  $(LL/AM)$  (0.561893) (Cuadro 3).

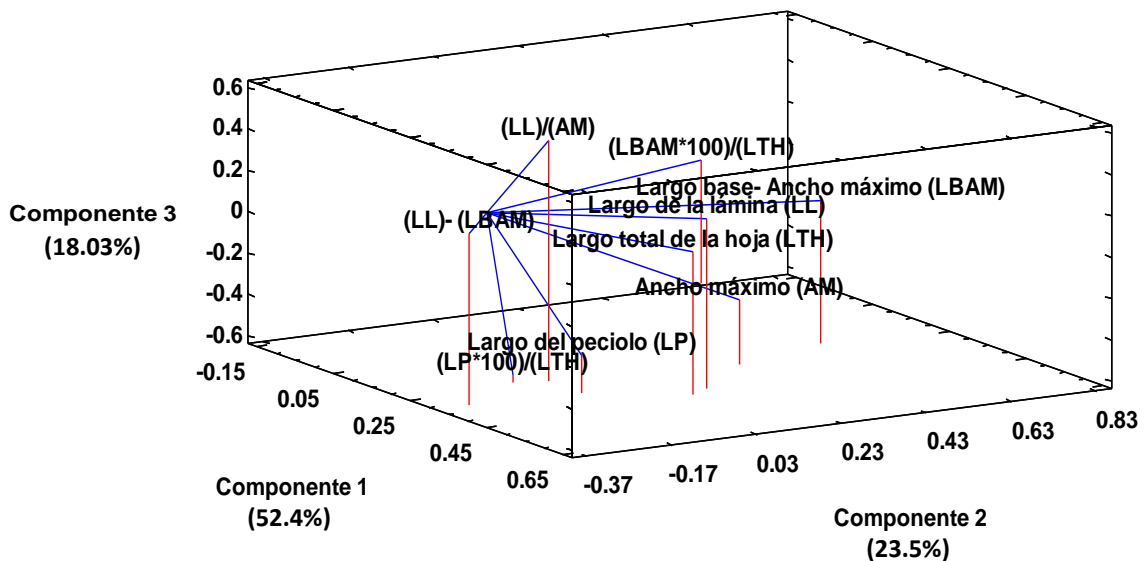


Figura 7. Componentes principales con base en nueve caracteres morfométricos de 13 taxa de *Quercus* del predio Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas

Cuadro 3. Análisis de los seis componentes principales y pesos de los componentes de los nueve caracteres morfométricos foliares utilizados para discriminar entre especies de *Quercus*, en el predio Los Ocotones. \*\* Caracteres foliares que mejor separan a las especies

<b>CARACTERES MORFOMÉTRICOS</b>	<b>Componente 1</b>	<b>Componente 2</b>	<b>Componente 3</b>
<b>SIMPLES</b>			
Largo de la lámina (LL)	0.432077	0.128664	0.221644
Largo del pecíolo (LP)	0.369802	-0.10827	-0.418981
Largo total de la hoja (LTH)	0.451704**	0.0789219	0.0852861
Largo base- Ancho máximo (LBAM)	0.268552	0.544961	0.0917616
Ancho máximo (AM)	0.32513	0.302416	-0.286862
<b>COMBINADOS</b>			
(LL)- (LBAM)	0.353387	-0.361907	0.22749
(LL) /(AM)	0.279695	-0.106345	0.561893**
(LP*100) /(LTH)	0.266938	-0.178958	-0.556654
(LBAM*100) /(LTH)	-0.142558	0.634621**	-0.00220523
<b>Eigen valor</b>	4.71566	2.11517	1.62255
<b>Porcentaje de Varianza</b>	52.396%	23.502%	18.028%
<b>Porcentaje de Varianza Acumulado</b>	52.396%	75.898%	93.926%

### 7.1.2.2. Análisis Discriminante (AD) utilizando las hojas de 30 individuos de las 13 especies colectadas.

De nueve funciones discriminantes, siete fueron estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ), las dos primeras funciones acumularon 68.06% y 13.75% (respectivamente) de la variación morfológica y entre ambas el 81.81%. La correlación canónica de la primera fue de 0.9326, y el valor de su Lambda de Wilks de 0.0129513 (Cuadro 4). Lo anterior es indicativo de que la primera función discriminante es capaz de separar mejor los grupos, que en este caso corresponde a 13 taxa.

Cuadro 4. Análisis discriminante de la variación morfológica foliar entre especies de *Quercus*. \*Valor de funciones con mayor peso en la discriminación de los taxa. \*\* Funciones discriminantes estadísticamente significativas

Función Discriminante	Eigen valor	Porcentaje Relativo	Correlación Canónica	Lambda de Wilks	Chi-Cuadrada	GL	Valor-P
1	<b>6.67717</b>	<b>68.06</b>	<b>0.9326*</b>	<b>0.0129513*</b>	<b>1295.275</b>	<b>108</b>	<b>0**</b>
2	<b>1.34927</b>	<b>13.75</b>	<b>0.75785*</b>	<b>0.0994293*</b>	<b>687.8761</b>	<b>88</b>	<b>0**</b>
3	0.720953	7.35	0.64725	0.233586	433.3535	70	0**
4	0.526663	5.37	0.58735	0.40199	271.5757	54	0**
5	0.292861	2.98	0.47594	0.613703	145.4967	40	0**
6	0.131461	1.34	0.34086	0.793433	68.9531	28	0**
7	0.102309	1.04	0.30465	0.897738	32.1473	18	0.0211**
8	0.0105252	0.11	0.10206	0.989584	3.1201	10	0.9785
9	0	0	0	1	0	4	1

El carácter morfológico que más influyó en función discriminante 1 es el largo del pecíolo (LP), ya que su Eigen valor fue de 0.968403. El carácter morfológico que más influyó en función discriminante 2, fue el Largo de la lámina/ Ancho máximo (LL)/(AM), ya que su Eigen valor fue de 6.13122 (Cuadro 5). Mediante estas dos primeras funciones discriminantes se separan escasamente las hojas de *Q. rubramenta*. Por su parte, las hojas de los demás taxa no pudieron ser separados claramente debido a su amplia dispersión y traslape entre ellas (Figura 8).

Cuadro 5. Coeficientes de la Función Discriminante de la variación morfológica foliar entre los 13 taxa de *Quercus*. \*caracteres morfométricos con mayor peso en la discriminación

Caracteres morfométricos	Funciones Discriminantes						
	1	2	3	4	5	6	7
<b>SIMPLES</b>							
largo de la lámina (LL)	<b>0.424582</b>	<b>-7.94906</b>	-3.53559	-3.89E+07	-11.5887	4.54869	10.2547
largo del pecíolo (LP)	<b>0.968403*</b>	<b>1.57837</b>	-1.58487	2.62E-07	1.08687	-1.87087	-1.39994
largo total de la hoja (LTH) (LBAM)	<b>-0.055283</b>	<b>-1.12704</b>	1.08726	-4.3963E-06	3.13254	4.72604	3.80543
Ancho máximo (AM)	<b>-0.537637</b>	<b>3.55386</b>	3.84967	2.65E+07	7.97173	-2.03902	-6.54149
<b>COMBINADOS</b>							
(LL)-(LBAM)	<b>0.306316</b>	<b>0.667041</b>	-2.62523	-4.73E+06	-2.6391	-0.550999	-0.966612
(LP*100)/(LTH)	<b>0.0461891</b>	<b>-1.19558</b>	1.32117	1.79E-07	-1.26269	1.33394	1.41837
(LBAM*100)/(LTH)	<b>-0.411859</b>	<b>-0.103714</b>	-0.564684	-1.96E-06	2.49715	2.64245	2.02025
(LL)/(AM)	<b>-1.01537</b>	<b>6.13122*</b>	5.82874	3.53E+07	11.0171	-3.39474	-8.08392

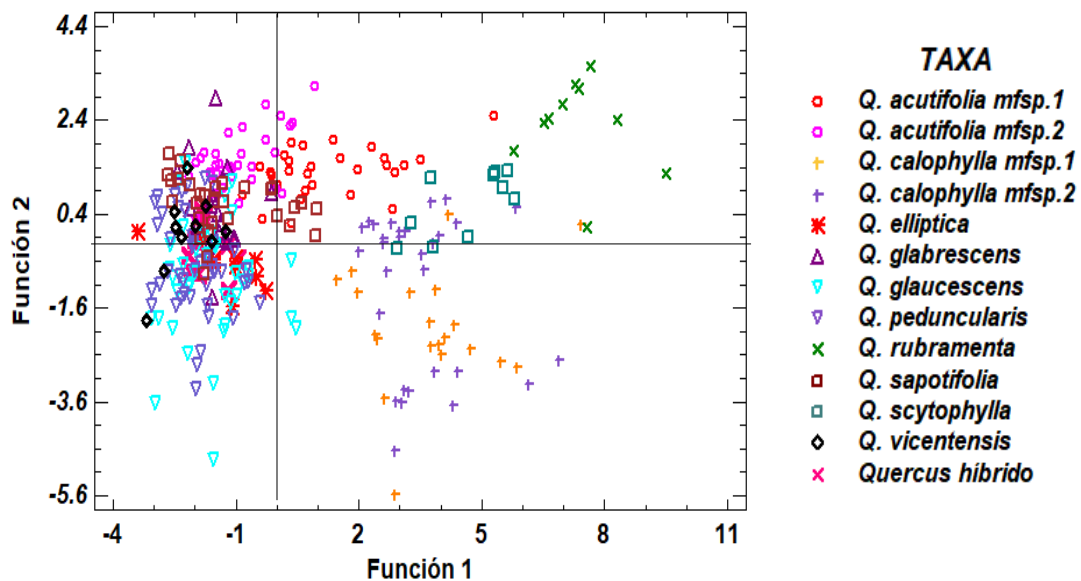


Figura 8. Funciones discriminantes con base en caracteres morfométricos de 10 hojas de 30 individuos correspondientes a 13 taxa de *Quercus* identificados en el predio Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas

### 7.1.2.3. Análisis Discriminante (AD) utilizando el promedio de las hojas por individuo (árbol) de las 13 especies colectadas

De nueve funciones discriminantes, dos fueron estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ). Estas dos primeras funciones acumularon 59.32% y 23.45% (respectivamente) de la variación morfométrica, y entre ambas el 82.77% (Cuadro 6). La correlación canónica de la primera fue de 0.98464, y el valor de su Lambda de Wilks de  $2.0 \times 10^{-05}$  (Cuadro 6). Lo anterior es indicativo que la primera función discriminante es capaz de separar mejor a los individuos de las 13 especies de *Quercus*, en el predio Los Ocotones.

Cuadro 6. Análisis discriminante de la variación morfológica foliar entre individuos de los 13 taxa de *Quercus*. \*Valor de funciones con mayor peso en la discriminación de las especies. \*\* Funciones discriminantes estadísticamente significativas

Función Discriminante	Eigen valor	Porcentaje Relativo	Correlación Canónica	Lambda de Wilks	Chi-Cuadrada	GL	Valor-P
1	31.8035	59.32**	0.98464**	2.03124E-05	194.477	108	0**
2	12.5744	23.45**	0.96246**	0.00066632	131.6473	88	0.0018**
3	4.03768	7.53	0.89526	0.00904487	84.7	70	0.1112
4	2.84004	5.3	0.85999	0.0455652	55.595	54	0.4145
5	1.01984	1.9	0.71057	0.174972	31.3763	40	0.8334
6	0.922128	1.72	0.69264	0.353415	18.722	28	0.9065
7	0.189174	0.35	0.39885	0.67931	6.9602	18	0.9905
8	0.16737	0.31	0.37865	0.807817	3.8416	10	0.9542
9	0.0604217	0.11	0.2387	0.943021	1.056	4	0.9012

Para ambas funciones 1 y 2 el carácter morfológico que más influye es largo de la lámina (LL) quién posee los valores mayores del Eigen valor: 1959.77 y 1075.7, respectivamente (Cuadro 7).



Cuadro 7. Coeficientes de la Función Discriminante de la variación morfológica entre los 13 taxa de *Quercus*. \*caracteres morfométricos con mayor peso en la discriminación en las funciones discriminantes 1 y 2

Caracteres morfométricos	Funciones Discriminantes					
	1	2	3	4	5	6
<b>SIMPLES</b>						
Largo de la lámina (LL)	1959.77*	1075.7*	-6452.88	-3806.03	-1133.06	-2348.79
Largo del pecíolo (LP)	-7.13405	2.54688	-3.47209	-0.374863	0.658053	0.795078
Largo total de la hoja (LTH)	13.329	-5.08382	3.89121	3.92367	-8.82885	-2.3741
Longitud de la base al ancho máximo (LBAM)	-484.577	-307.932	3925.2	157.567	-191.68	-710.873
Ancho máximo (AM)	-781.857	-370.16	-491.005	2522.92	1072.98	2615.62
<b>COMBINADOS</b>						
(LL)- (LBAM)	-521.626	-331.599	4250.9	174.49	-212.923	-769.122
(LP)*100/(LTH)	5.32053	-2.87406	3.47907	0.372849	-0.00449586	-0.206416
(LBAM)*100/(LTH)	2.36856	-0.00110685	2.67208	2.17011	-3.04906	0.290219
(LL)/(AM)	-815.082	-384.106	-512.416	2624.23	1116.3	2722.75

Las dos primeras funciones discriminantes permiten distinguir a cinco taxones: *Q. acutifolia* mfsp.2, *Q. calophylla* mfsp.1 y mfsp.2, *Q. rubramenta* y *Q. scytophylla*, y en menor grado a *Q. acutifolia* mfsp.1 y *Q. glaucescens*. Por su parte, las demás especies no pudieron ser separadas debido a su traslape entre ellas (Figura 9).

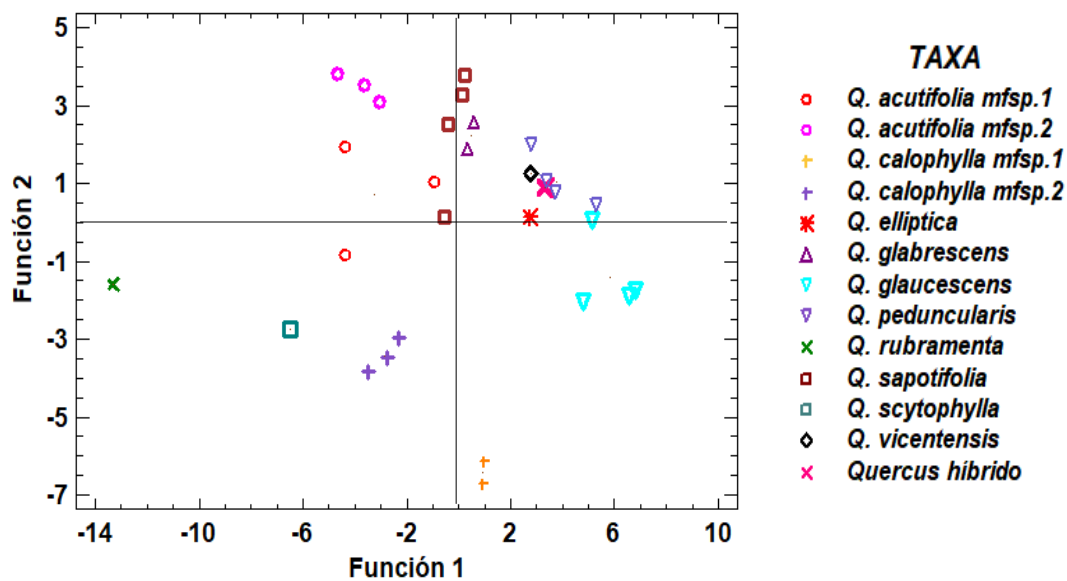


Figura 9. Funciones discriminantes de caracteres morfométricos de 30 individuos correspondientes a 13 taxa de *Quercus* identificadas en el predio Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas

## **7.2. Diferenciación de las especies de *Quercus* presentes en el predio Los Ocotones, con base en análisis genéticos**

### **7.2.1. Extracción y amplificación de ADN**

Se logró la extracción de ADN de hojas de 30 árboles, de las 13 unidades taxonómicas operativas (taxa) de *Quercus* analizadas (Anexos 7, 8, 9 y 10). Se obtuvo una amplificación de 30 muestras para el ITS 1-2, y 28 muestras para el ITS 3-4. Así también 26 muestras con el marcador de cloroplasto Maturase K (MatK) y 26 muestras con el marcador molecular cloroplasto CD\_CD (tRNL). De esta manera se secuenciaron un total de 110 muestras, correspondientes a los cuatro marcadores moleculares. De estas, 99 secuencias fueron aceptables (nucleótidos bien definidos, señal clara) para obtener los parámetros genéticos: se descartó una secuencia del marcador cloroplástico CD\_CD (tRNL), seis secuencias del marcador ribosomal nuclear ITS 1-2, y cuatro secuencias del marcador ITS 3-4 (Anexos 7, 8, 9 y 10).

### **7.2.2. Análisis de identidad de secuencias mediante Blast GenBank NCBI**

El análisis de identidad de las secuencias con el marcador de cloroplasto MatK (698 pb) de 26 individuos demostró con un porcentaje de identidad >99.92% que estas corresponden al género *Quercus* (Anexo 7), para el marcador de cloroplasto CD\_CD (tRNL) (494 pb), las secuencias de 25 individuos demostraron >99.91% que corresponden al género *Quercus* (Anexo 8), para el marcador ITS 1-2 (260 pb), las secuencias de 24 individuos, demostraron >97.80% que corresponden al género *Quercus* (Anexo 9), y para el marcador ITS 3-4 (370 pb), las secuencias de 24 individuos, demostraron con un porcentaje de identidad > 98.01% que corresponden al género *Quercus* (Anexo 10).

Para los cuatro marcadores utilizados, la primera especie con mayor porcentaje de identidad en el GenBank, es distinta a las determinadas en este trabajo, sin embargo, se encontró que, con un porcentaje de identidad menor, para los marcadores MatK, ITS 1-2 e ITS 3-4, algunas secuencias coinciden con secuencias de la misma especie, o con las especies: *Q. acutifolia*, *Q. candicans* (sinonimia de *Q. calophylla*, Valencia-Ávalos *et al.*, 2018), y *Q. elliptica*, las cuales se encuentran presentes en el predio (Anexos 7, 8, 9 y 10).

### 7.2.3. Nivel de diferenciación genética y establecimiento de relaciones filogenéticas entre especies de *Quercus* presentes en el predio Los Ocotones

#### 7.2.3.1. Diversidad genética y filogenia de la región de ADN cloroplástico CD\_CD (tRNL)

En el cuadro 8 se muestran los valores de diversidad genética para las especies en las que se logró más de dos secuencias y los valores de diversidad para el conjunto de 25 secuencias. Para el único individuo colectado de la especie *Q. vicentensis* no se logró la amplificación para el marcador CD\_CD (tRNL). El número de haplotipos que se registró para las especies estuvo entre 1 y 2. El número de sitios segregativos (*s*) también fue entre 0 y 2. Los valores de diversidad nucleotídica (para las especies con dos o más secuencias) osciló entre 0.00135 y 0.00270, y los de diversidad haplotídica variaron entre 0 y 1 (Cuadro 8).

Cuadro 8. Diversidad genética de la región de ADN cloroplasto CD\_CD (tRNL), de los taxa de *Quercus* identificadas en el predio Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas. **N** = número de secuencias analizadas, **s** = sitios segregativos,  **$\pi$  (*pi*)** = diversidad de nucleótidos, ***h*** = número de haplotipos, ***Hd*** = diversidad haplotídica

Secuencias CD_CD (tRNL) Longitud (494 pb)		<b>N</b>	<b>s</b>	<b><math>\pi</math></b>	<b><i>h</i></b>	<b><i>Hd</i></b>
Taxa						
<i>Q. acutifolia</i> mfsp.1		3	1	0.00135	2	0.667
<i>Q. acutifolia</i> mfsp.2		2	0	0	1	0
<i>Q. calophylla</i> mfsp.1		2	1	0.00203	2	1.00
<i>Q. calophylla</i> mfsp.2		*3	0	0	1	0
<i>Q. elliptica</i>		1	-	-	-	-
<i>Q. glaucescens</i>		4	2	0.00203	2	0.500
<i>Q. glabrescens</i>		1	-	-	-	-
<i>Q. peduncularis</i>		3	2	0.00270	2	0.667
<i>Q. rubramenta</i>		1	-	-	-	-
<i>Q. sapotifolia</i>		3	1	0.00135	2	0.667
<i>Q. scytophylla</i>		1	-	-	-	-
<i>Q. vicentensis</i>		-	-	-	-	-
Q. híbrido		1	-	-	-	-
Diversidad genética de las 25 secuencias en conjunto		25	5	0.00243	5	0.730

Un total de cinco haplotipos únicos fueron generados con base en las 25 secuencias del marcador CD\_CD (tRNL). Los haplotipos 1 (H1), 3 (H3) y 4 (H4) se presentan en más de una especie. El haplotipo 4 (H4) se presenta en siete taxa, los haplotipos 3 (H3) y 1 (H1) en cuatro taxa. Los haplotipos 2 (H2) y 5 (H5) se presentaron en *Q. scytophylla* y *Q. glaucescens*, respectivamente (Anexo 11).

El H1 se relaciona con H3 y H5, y se diferencia por una y dos mutaciones respectivamente. Del H4 se desprenden el H3 y de este el H2, con una mutación. Se observa también que el H4 agrupa 7 taxa, el H3 cuatro y el H1 a cuatro. Asimismo, se observa que el H5 sólo se presentó *Q. glaucescens*, y el H2 sólo se registró en *Q. scytophylla* (Figura 10).

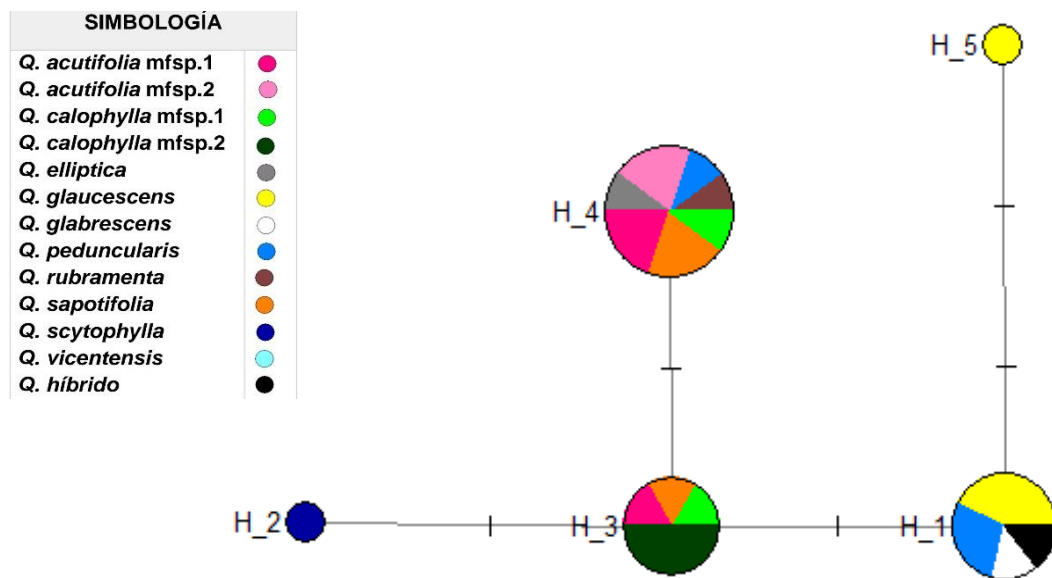


Figura 10. Red de cinco haplotipos únicos generado a partir de 25 secuencias del marcador CD\_CD (tRNL) en 12 taxa de *Quercus*. El tamaño del círculo indica la frecuencia del haplotipo, y las divisiones en su interior muestran la frecuencia del taxa que lo presenta

Mediante el algoritmo del método Kimura 2-parámetros se realizó agrupación a partir de las 25 secuencias de la región de ADN cloroplasto CD\_CD (tRNL) para *Quercus*. En el árbol filogenético, obtenido por el método de Neighbor-Joining, se observan dos clados (A, B) (Figura 11). El clado A, lo constituyen cuatro taxa: *Q. glabrescens*, *Q. glaucescens*, *Q. peduncularis* y *Q. híbrido*. El clado B lo constituyen

siete taxa: *Q. acutifolia* mfsp.1 y mfsp.2, *Q. calophylla* mfsp.1, *Q. elliptica*, *Q. peduncularis*, *Q. sapotifolia* y *Q. rubramenta*. Seis muestras no difieren genéticamente (Figura 11).

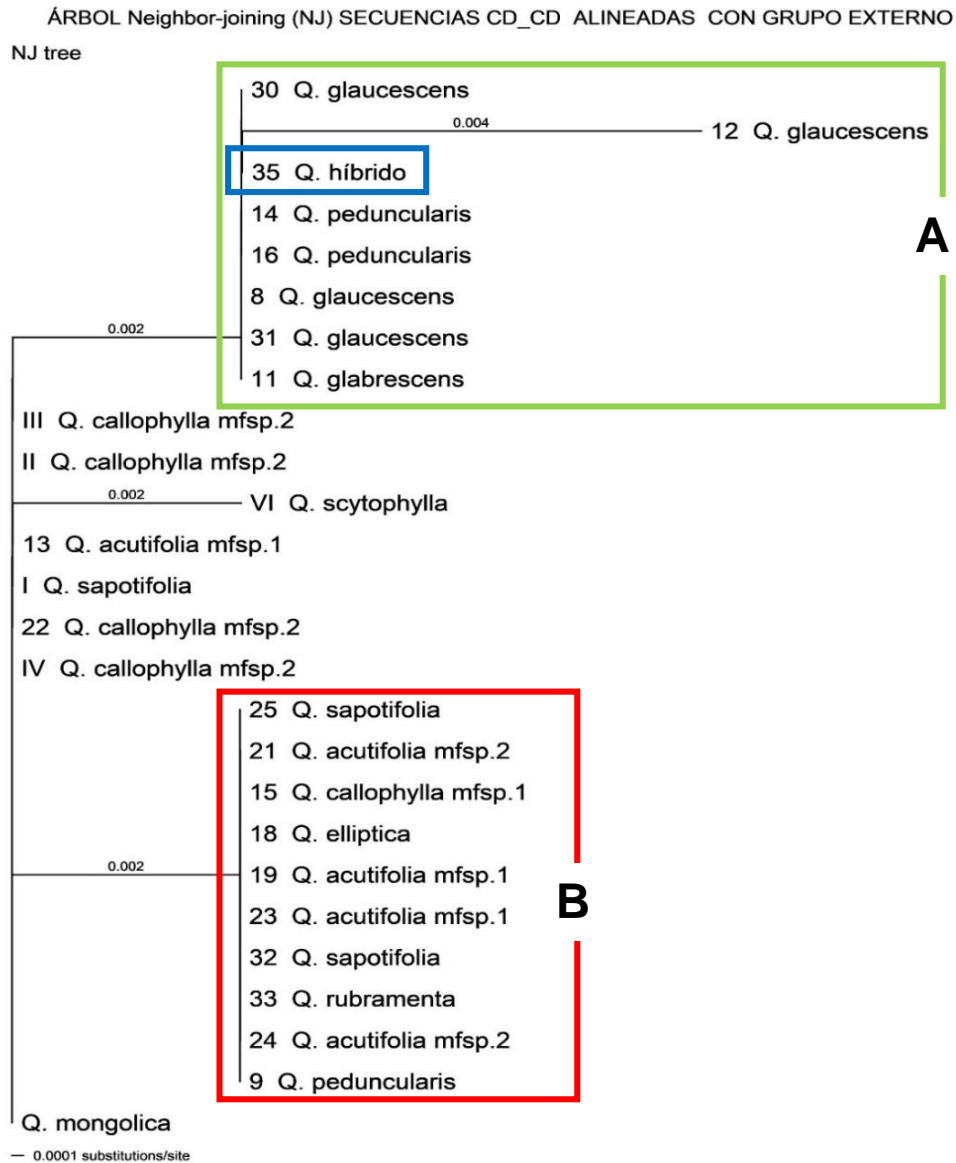


Figura 11. Árbol filogenético con base en 25 secuencias del marcador CD\_CD (tRNL) de 12 taxa de *Quercus*, a través el método del vecino más cercano (NJ) y el parámetro 2-Kimura. Los números en cada nodo son los valores de bootstrap (1000 repeticiones). Los números a la izquierda del nombre de la especie corresponden al identificador de colecta presentado en el Anexo 6. Pueden observarse dos clados principales: A marcado en color verde y B marcado en color rojo. Asimismo, el híbrido se encuentra marcado en color azul

### 7.2.3.2. Análisis diversidad genética y filogenia de la región de ADN cloroplástico Maturase K (MatK)

En el Cuadro 9 se muestran los valores de diversidad genética para los taxa en las que se logró más de dos secuencias y los valores de diversidad para el conjunto de 26 secuencias. Para el único individuo colectado de la especie *Q. scytophylla*, no se logró la amplificación para el marcador Maturase K (MatK). El número de haplotipos que se registró para los taxa estuvo entre 1 y 2. El número de sitios segregativos (*s*) fue entre 0 y 7. Los valores de diversidad nucleotídica (para las especies con dos o más secuencias) osciló entre 0.00096 y 0.00673, y los valores de diversidad haplotídica entre 0 y 1. Las especies con  $Hd=1$  fueron *Q. acutifolia* mfsp.2 y *Q. calophylla* mfsp.1 (Cuadro 9).

Cuadro 9. Diversidad genética de la región de ADN cloroplasto Maturase K (MatK), de los taxa de *Quercus* identificados en el predio Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas. **N** = número de secuencias analizadas, **s** = sitios segregativos,  **$\pi$**  = diversidad de nucleótidos,  **$\pi$  (*pi*)** = número de haplotipos, **Hd** = diversidad haplotídica, \* = taxa con más de dos individuos, aptos para realizar el análisis de diversidad genética

Secuencias MatK Longitud (698 pb)	<b>N</b>	<b>s</b>	<b><math>\pi</math></b>	<b><i>h</i></b>	<b><i>Hd</i></b>
Taxa					
<i>Q. acutifolia</i> mfsp.1	3	4	0.00385	2	0.667
<i>Q. acutifolia</i> mfsp.2	2	1	0.00144	2	1.00
<i>Q. calophylla</i> mfsp.1	2	5	0.00787	2	1.00
<i>Q. calophylla</i> mfsp.2	3	1	0.00096	2	0.667
<i>Q. elliptica</i>	1	-	-	-	-
<i>Q. glaucescens</i>	4	0	0	1	0
<i>Q. glabrescens</i>	2	2	0	1	0
<i>Q. peduncularis</i>	3	7	0.00673	2	0.667
<i>Q. rubramenta</i>	1	-	-	-	-
<i>Q. sapotifolia</i>	3	1	0.0096	2	.0667
<i>Q. scytophylla</i>	—	—	—	—	—
<i>Q. vicentensis</i>	1	-	-	-	-
Q. híbrido	1	-	-	-	-
Diversidad genética de las 26 secuencias en conjunto	26	15	0.00555	6	0.6708

Un total de seis haplotipos únicos fueron generados con base en las 26 secuencias correspondientes a 12 de 13 taxa de *Quercus* identificados en el predio Los Ocotones, mediante el marcador Maturase K (MatK). Los haplotipos 1 (H1), 2 (H2) y 3 (H3) se presentan en más de un taxa. El haplotipo 1 (H1) se presenta en diez taxa, el haplotipo 2 (H2) en tres taxa y el 3 (H3) en dos. Los haplotipos 4 (H4), 5 (H5) y 6 (H6) se presentaron sólo en *Q. acutifolia* mfsp.2, *Q. acutifolia* mfsp.1 y *Q. calophylla* mfsp.1, respectivamente (Anexo 12).

Del H1 se desprenden el H2, H3, H4, H5 y H6, sin embargo, H2 y H6 se desprenden desde un punto en el que se sugiere un ancestro común hipotético, y se diferencian de H1 por cinco y cuatro mutaciones desde el ancestro común, respectivamente. El H3 y H4 se relacionan con H1 ambos por una mutación. H5 se relaciona con H1, sin embargo, se diferencia de éste por cuatro mutaciones. Se observa también, que el H1 agrupa 10 taxa, el H2 a tres y a H3 a dos. Asimismo, se observa que los haplotipos 4 (H4), 5 (H5) y 6 (H6) se presentaron sólo en *Q. acutifolia* mfsp.2, *Q. acutifolia* mfsp.1 y *Q. calophylla* mfsp.1, respectivamente (Figura 12).

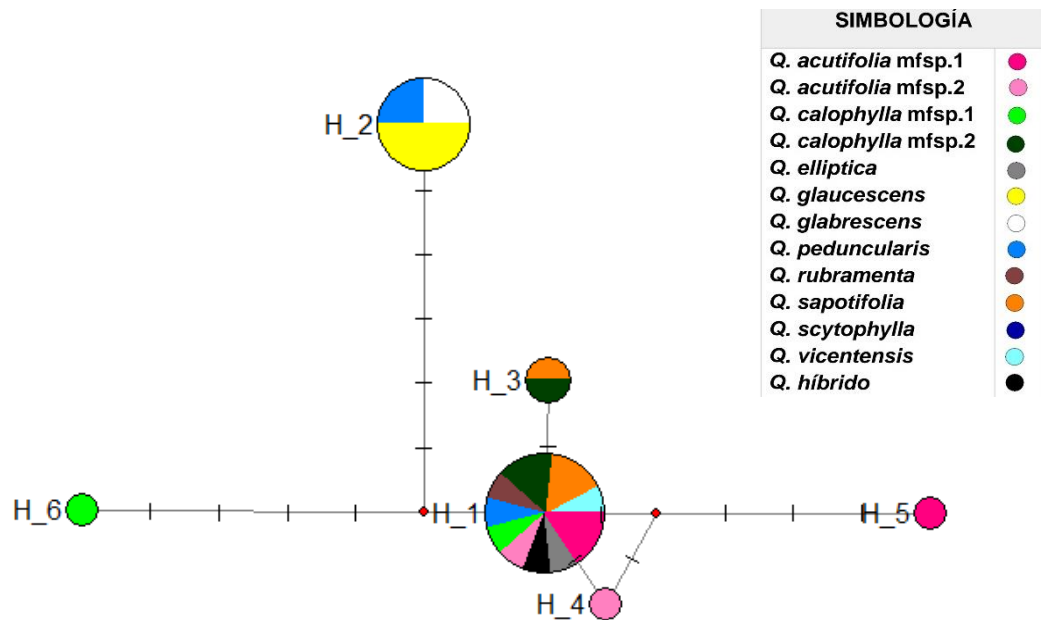


Figura 12. Red de seis haplotipos únicos generado a partir de 26 secuencias del marcador Maturase K (MatK) en 12 taxa de *Quercus*. El tamaño del círculo indica la frecuencia del haplotipo, y las divisiones en su interior muestran la frecuencia del taxa que lo presenta

Mediante el algoritmo del método Kimura 2-parámetros se realizó una reconstrucción filogenética a partir de las 26 secuencias de la región de ADN cloroplasto MatK para *Quercus*. En el árbol filogenético obtenido por el método de Neighbor-Joining, pueden observarse dos clados principales (A y B) (Figura 13). El clado A lo constituyen tres taxa: *Q. glabrescens*, *Q. glaucescens* y *Q. peduncularis*. El clado B lo constituyen 10 taxa: *Q. acutifolia* mfsp.1 y mfsp.2, *Q. calophylla* mfsp.1 y mfsp.2, *Q. elliptica*, *Q. peduncularis*, *Q. rubramenta*, *Q. sapotifolia*, *Q. vicentensis* y *Q. híbrido*. De manera particular *Q. calophylla* mfsp.2 (ID. Colecta 22) y *Q. sapotifolia* (ID. Colecta 17) son las más emparentadas (Figura 13).

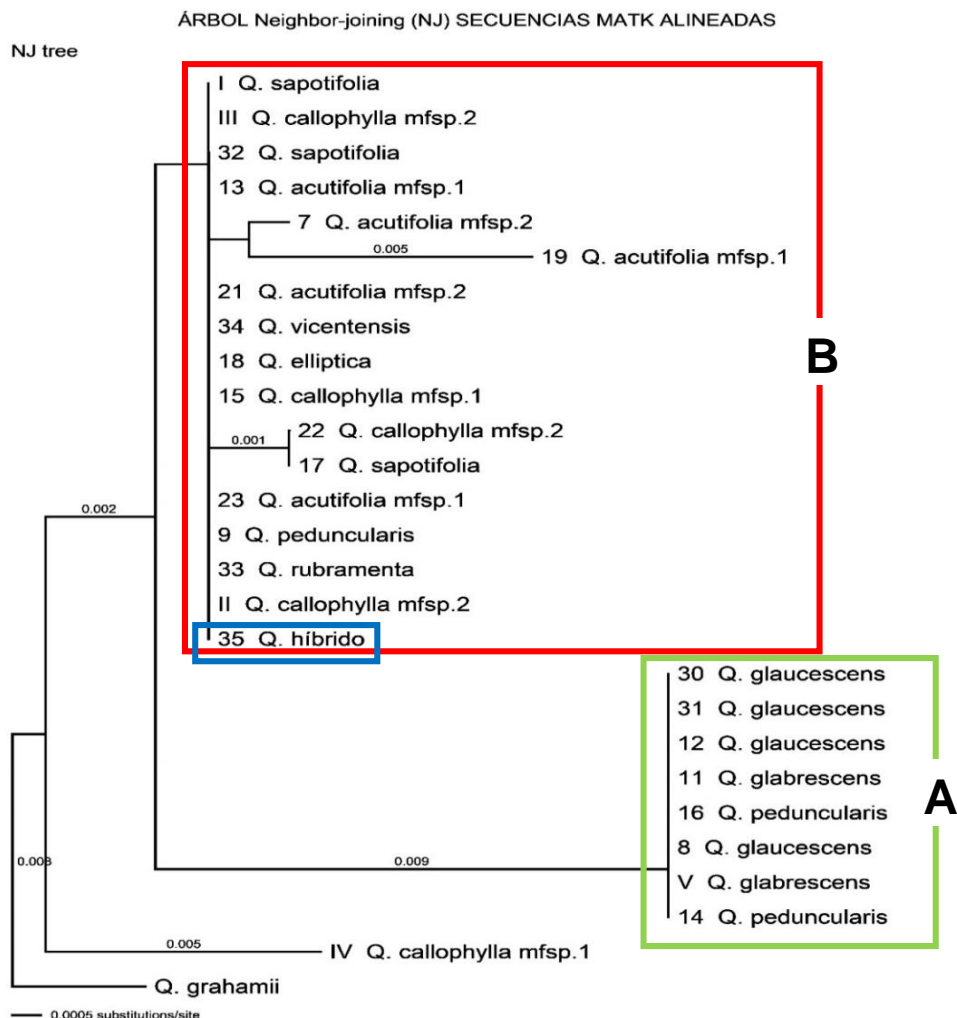


Figura 13. Árbol filogenético con base en 26 secuencias del marcador Maturase K (MatK) de 12 taxa de *Quercus*, a través el método del vecino más cercano (NJ) y el parámetro 2-Kimura. Los números en cada nodo son los valores de bootstrap (1000 repeticiones). Los números a la izquierda del nombre de la especie corresponden al identificador de colecta presentado en el Anexo 6. Pueden observarse dos clados principales: A marcado en color verde y B marcado en color rojo. Asimismo, el híbrido se encuentra marcado en color azul



### 7.2.3.3. Análisis de diversidad genética y filogenia de las regiones de ADN cloroplástico Maturase K (MatK) y CD\_CD (tRNL) concatenados.

En el cuadro 10 se muestran los valores de diversidad genética para las especies en las que se logró más de dos secuencias, así como los valores de diversidad para el conjunto de las 22 secuencias concatenadas pertenecientes a 11 de las 13 taxa de *Quercus* identificadas en el predio Los Ocotones. Para *Q. vicentensis* y *Q. scytophylla* no se logró la amplificación para ambos marcadores, por lo cual no se incluyeron en el análisis basado en la concatenación. El número de haplotipos que se registró para los taxa estuvo entre 1 y 3. El número de sitios segregativos (s) fue entre 1 y 9. Los valores de diversidad nucleotídica (para las taxa con dos o más secuencias) osciló entre 0.00056 y 0.00506. Los valores de diversidad haplotídica fueron entre 0 y 1. Las especies con Hd=1 fueron *Q. acutifolia* mfsp. 1, *Q. calophylla* mfsp. 1 y *Q. sapotifolia* (Cuadro 10).

Cuadro 10. Diversidad genética de las regiones de ADN cloroplástico Maturase K (MatK) y CD\_CD (tRNL) concatenadas de los taxa de *Quercus* identificadas en el predio Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas. **N** = número de secuencias analizadas, **s** = sitios segregativos,  **$\pi$  ( $\rho$ )** = diversidad de nucleótidos, **h** = número de haplotipos, **Hd** = diversidad haplotídica, \* = especies con dos o más individuos, aptas para realizar el análisis de diversidad genética

<b>Secuencias MatK y CD concatenadas (1192 pb)</b>	<b>N</b>	<b>s</b>	<b><math>\pi</math></b>	<b>h</b>	<b>Hd</b>
<b>Taxa</b>					
<i>Q. acutifolia</i> mfsp.1	3	5	0.00281	3	1.00
<i>Q. acutifolia</i> mfsp.2	1	-	-	-	-
<i>Q. calophylla</i> mfsp.1	2	6	0.00582	2	1.00
<i>Q. calophylla</i> mfsp.2	3	1	0.00056	2	0.667
<i>Q. elliptica</i>	1	-	-	-	-
<i>Q. glaucescens</i>	4	2	0.00084	2	0.500
<i>Q. glabrescens</i>	1	-	-	-	-
<i>Q. peduncularis</i>	3	9	0.00506	2	0.667
<i>Q. rubramenta</i>	1	-	-	-	-
<i>Q. sapotifolia</i>	2	1	0.00084	2	1.00
<i>Q. scytophylla</i>	-	-	-	-	-
<i>Q. vicentensis</i>	-	-	-	-	-
<i>Q. híbrido</i>	1	-	-	-	-
Diversidad genética de las 22 secuencias en conjunto	22	19	0.00420	8	0.8182

Un total de ocho haplotipos únicos fueron generados con base en las 22 secuencias concatenadas de las regiones de ADN cloroplástico Maturase K (MatK) y CD\_CD (tRNL), correspondientes a 11 taxa de *Quercus* identificadas en el predio Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas Los haplotipos H1, H2 y H3 se presentan en más de un taxa. El haplotipo 3 (H3) se presenta en siete taxa, el H1 y H2 en tres. Los haplotipos 4 (H4) y 5 (H5), 6 (H6), 7 (H7) y 8 (H8) se presentaron a *Q. calophylla* mfsp.1, *Q. calophylla* mfsp.2, *Q. glaucescens*, *Q. acutifolia* mfsp.1 y *Q. híbrido*, respectivamente (Anexo 13).

El H1 se relaciona con H6 y H8, y se diferencia de ellas por dos y seis mutaciones respectivamente (Figura 14). Del H2 se desprenden el H3, H5 y H8, diferenciando de este sólo por una mutación, de la misma manera de H2 desprende H4, separado por 5 mutaciones. H7 desprenden de H3 diferenciándose de este por 4 mutaciones. Se observa también que el H3 agrupa siete taxa, H1 y H2 a tres. Asimismo, se observa que el H4 sólo lo presentó *Q. calophylla* mfsp.1, H5 sólo se registró *Q. calophylla* mfsp.2, H6 a *Q. glaucescens*, H7 a *Q. acutifolia* mfsp.1, y H8 a *Q. híbrido* (Figura 14).

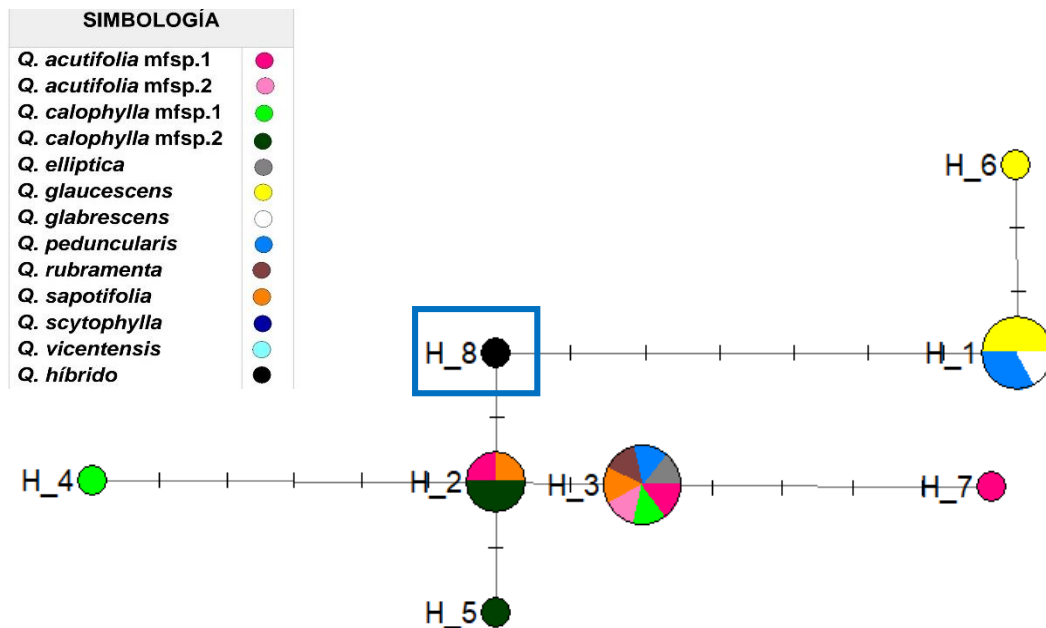


Figura 14. Red de ocho haplotipos únicos generado a partir de 22 secuencias de las regiones de ADN cloroplasto Maturase K (MatK) y CD\_CD (tRNL) concatenadas en 11 taxa de *Quercus*. El tamaño del círculo y de las divisiones en su interior representan la frecuencia de los individuos presentes de cada taxa. El híbrido se encuentra marcado en color azul

Mediante el algoritmo del método Kimura 2-parámetros se realizó una reconstrucción filogenética a partir de las 22 secuencias concatenadas de las regiones de ADN cloroplasto: MatK y CD (tRNL), para *Quercus*. En el árbol de Neighbor-Joining (Figura 12), puede observarse un clado bien definido y otro menos definido; ambos agrupan a 20 individuos correspondientes a los 13 analizados. El clado A lo constituyen: *Q. glabrescens*, *Q. glaucescens* y *Q. peduncularis*. Por su parte, el clado B lo constituyen *Q. acutifolia* mfsp.1 y mfsp.2, *Q. calophylla* mfsp.1 y mfsp.2, *Q. elliptica*, *Q. peduncularis*, *Q. rubramenta* y *Q. sapotifolia* (Figura 15).

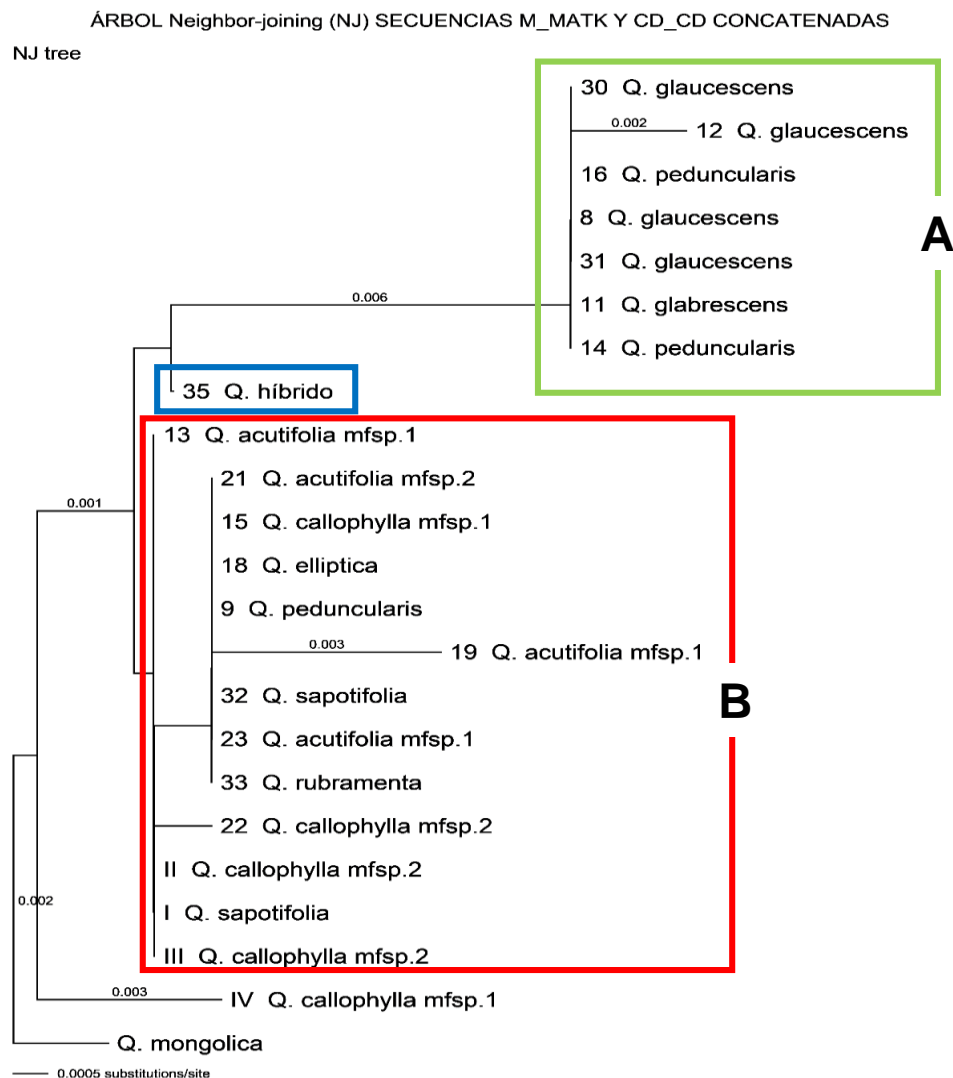


Figura 15. Árbol filogenético con base en 22 secuencias concatenadas de las regiones de ADN cloroplasto Maturase K (MatK) y CD\_CD (tRNL), de 11 taxa de *Quercus*, a través el método del vecino más cercano (NJ) y del parámetro 2-Kimura. Los números en cada nodo son los valores de bootstrap (1000 repeticiones). Los números a la izquierda del nombre de la especie corresponden al identificador de colecta presentado en el Anexo 6. Pueden observarse dos clados principales: A marcado en color verde y B, marcado en color rojo. Asimismo, el híbrido se encuentra marcado en color azul.

#### 7.2.3.4. Análisis de diversidad genética y filogenia de las regiones de ADN ribosomal ITS 1-2 e ITS 3-4 concatenadas

En el cuadro 11 se muestran los valores de diversidad genética para los taxa en las que se logró más de dos secuencias, así como los valores de diversidad para el conjunto de las 21 secuencias concatenadas pertenecientes a 9 de las 13 taxa de *Quercus* identificadas en el predio Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas. Para *Q. rubramenta*, *Q. scytophylla*, *Q. vicentensis* y *Q. híbrido* no se logró la amplificación para ambos marcadores, por lo cual no se pudieron completar los análisis. El número de haplotipos que se registró para los taxa estuvo entre 1 y 4. El número de sitios segregativos (s) fue entre 0 y 50. Los valores de diversidad nucleotídica (para los taxa con dos o más secuencias) osciló entre 0 y 0.05727, y los valores de diversidad haplotídica para todas los taxa fue de 1 (Cuadro 11).

Cuadro 11. Diversidad genética de las secuencias concatenadas de las regiones de ADN ribosomal ITS 1-2 e ITS 3-4 de los taxa de *Quercus* identificadas en el predio Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas. **N** = número de secuencias analizadas, **s** = sitios segregativos,  **$\pi$  ( $\pi_i$ )** = diversidad de nucleótidos, **h** = número de haplotipos, **Hd** = diversidad haplotídica, \* = Taxa con dos o más individuos, aptos para realizar el análisis de diversidad genética

Secuencias ITS 1-2 e ITS 3-4 concatenadas (630 pb)					
Taxa	<b>N</b>	<b>s</b>	<b><math>\pi</math></b>	<b>h</b>	<b>Hd</b>
<i>Q. acutifolia</i> mfsp.1	3	12	0.01386	3	1.00
<i>Q. acutifolia</i> mfsp.2	3	16	0.01887	3	1.00
<i>Q. calophylla</i> mfsp.1	1	-	-	-	-
<i>Q. calophylla</i> mfsp.2	2	7	0.01205	2	1.00
<i>Q. elliptica</i>	1	-	-	-	-
<i>Q. glaucescens</i>	4	40	0.03125	4	1.00
<i>Q. glabrescens</i>	1	-	-	-	-
<i>Q. peduncularis</i>	3	50	0.05727	3	1.00
<i>Q. rubramenta</i>	-	-	-	-	-
<i>Q. sapotifolia</i>	3	38	0.04395	3	1.00
<i>Q. scytophylla</i>	-	-	-	-	-
<i>Q. vicentensis</i>	-	-	-	-	-
<i>Q. híbrido</i>	-	-	-	-	-
Diversidad genética de las 21 secuencias en conjunto	21	147	0.05419	21	1.000

Un total de 21 haplotipos únicos fueron generados con base en las 21 secuencias concatenadas de las regiones de ADN ribosomal ITS 1-2 e ITS 3-4 para *Quercus*. Se puede observar que a cada secuencia le corresponde un haplotipo (Anexo 14). La red de los haplotipos sugiere una cohesión genética o una filogenia entre muestras de un mismo taxa, sólo para *Q. acutifolia* mfsp.1 y para dos individuos de *Q. acutifolia* mfsp.2. Para el resto de las especies los individuos se relacionan filogenéticamente con individuos de un taxa diferente al asignado (Figura 16).

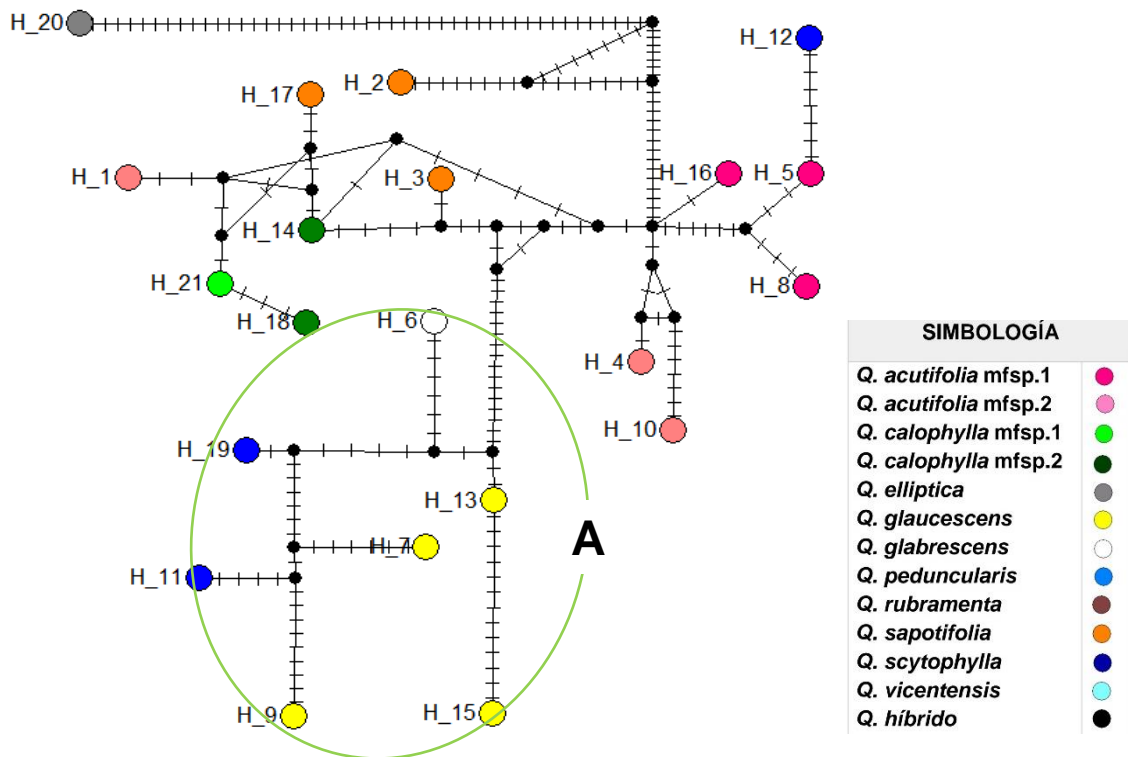


Figura 16. Red de 21 haplotipos únicos generado a partir de 21 secuencias concatenadas de las regiones de ADN ribosomal ITS 1-2 e ITS 3-4 pertenecientes a 10 taxa de *Quercus*. A cada haplotipo le corresponde una secuencia individual (un círculo). Asimismo, las secuencias del clado A (marcado dentro del círculo de color verde) pueden diferenciarse de las demás.

Mediante el algoritmo del método Kimura 2-parámetros se realizó una reconstrucción filogenética a partir de las 22 secuencias concatenadas de las regiones de ADN ribosomales nuclear ITS 1-2 e ITS 3-4 para *Quercus*, pertenecientes a 9 de las 13 taxa identificados. En el árbol filogenético obtenido por el método de Neighbor-

Joining, pueden observarse dos clados principales (A, B) (Figura 17). El clado A, lo constituyen *Q. glabrescens*, *Q. glaucescens* y *Q. peduncularis*. El clado B lo constituyen *Q. sapotifolia* y *Q. elliptica* (Figura 17).

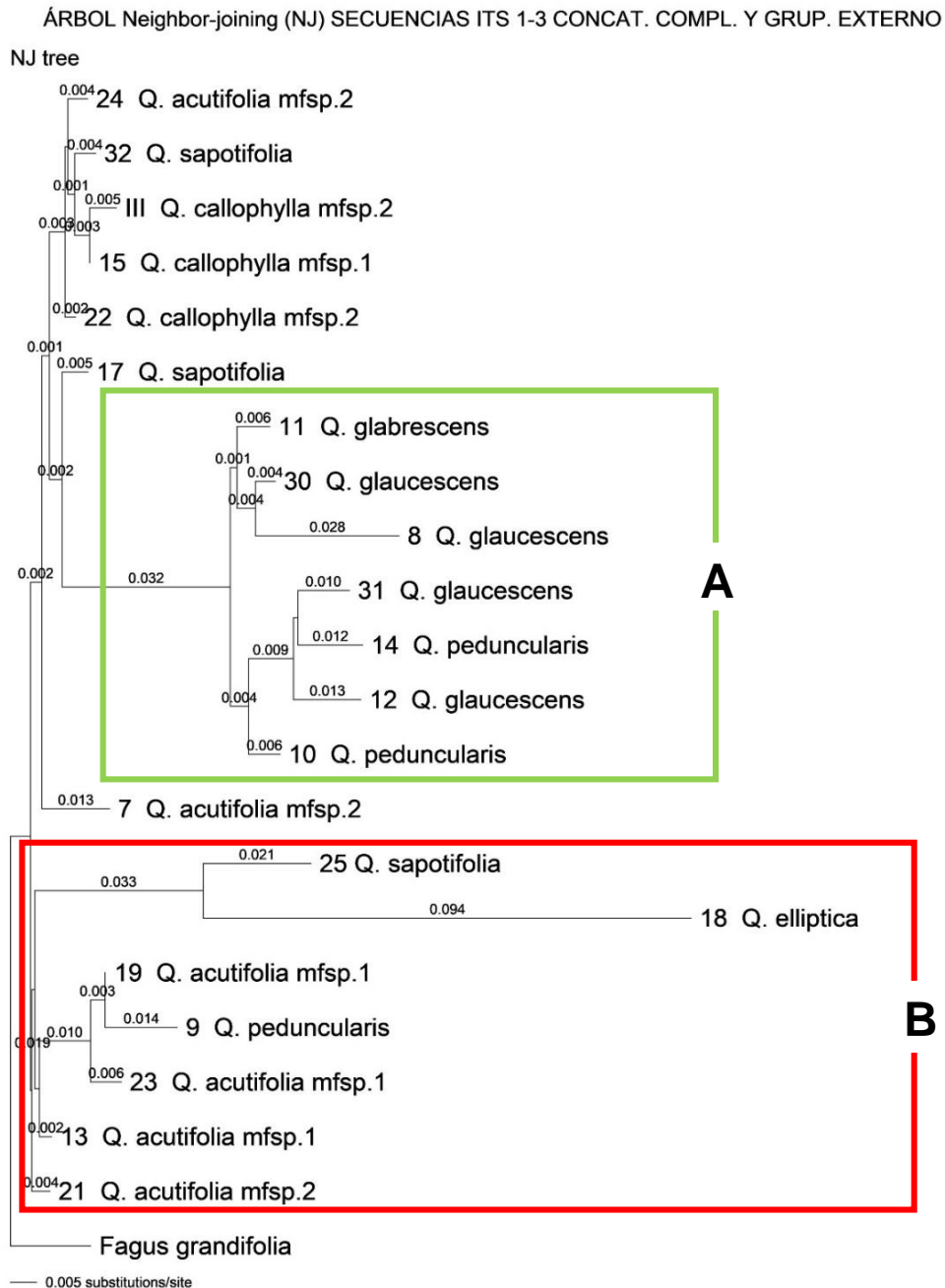


Figura 17. Árbol filogenético con base en 21 secuencias concatenadas de las regiones de ADN ribosomal ITS 1-2 e ITS 3-4 de 9 taxa de *Quercus*, a través el método del vecino más cercano (NJ) y del parámetro 2-Kimura. Los números en cada nodo son los valores de bootstrap (1000 repeticiones). Los números a la izquierda del nombre de la especie corresponde al identificador de colecta presentado en el Anexo 6. Pueden observarse dos clados principales: A marcado en color verde y B, marcado en color rojo.

## VIII. DISCUSIÓN

### 8.1. Especies y morfoespecies con base en sus caracteres morfológicos foliares

Siguiendo las guías de identificación y descripción taxonómica y con base en el análisis foliar se reconocieron 10 especies en el predio Los Ocotones. De estas, tres ya habían sido reportadas por el listado florístico general del Plan Maestro Los Ocotones (PMLO, 2013), y ocho por Martínez-Meléndez y López-Santiago (2019). De esta manera, en el presente estudio se reconocen seis especies pertenecientes a la sección *Lobatae* (encinos rojos): *Q. acutifolia* Née., *Q. calophylla* Trel., *Q. elliptica* Née., *Q. rubramenta* Trel., *Q. sapotifolia* Liebm., *Q. scytophylla* Liebm., y cuatro especies pertenecientes a la sección *Quercus* (encinos blancos): *Q. glabrescens* Benth., *Q. glaucescens* Humb., *Q. peduncularis* Née., *Q. vicentensis* Trel. Como resultado, en esta investigación se adicionan dos nuevos registros para Los Ocotones: *Q. glabrescens* Benth. y *Q. rubramenta* Trel.

En esta investigación, los caracteres más útiles para separar las especies fueron (LL), (LP), (LTH), (LL/AM), (LBAM\*100/ LTH), pueden ser capaces de explicar >81.81% de la variación morfométrica foliar de las especies de *Quercus* en el predio Los Ocotones, los cuales son los usados por especialistas del grupo; Tovar-Sánchez y Oyama, (2004), González-Rodríguez y Oyama, (2005) y Zúñiga *et al.*, (2009), destacan que las otras dos características morfológicas importantes por ser significativas en la diferenciación de encinos en niveles intra e inter-específicos, son la longitud y el ancho de la lámina. Por su parte, Ruíz-Domínguez (2016), sugiere que los caracteres morfológicos simples: (LL), (LP), (LTH), (AM), (LBAM), y los caracteres morfológicos combinados a partir de estos, son los más importantes para la discriminación de especies, además pueden ser considerados como caracteres especie-específicos.

Al mismo tiempo, se reconoció un morfotipo para *Quercus acutifolia* y *Q. calophylla* (Figura 5 A, B y 5 C, D), que se caracterizan entre sí por diferencias de tamaño, forma de la hoja, así como el tipo de margen: *Q. acutifolia* mfsp.1 presenta un margen dentado aristado y una hoja de mayor tamaño que *Q. acutifolia* mfsp.2, mientras tanto, la mfsp.2 posee un margen entero y hojas de menor tamaño respecto

a la mfsp.1. Por su parte, *Q. calophylla* mfsp.1 posee hojas de forma cuneadas a elípticas y un margen dentado con 15-19 aristas, mientras *Q. calophylla* mfsp.2 posee hojas de un tamaño mayor, doblemente aserradas con un total de 16-25 aristas, y además como característica principal posee hojas cóncavas.

El estrés hídrico ha sido uno de los factores que influye en la morfología de las hojas con la consecuente formación de morfotipos adaptados a distintos ambientes (Tovar-Sánchez y Oyama, 2004; Valencia-Ávalos, 2004). La variación espacial del clima ejerce presiones selectivas diferenciales, que pueden impulsar la adaptación local al medio ambiente (Ramírez-Valiente *et al.*, 2015), lo cual genera una mezcla de individuos morfológicamente diferentes por haberse desarrollado en diferentes entornos de crecimiento (Bruschi *et al.*, 2000). Según Valencia-Ávalos (2004) y Matesánz y Valladares (2013), la morfología atípica de individuos es ocasionado por la plasticidad fenotípica. En los encinos el estrés hídrico, el clima y las deficiencias edáficas nutricionales, son los factores que conduce el desarrollo de morfotipos (Bruschi *et al.*, 2003; Tovar-Sánchez y Oyama, 2004), lo cual permite la colonización de diferentes hábitats (Matesánz y Valladares, 2013).

En el predio Los Ocotones se observa una compleja fisiografía debido a su ubicación en la parte media de la cadena montañosa de la sierra madre de Chiapas (PMLO, 2013), además hay influencia del cambio climático y del manejo forestal, que posiblemente afecta la morfología de las hojas de los encinos que se distribuyen en el predio. En esta perspectiva el desarrollo de morfotipos en *Q. acutifolia* y *Q. calophylla* puede suponerse como una respuesta ambiental microespecial, que afectó la morfología en las hojas diferenciando a los individuos al grado que se identificaran morfotipos para ambos. Los análisis discriminantes separan morfométricamente a los morfotipos de *Q. calophylla* mfsp.1 y mfsp.2. De igual forma, hay diferencias morfométricas significativas entre *Q. acutifolia* mfsp.1 y mfsp.2, (Figura 9), lo que sugiere que estas formas pueden tratarse como taxa diferente, sin embargo, requieren un análisis más detallado para una nominación formal. Mientras tanto es posible considerarlos como taxa distintos para fines de registro del número de especies de *Quercus* presentes en el predio Los Ocotones.



### 8.1.2. Reconocimiento de un híbrido de *Quercus* con base en sus caracteres morfológicos y morfométricos foliares

En el presente estudio se presentó una situación de incertidumbre respecto a la identidad específica del ejemplar ID.35, debido a que sus características morfológicas multivariadas coinciden con más de una de las especies analizadas, por lo cual se propone que es resultado de un proceso de hibridación entre varias especies presentes en el predio (Los análisis genéticos confirman esta hipótesis, por lo que se describen a mayor profundidad más adelante). En un principio, la similitud de la pubescencia entre dos especies analizadas: *Q. peduncularis* y *Q. glabrescens* causaron confusión para sugerir la especie parental que dio origen al individuo híbrido ID. 35 (Martínez-Meléndez Nayely, Ramírez-Marcial Neptalí, Valencia-Ávalos Susana, com. pers.), sin embargo, se descartó a *Q. glabrescens* ya que esta especie posee como características distintivas hojas pequeñas (LTH: 104.67 y AM: 38.91) y un margen dentado-aserrado, las cuales no presenta el individuo híbrido (Figura 5F, Cuadro 2, Anexo 6). De esta manera, se propone al ejemplar ID.35 como híbrido *Q. glaucescens x peduncularis*, debido a que sus características morfológicas más parecidas a las de las especies *Q. glaucescens* Humb. y *Q. peduncularis* Née., sugieren que pudo ser producto de la hibridación entre ambas especies parentales (J.W. López-Santiago, obs. pers.) (Figura 5H, Cuadro 2, Anexo 6).

En el género *Quercus* se observa con frecuencia hibridación entre especies, lo cual genera una amplia gama fenotípica que conduce a problemas taxonómicos, ya que se dificulta la asignación de especie de los individuos con características intermedias entre dos o más especies (Valencia-Ávalos, 2004). La hibridación se facilita cuando se distribuyen dos o más especies en las mismas áreas geográficas de distribución (áreas de simpatría) (Bacilieri *et al.*, 1995; Tovar-Sánchez y Oyama (2004), especialmente cuando hay afinidad genética (por ejemplo, especies en la misma sección) (Encina y Villarreal, 2002). En el estudio de Bacilieri *et al.* (1995), el 3% de los individuos no pudieron ser ubicados en alguna de las dos especies estudiadas, *Q. petraea* y *Q. robur*, debido a que varias de las características eran intermedias entre estas especies. De igual manera, Bacon y Spellenberg (1996), encontraron que la presencia de individuos híbridos en las zonas simpatría, requiere una extensa

búsqueda de campo ya que los híbridos de roble son producidos de forma aislada y esporádica (Bacon y Spellenberg, 1996; Bruschi *et al.*, 2003).

Mediante análisis morfométricos Tovar-Sánchez y Oyama (2004), propusieron la presencia de individuos híbridos con base en que 16 de los 17 caracteres tuvieron valores intermedios entre las especies parentales, lo que indicó que *Q. dysophylla* es el resultado de la hibridación entre *Q. crassifolia* y *Q. crassipes* (Tovar-Sánchez y Oyama, 2004). Respecto a la presencia del individuo híbrido *Q. glaucescens x peduncularis*, sus valores morfométricos intermedios en siete de los nueve caracteres analizados entre *Q. peduncularis* y *Q. glaucescens* sugieren que el ejemplar ID.35 pudo ser producto de la hibridación entre ambas especies parentales (Figura 5H, Cuadro 2, Anexo 6). Además, el análisis de funciones discriminantes sugiere que este individuo es morfométricamente más parecido a *Q. peduncularis*, por lo cual se requiere un análisis más detallado para reconocimiento formal. Mientras tanto puede tratarse como un taxa dentro del registro de especies de *Quercus* presentes en el predio Los Ocotones.

### **8.1.3. Variación morfométrica**

A pesar de que las dos primeras funciones discriminantes del análisis discriminantes utilizando hojas, capturaron 81.81% de la varianza foliar, no hubo una clara discriminación entre especies gracias a que las estimaciones morfométricas son dispersas y hay un traslape entre las especies, por lo que escasamente separaron a uno de los 13 taxones analizados: *Q. rubramenta*, En contraste, el análisis de funciones discriminantes a partir de medias aritméticas, distinguió claramente a cinco taxa: *Q. acutifolia* mfsp.2, *Q. calophylla* mfsp.1, *Q. calophylla* mfsp.2, *Q. rubramenta* y *Q. scytophylla*, y en menor grado a dos taxa más: *Q. acutifolia* mfsp.1 y *Q. glaucescens*. No hubo separación de cinco taxa: *Q. elliptica*, *Q. glabrescens*, *Q. peduncularis*, *Q. sapotifolia*, *Q. vicentensis* y *Q. peduncularis x glaucescens* debido al traslape morfométrico entre dichas especies. En este sentido, es evidente que la variación de la morfología foliar es amplia y se traslapa entre las especies analizadas, lo cual dificulta una separación nítida. Cabe destacar que *Quercus glabrescens*, *Q. rubramenta*, *Q. scytophylla* y *Q. vicentensis* pudieron ser distinguidas claramente

con base en su descripción taxonómica mediante las características morfológicas utilizadas y el apoyo de guías de identificación, esto sugiere que estas especies no constituyen un problema taxonómico.

La superposición de valores entre especies, puede ser un resultado frecuente en los encinos, por ejemplo Bruschi *et al.* (2000), observaron que el traslape entre *Q. petraea* y *Q. pubescens*, varió en función de la característica examinada, así también, aunque el análisis de funciones discriminantes utilizando hojas de Ruíz-Domínguez (2016), explicó el 70.50% de la variación morfológica de 11 especies de *Quercus* analizadas (10% menos que nuestros resultados), separó únicamente a solo tres de ellas debido al empalme y amplia dispersión de los datos. En esta investigación, la aportación de cada característica morfométrica analizada fue distinta ya que algunas son más variables que otras (dicha variación oscila entre 7% y 51%, Cuadro 2). Los caracteres con la variación más notable fueron LBAM y LL/AM.

Asimismo, se observó que algunas especies analizadas eran más variables que otras, por ejemplo, *Q. glaucescens* el mayor grado de variación foliar, por otra parte, *Q. rubramenta* es la especie con menor grado de variación foliar en el predio Los Ocotones. Baranski (1975) demostró que los árboles del roble blanco (*Q. alba* L.) no son variables en el mismo grado, debido a que algunos son más variables internamente que otros. La heterogeneidad ambiental como la variabilidad en la luz o el microclima que encuentran las diferentes estructuras de las plantas, representan una fuente extrínseca de variación dentro de los árboles (Bruschi *et al.*, 2003). De esta manera, el traslape observado dentro de las especies analizadas puede ser debido a los efectos ambientes que promueven similitudes o diferencias morfológicas entre especies.

Sisó *et al.* (2001), Valladares *et al.* (2004), Zúñiga *et al.* (2009), observaron que las hojas de robles más cercanas a la parte superior del árbol tenían menos área de superficie, mientras que las hojas más cercanas a la base del árbol tenían una mayor área de superficie lo cual es ocasionado por el efecto de sombra (Sisó *et al.*, 2001; Bruschi *et al.*, 2003; Valladares *et al.*, 2004; Zúñiga *et al.*, 2009). Así también, Blue y Jensen (1988), destacan que las comparaciones basadas en hojas de diferentes tamaños pueden confundir la interpretación (Blue y Jensen, 1988), sin embargo, es de

conocimiento común que la mayoría de los árboles producen una amplia gama de tamaños de hojas, que influye en los resultados morfométricos, y posiblemente los promedios por individuos puede ser una aproximación confiable al valor de que tipifica la especie (Bruschi *et al.*, 2003). Por lo que, la colecta de hojas es un paso que debe ser lo más consistentes posible, por ejemplo, buscar la misma altura, de la misma exposición, y en la medida de lo posible la misma fecha y estado de desarrollo (Blue y Jensen, 1988).

Aunque las características foliares han ayudado al reconocimiento de especies de *Quercus* actuales y fósiles, se considera a *Quercus* como un género taxonómicamente complicado, debido a su amplia variación morfológica (Martínez-Cabrera *et al.*, 2003), que es resultado de varios factores como posición de las hojas en el árbol, y el ambiente en el que los individuos se desarrollan (Baranski, 1975; Blue y Jensen, 1988). Los caracteres macro y micro morfológicos, así como los morfométricos son informativos en cuanto a tamaño y forma de las hojas de encinos (Ruíz-Domínguez, 2016; Valencia-Ávalos, 2018), sin embargo, es necesario ubicar otros caracteres diagnósticos para separar mejor a las especies que se empalman morfométricamente (J.W. López-Santiago, obs. pers.).

#### **8.1.4. Mecanismos morfológicos de respuesta al ambiente**

Se plantea que la estructura foliar en las distintas especies de *Quercus* presentes en el predio Los Ocotones, está relacionado con su respuesta al medio en el cual se desarrollan. Como muestra de ello, investigadores han demostrado que los peciolo largos mantienen a las hojas separadas entre sí, por lo cual permiten una mejor transmisión de la radiación hacia capas inferiores, por el contrario, los peciolo cortos provocan que las hojas están más sobrepuestas entre sí, y como resultado la captación de luz por las hojas de capas inferiores es menor (Bruschi *et al.*, 2003; Valladares *et al.*, 2004; González-Rodríguez y Oyama, 2005). Para el caso de las especies analizadas con hojas pequeñas, tales como *Q. glabrescens*, *Q. elliptica* y *Q. sapotifolia*, se observó que estas tienen peciolo pequeños, por su parte, las especies con hojas de mayor superficie foliar, tales como *Q. calophylla* mfsp.1 y mfsp.2, *Q. rubramenta* y *Q. scytophylla*, tienden a un peciolo más largo (Figura 5, Cuadro 2). Sin embargo, llamó

la atención que particularmente, si las especies con hojas de peciolo pequeño a mediano tienen hojas largas como lo que sucede en *Q. acutifolia* mfsp.1, *Q. acutifolia* mfsp.2 y *Q. vicentensis*, estas especies tienen hojas angostas (Cuadro 5), entonces se hipotetiza, que ello les permite una mejor transmisión de la radiación hacia capas inferiores y con ello hacer un uso más eficiente de los recursos Bruschi *et al.*, 2003; Valladares *et al.*, 2004; González-Rodríguez y Oyama, 2005). Son necesarios más estudios ex profeso para confirmar dicha hipótesis.

El clima es una importante fuerza selectiva en la naturaleza (Ramírez-Valiente *et al.*, 2015). Bruschi *et al.* (2000), Sisó *et al.* (2001) y Valladares *et al.* (2004), mostraron que la pubescencia se asocia con el contenido de agua del suelo, por lo que los individuos más densamente pubescentes se encuentran en sitios más secos, y tienden a ser más resistentes ante las sequías (Bacilieri *et al.*, 1995). El carácter de la pubescencia (tricomas tanto en el haz, así como en el envés y ramillas) estuvo presente en todas las especies en diferentes grados de densidad, por ejemplo *Q. calophylla* mfsp.1 y mfsp.2, *Q. glaucescens*, *Q. peduncularis* y *Q. vicentensis*, son densamente tomentosas ya que presentan hojas con gran cantidad de pubescencia, por su parte *Q. acutifolia* mfsp.1 y mfsp.2, *Q. elliptica*, *Q. glabrescens*, *Q. rubramenta*, *Q. sapotifolia* y *Q. scytophylla* presentan hojas con poca cantidad de pubescencia en sus hojas (Anexo 6, Figura 5). Sin embargo, se debe destacar que los individuos ID.32 (*Q. sapotifolia*) e ID.35 (*Q. glaucescens x peduncularis*) presentan más cantidad de pubescencia en comparación con los demás individuos de la misma especie.

Asimismo, se observó que las hojas de ambos presentaron un color verde aceituna opaco distintivo, a diferencia de los demás individuos colectados (Anexo 6, J.W. López-Santiago, obs. pers.). La extracción de recursos maderables y la construcción de vías de acceso, pueden ser un factor que influye indirectamente en el desarrollo de la morfología foliar de los encinos presentes en el predio Los Ocotones, ya que la extracción de madera mediante los tratamientos de corta de liberación (CL) y aclareos (ACL), del método de desarrollo silvícola (MDS) aplicado en el predio (PMLO, 2013), afectan la estructura del bosque al abrir el dosel, reduciendo la densidad y volumen de las especies dominantes, lo cual transforma la composición,

diversidad y funcionamiento del bosque (Martínez-Meléndez *et al.*, 2021), por lo tanto, el ambiente del entorno inmediato de los ejemplares difiere.

Las plantas han generado distintos mecanismos de adaptación morfológica para adaptarse a su medio como un mecanismo de respuesta al estrés (Bruschi *et al.*, 2003; Valladares *et al.*, 2004). Ramírez-Valiente *et al.* (2015), argumentan que, en las plantas, los pigmentos foto protectores juegan un papel importante en las respuestas a corto plazo al estrés ambiental. Bruschi *et al.* (2003), mencionan que las hojas que se desarrollan en un ambiente de estrés hídrico, temperaturas extremas y mayor radiación solar, se puede presentar fotoinhibición. De igual modo, Bruschi *et al.* (2000), consideran que los caracteres de densidad de pubescencia son el resultado de presiones de selección ambientales en lugar de ser genéticas debido al mayor potencial adaptativo de pubescencia. En este sentido el color aceituna opaco en los individuos ID.32 (*Q. sapotifolia*) e ID.35 (*Q. glaucescens x peduncularis*), se puede suponer como un mecanismo de respuesta al estrés del sitio en donde se desarrollan. Entonces, al estar creciendo en laderas totalmente expuestas al sol y estar apartados de una masa arbórea (J.W. López-Santiago, obs. pers.), los individuos ID. 32 y 35, difieren morfológicamente (presencia de pubescencia) y fisiológicamente (pigmentos) para evitar la fotoinhibición.

## **8.2. Especies y morfoespecies con base en los análisis genéticos**

### **8.2.1. Identidad de secuencias ADN de cloroplasto y ADN ribosomal nuclear**

Las identificaciones morfológicas de especies están siendo acompañadas cada vez más por identificaciones basadas en códigos de barras de ADN, debido a su precisión (Hebert *et al.*, 2003; Leray *et al.* 2019). En los grupos en los que las características morfológicas no son suficientemente distintivas, la identificación de especies puede depender en gran medida de la información genética contrastada con bases de datos masivos como la del *National Center for Biotechnology Information* (GenBank NCBI) (Nilsson *et al.*, 2006; Benson *et al.*, 2013; Leray *et al.* 2019). Sin embargo, para varias especies aún no hay suficiente información de referencia en bases de datos (Leray *et al.*, 2019, Nilsson *et al.* 2006).

En esta investigación, las 99 secuencias de los cuatro marcadores utilizados (ADN cloroplástico y ADN ribosomal nuclear) correspondieron en promedio > 97.80% al género *Quercus* en la base del GenBank. Sin embargo, a nivel de especie, las secuencias con el mayor porcentaje de identidad en el GenBank, no coincidieron con la determinación hecha en campo. Únicamente 37 secuencias (de los marcadores MatK, ITS 1-2 e ITS 3-4), coinciden con secuencias de la misma especie o con las especies: *Q. acutifolia*, *Q. candicans* (sinonimia de *Q. calophylla* Valencia-Ávalos *et al.*, 2018) y *Q. elliptica*, las cuales se encuentran presentes en el predio.

Con el marcador ITS 1-2, y con un porcentaje de identidad >91.32% hubo consistencia en 16 de 24 secuencias analizadas, entre la especie identificada en campo con la ubicada en el GenBank: *Q. acutifolia*, *Q. candicans* (sinonimia de *Q. calophylla*) y/o *Q. elliptica*. Para MatK, *Q. candicans* fue la especie con un porcentaje de identidad menor (> 98.90%) en 18 de 26 secuencias. Para ITS 3-4, *Q. candicans* y *Q. elliptica* fueron las especies con un porcentaje de identidad menor (> 81.73%) en 3 de 26 secuencias. Para tRNL (CD\_CD), ninguna secuencia coincidió con las especies analizadas. Con lo anterior se puede sugerir que la determinación a nivel de género con base en secuencias puede ser útil, en casos en los cuales se carece de experiencia en la determinación con base en características morfológicas. Sin embargo, es necesario incrementar el número de especies y secuencias en el GenBank para que la base de datos pueda ser utilizada como referencia.

### **8.2.2. Análisis de diversidad genética**

La utilidad de los marcadores genéticos de ADN de cloroplasto CD\_CD (tRNL) y Maturase K (MatK) utilizados se demostró en estudios previos (Hilu *et al.*, 2003; Hebert *et al.*, 2003; Borek y Silvieus, 2009). Así como la de los marcadores genéticos de ADN de ribosomal nuclear ITS 1-2, 3-4 utilizados (Álvarez y Wendel, 2003; Bellarosa *et al.*, 2005; Simeone *et al.*, 2013; Ruíz-Domínguez, 2016; Yang *et al.*, 2017). Cuando los *loci* de un gen, por ejemplo, el del cloroplasto se han separado de un ancestro común y han evolucionado de forma independiente, se espera que posean discrepancias interespecíficas, con lo cual se puede considerar que se están analizando poblaciones y/o especies diferentes (Li *et al.*, 2015). Los marcadores ITS 1-2, 3-4 pertenecen a una

región del ADN nuclear, por lo que su herencia es biparental y casi universal para plantas (Álvarez y Wendel, 2003). Por su parte el ADN de cloroplasto (ADNcp) se hereda por vía materna y se considera un marcador genético útil para rastrear la historia demográfica, para explorar la divergencia de especies e identificar especies (Thomson *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2017). No obstante, los haplotipos se pueden llegar a compartir entre especies de encinos (Cavender-Bares, 2018), debido a intercambio genético entre las especies de robles a través de la hibridación y la introgresión (González-Rodríguez *et al.*, 2004).

A través de las redes de haplotipos se lograron identificar cinco haplotipos para el marcador CD\_CD (tRNL), seis haplotipos para el marcador Maturase K (MatK), y ocho haplotipos para las secuencias de marcadores de cloroplasto concatenados. En estos tres marcadores hay haplotipos compartidos entre especies, además se observaron especies con más de un haplotipo, por lo cual estas pueden ser consideradas como las especies con mayor diversidad genética. Para los marcadores ITS 1-2 e ITS 3-4 concatenados, se lograron identificar 21 haplotipos únicos (un haplotipo por individuo). Las relaciones muestran varias mutaciones entre los haplotipos de los marcadores genéticos de ADN de ribosomal nuclear, y muy pocos entre los marcadores genéticos de ADN de cloroplasto.

Los patrones genéticos del presente estudio coinciden con el observado por González-Rodríguez *et al.* (2004), ya que se encontraron seis haplotipos en diferentes poblaciones de *Q. affinis* y *Q. laurina*, en estas poblaciones, dos de estos haplotipos fueron altamente frecuentes en ambas especies, así también algunos haplotipos son compartidos y se presentaron en más de una especie. Por su parte, Ruíz-Domínguez (2016) logró identificar 10 haplotipos en ADN de cloroplasto y 15 haplotipos para ITS, en 11 especies de encinos distribuidos en Chiapas, algunos haplotipos fueron compartidos y se presentaron en más de una especie (hasta siete especies) y también algunas especies poseen más de un haplotipo. El alto número de haplotipos obtenidos, a pesar del bajo número de individuos analizados, permitió a Ruíz-Domínguez (2016), sugerir la utilidad estos marcadores moleculares como caracteres genéticos para estudios de filogenia o de filogeografía de especies de encinos. Además, concluye que las especies analizadas poseen una alta diversidad intrapoblacional.



Los resultados de la presente investigación sugieren la utilidad de los marcadores genéticos de ADN de cloroplasto CD\_CD (tRNL) y Maturase K (MatK), así como de los marcadores genéticos de ADN de ribosomal nuclear ITS 1-2, 3-4, para separar algunas especies y posiblemente para estudios filogenéticos y/o filogeográficos. La cantidad de haplotipos encontrados sugiere que en el predio Los Ocotones, existe una alta diversidad de especies de *Quercus*. Sin embargo, se recomienda analizar un mayor número de individuos de cada especie, para estimaciones de diversidad poblacional precisas. También es recomendable utilizar un mayor número de marcadores moleculares para lograr una mayor separación y delimitación de especies (Simeone *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2017).

### **8.2.3. Relaciones filogenéticas entre las especies de *Quercus* del predio**

La reconstrucción filogenética a partir de secuencias de ADN cloroplástico y ADN ribosomal nuclear, permitió separar a *Q. elliptica*, *Q. sapotifolia* y *Q. scytophylla*. Por el contrario, los demás taxa analizados no pudieron ser diferenciados. La reconstrucción filogenética del marcador CD\_CD (tRNL) separó a *Q. scytophylla*, lo cual fue consistente con la información morfológica. De esta manera *Q. scytophylla* es el único taxa que pudo ser distinguido de los demás tanto genéticamente como morfológicamente. En cuanto a *Q. sapotifolia* y *Q. elliptica*, esta investigación demostró que, aunque las reconstrucciones filogenéticas con el ADN cloroplástico y los análisis morfométricos no permitieron distinguir claramente entre ambas, el análisis morfológico y la reconstrucción filogenética a partir de las secuencias concatenadas de las regiones de ADN ribosomal (ITS 1-2 e ITS 3-4) confirman la separación taxonómica de ambas, ya que existe una diferenciación genética que permite confirmar su identidad taxonómica como especies separadas. Cabe resaltar que los problemas taxonómicos no fueron exclusivos de esta investigación, sino que ambas especies han sido confundidas por especialistas, debido a su gran similitud morfológica, inclusive han sido propuestas como una variedad de la otra. Por ejemplo, Valencia-Ávalos (2004) reclasificó material herborizado de *Q. sapotifolia* que había sido identificado como *Q. elliptica* Liebm. y *Q. elliptica var. microcarpa* (Liebm.).

De igual importancia, en el presente estudio las reconstrucciones filogenéticas distinguen claramente a los taxa en las secciones a la cual pertenecen: *Lobatae* y *Quercus* (Figuras 11,13, 15 y 17), lo cual también fue detectado por Ruíz-Domínguez (2016). Los resultados obtenidos demostraron que en todas las reconstrucciones filogenéticas el grupo A (marcado en color verde) es altamente consistente y está constituido por las especies de la sección *Quercus* (encinos blancos) identificadas morfológicamente en esta en esta investigación: *Q. glabrescens* Benth., *Q. glaucescens* Humb., *Q. peduncularis* Née. y *Q. vicentensis* Trel. Por su parte, el grupo B (marcado en color rojo) lo constituyen las especies de la sección *Lobatae* (encinos rojos) identificadas morfológicamente en esta investigación: *Q. acutifolia* Née., *Q. calophylla* Trel., *Q. elliptica* Née., *Q. rubramenta* Trel., *Q. sapotifolia* Liebm. y *Q. scytophylla* Liebm.

En esta investigación en todas las reconstrucciones filogenéticas el grupo A (marcado en color verde) es altamente consistente, sin embargo, el clado B es consistente únicamente en la reconstrucción del marcador Maturase K (MatK), y de las secuencias concatenadas de Maturase K (MatK) y CD\_CD (tRNL), ya que en las reconstrucciones filogenéticas del marcador CD\_CD (tRNL) y de las secuencias concatenadas de ITS 1-2 e ITS 3-4, algunos taxa muestran una relación distinta ya que no se encuentran agrupados con los ejemplares del mismo taxa, sino que se encuentran fuera del clado aleatoriamente o en forma de politomías. De la misma forma, Ruíz-Domínguez (2016), demostró que la limitación para separar correctamente entre especies con base en marcadores moleculares ocurre al interior de cada sección, ya que observó el mismo patrón de separación inconsistente en la sección *Lobatae*, llegando a hipotetizar a dichos individuos como resultado de eventos de hibridación (lo cual se habla a mayor profundidad más adelante).

Debido a que los caracteres tradicionales o morfológicos son determinados por los genes, el uso de secuencias de ADN se puede considerar una manera más directa de observar diferencias heredables entre especies (Gernandt *et al.*, 2007). Asimismo, Valladares *et al.*, (2004) en su estudio, describen que la variación en las características morfológicas foliares entre individuos de *Q. laeta*, puede ser el resultado de diferencias genotípicas en los individuos. Tovar-Sánchez y Oyama (2004), sugieren que las

diferencias observadas en el tamaño de las hojas *Q. crassifolia* y *Q. crassipes*, probablemente se deban a los factores ambientales y no a los factores genéticos. Por su parte, Bruschi *et al.*, (2003), mencionan que los robles italianos muestran grandes niveles de diversidad fenotípica y genética lo cual es evidencia de la capacidad para adaptarse a diversas condiciones ecológicas. En los encinos, la morfología foliar está determinada genéticamente, y la intensa presión de selección a la que están sometidas las hojas da como resultado diferentes fenotipos, dependiendo del medio en que se desarrollan (Tovar-Sánchez y Oyama, 2004; Zúñiga *et al.*, 2009). Entonces, se puede asociar la diversidad morfológica que presentan las especies analizadas como respuestas a los factores ambientales y eso puede llegar a ser observado los individuos de *Q. acutifolia* y *Q. calophylla* en el predio de Los Ocotones, ya que estos presentaron dos morfotipos, los cuales pudieron ser separados morfológicamente, sin embargo, genéticamente no mostraron diferencias significativas para ser considerados como taxa distintos.

#### **8.2.4. Reconocimiento del individuo híbrido en el predio Los Ocotones**

Es poco el conocimiento sobre las especies de *Quercus* en México, debido a su amplia distribución, alta variabilidad morfológica y sobre todo, la alta frecuencia de hibridación entre especies, lo cual ha sido detectado a través de características morfológicas y marcadores moleculares (Van Valen, 1976; Bacon y Spellenberg, 1996; Valencia-Ávalos, 2004; González-Rodríguez y Oyama, 2005; Tovar-Sánchez y Oyama, 2004; Zúñiga *et al.*, 2009; Albarrán-Lara *et al.*, 2010; Núñez-Castillo *et al.*, 2011; Dorado y Rangel, 2014, Valencia-Cuevas *et al.*, 2015). *Quercus* L. ha sido propuesto como un género relevante para entender cómo la hibridación y la introgresión influyen en la evolución de las plantas (Gil-Pelegrin *et al.*, 2017). Los individuos híbridos generalmente presentan características físicas intermedias entre las dos o más especies que les dieron origen, lo cual dificulta su taxonomía (Valencia-Ávalos, 2004; González-Rodríguez y Oyama, 2005; Zúñiga *et al.*, 2009; Albarrán-Lara *et al.*, 2010; Núñez-Castillo *et al.*, 2011; Dorado y Rangel, 2014, Valencia-Cuevas *et al.*, 2015).

En esta investigación llama la atención que en las tres reconstrucciones filogenéticas de ADN cloroplástico, el individuo híbrido *Q. peduncularis* x *glaucescens*

muestra una agrupación peculiar, ya que en la reconstrucción filogenética del marcador MatK, este se encuentra agrupado con las especies del clado B (sección *Lobatae*), y en la reconstrucción filogenética del marcador CD\_CD, este se encuentra agrupado con las especies del clado A (sección *Quercus*), donde también se encuentran las dos especies parentales sugeridas (*Q. peduncularis* Née, y *Q. glaucescens* Humb.). Sin embargo, en la reconstrucción filogenética realizada mediante la concatenación de ambas secuencias de ADN cloroplástico, este se encuentra en un haplotipo y/o clado intermedio entre ambas secciones, lo cual sugiere que el individuo ID. 35, además de ser híbrido entre las dos especies parentales de la sección *Quercus*; este también posee información genética de otras especies de la sección *Lobatae*, con ello se confirma que la amplia variedad morfológica que este individuo presenta (analizada en la sección de morfología), es resultado del flujo de genes e hibridación entre varias especies del predio Los Ocotones.

A pesar de la ocurrencia de hibridación entre especies de encinos, la creación de una nueva especie por hibridación es poco común, por lo cual, detectar el fenómeno de hibridación es poco probable (Dorado y Rangel, 2014). Hasta el año 2015, en México sólo se reconocen cuatro casos de especies híbridas formales en *Quercus* (Valencia-Cuevas *et al.*, 2015), ya que la mayoría de los híbridos de roble son producidos de forma aislada y esporádica, y por lo regular son eliminados a través de la selección natural (Bacilieri *et al.*, 1995; Valencia-Ávalos, 2004). De acuerdo con Klier *et al.*, (1991) y Tovar-Sánchez y Oyama (2004), las zonas híbridas con altos niveles de perturbación son las que presentan mayor número de individuos híbridos (en su mayoría juveniles). Los disturbios producidos por actividades humanas como la tala, la deforestación, los incendios y la agricultura, pueden mejorar el establecimiento de híbridos ya que modifican las barreras reproductivas (Bacilieri *et al.*, 1995; Encina y Villarreal, 2002; Romero *et al.*, 2015). En esta perspectiva la presencia del individuo híbrido ID. 35 identificado como *Q. peduncularis* x *glaucescens*, y con características de más especies de otra sección en la que se encuentran sus parentales, puede deberse a una respuesta ambiental de las condiciones geográficas del predio, y los posibles efectos que el manejo forestal del MDS tiene en el predio, tal y como lo que sucede con la presencia de morfotipos en las especies de *Q. acutifolia* y *Q. calophylla*.

La hipótesis de hibridación y de introgresión de Bacilieri *et al.* (1995) plantea que las poblaciones actuales mezcladas pueden contener un número de individuos introgresivos distribuidos a lo largo del rango ecológico y morfológico. La hibridación biológica promueve la diversidad del acervo genético al originar genotipos nuevos en las poblaciones de las especies involucradas (Dorado y Rangel, 2014), siempre y cuando los híbridos se puedan establecer y reproducir con las especies parentales, mediante el proceso de introgresión (retro cruces), infiltrando de esta manera fragmentos del genoma de una especie a otra (Grant, 1989; Bacon y Spellenberg, 1996; López de Heredia 2013), tal y como fue documentado en *Q. crassifolia* y *Q. crassipes* (Tovar-Sánchez y Oyama, 2004). Es necesario realizar un estudio exhaustivo para encontrar más individuos híbridos *Q. peduncularis x glaucescens*, así como de las especies parentales, y de esta manera corroborar que el individuo ID. 35 no es resultado de una hibridación esporádica y pueda ser reconocido formalmente, sin embargo, este tema excede los objetivos planteados en la presente investigación, por lo cual se sugiere realizar una investigación enfocada a estudiar este fenómeno.

#### **8.2.5. Reconocimiento del Flujo de genes en el predio Los Ocotones**

También, llama la atención que en las cuatro reconstrucciones filogenéticas analizadas (ADN cloroplástico y ADN ribosomal nuclear), el individuo ID. 9 identificado como *Q. peduncularis* no se agrupa con los individuos de su misma especie o sección, sino que se agrupa con las especies de la sección *Lobatae* dentro del clado B (Figuras 10-17). Asimismo, llama la atención que a pesar de que en las tres reconstrucciones filogenéticas de ADN cloroplástico analizadas, el individuo ID. 24 identificado como *Q. acutifolia* mfsp.2, se agrupa con los individuos de su misma sección, en la reconstrucción filogenética del ADN ribosomal nuclear, no que se agrupa con los individuos de su misma especie, sino que se agrupa con individuos de *Q. calophylla* mfsp.1, *Q. calophylla* mfsp.2 y *Q. sapotifolia* (Figuras 10-17).

En su estudio Ruíz-Domínguez (2016) tres individuos de *Q. laurina* no se agruparon como una misma especie en los árboles filogenéticos realizados. Lo mismo se observó para los individuos de *Q. crispipilis*, por lo cual propone que esto puede ser el resultado de una determinación fenotípica errónea, o incluso pueden ser híbridos

(Ruíz-Domínguez, 2016). Sin embargo, la explicación que mejor responde las agrupaciones de *Q. peduncularis* (ID. 9) y *Q. acutifolia* mfsp.2 (ID. 24) con otros individuos distintos a la especie que fueron asignados, puede ser el flujo genético, el cual es un fenómeno común en los robles (*Quercus spp.*), el cual puede ocurrir simultáneamente en diferentes especies (Campbell y Reece, 2007; Valencia-Cuevas *et al.*, 2015). El flujo genético es definido como el proceso de transferencia de genes entre dos o más especies (Curtis y Schnek, 2006).

Algunos estudios con marcadores moleculares revelan que existe baja diferenciación poblacional en algunas especies de encinos, lo que sugiere un elevado flujo génico (vía polen) entre poblaciones (Petit *et al.*, 2003; González-Rodríguez y Oyama, 2005). Esto implica que una gran proporción de la variación genética total de la especie puede encontrarse dentro de cualquier población y por esta razón, puede esperarse un amplio intervalo de variación fenotípica con base genética entre individuos, aun cuando las características morfológicas puedan estar sujetas a restricciones del desarrollo y del ambiente (Bruschi *et al.*, 2003; Seehausen, 2004). El rol de la transferencia horizontal de genes mediante el flujo génico se reconoce cada vez más como un factor en la capacidad de los organismos de larga vida para adaptarse a nuevos o entornos cambiantes (Cavender-Bares, 2018). Respecto a esto, el flujo de genes interespecíficos puede contribuir a la adaptación y al mantenimiento de una alta diversidad genética dentro de las poblaciones. El mantenimiento de alta variación genética y la capacidad de evolución de rasgos funcionales críticos, junto con la variación plástica, son mecanismos probables que contribuyen a la persistencia de especies a largo plazo más de lo que la adaptación a condiciones muy locales hace (Cavender-Bares, 2018).

En este sentido también se puede ver que las agrupaciones de *Q. peduncularis* (ID. 9) y *Q. acutifolia* mfsp.2 (ID. 24) con otros individuos distintos a sus especies reconocidas, así como también la evidencia que el individuo híbrido ID. 35 identificado como *Q. peduncularis* x *glaucescens* presenta características morfológicas y genéticas de más especies presentes en el predio Los Ocotones, comprende situaciones ecológicas que implican el estudio del flujo genético entre las especies analizadas, lo cual excede los objetivos planteados en la presente

investigación. Dependiendo de la amplitud del flujo de genes interespecífico, una serie de implicaciones evolutivas y ecológicas podrían afectar a este grupo de especies (Bacilieri *et al.*, 1995; Seehausen, 2004; López de Heredia, 2013). Dichos objetivos pueden ser objeto de estudio en investigaciones futuras, sin embargo, la información aquí presentada puede ser utilizada como base para estudios futuros sobre biosistemática y evolución de los encinos del predio.

### **8.3. Ecología y conservación de las especies de *Quercus* presentes en el predio**

Las especies de *Quercus* muestran amplia variación morfológica y adaptativas (Pérez-Ramos *et al.*, 2014), lo cual les ha permitido habitar una gran diversidad de espacios geográficos y condiciones ecológicas (Romero *et al.*, 2015). La riqueza de especies de encinos suele ser variable a lo largo de su distribución, y esta se encuentra estrechamente relacionada con el entorno en el que se desarrollan, ya que los sitios que poseen una mayor diversidad de hábitats con variaciones ecológicas son propicios para el desarrollo de un mayor número de especies (Cavender-Bares, 2016; Encina y Villarreal, 2002). En Estados Unidos, particularmente en Florida, la diversidad de robles es considerada alta, ya que en este estado se han registrado un total de 26 especies, de las cuales 17 especies coexisten en el norte del estado (Cavender-Bares *et al.*, 2006). En México, en algunos estados el número de especies es relativamente mayor, por ejemplo, Encina y Villarreal (2002), reportaron 31 especies de *Quercus* (incluyendo tres variedades) en el estado de Coahuila, lo cual lo atribuyen a la posición geográfica y tamaño del estado, pero principalmente la fisiografía irregular que ocasiona la presencia de una serie de sierras aisladas, cuyas altitudes medias fluctúan entre 1,000-2,500 m, pero alcanzan elevaciones de hasta 3,600 metros sobre el nivel del mar.

En México, Nixon (1993), considera a las montañas del centro y el este de México como centros de diversificación del género. Asimismo, Valencia-Ávalos (2004), indica que el estado con mayor riqueza en el país es Oaxaca, y debe su alta riqueza específica gracias a su compleja fisiografía, la cual está determinada por la confluencia de cadenas montañosas tales como la Sierra Madre Occidental, parte del Eje Volcánico Transversal, la Sierra Madre del Sur y la Sierra Madre de Chiapas (los

últimos dos, también para Chiapas), de esta manera ambos estados gozan de una posición geográfica de alta importancia que alberga una de las más elevadas diversidades de ecosistemas en todo Mesoamérica y Norteamérica (Valencia-Ávalos, 2004).

El registro más reciente de encinos presentes en México de Villaseñor (2016), reportó un total de 174 especies para el país. De acuerdo con Valencia-Ávalos, (2004), en el estado de Chiapas se distribuyen 44 especies. Para el predio forestal Los Ocotones, Martínez-Meléndez (2012) y en el Plan Maestro Los Ocotones (PMLO, 2013), sugieren la presencia de siete especies de encinos, mientras que Martínez-Meléndez y López-Santiago (2019), sugieren 12 especies de encinos. No obstante, en este estudio se registraron formalmente a 10 especies, además de una morfoespecie para *Q. calophylla* y otra para *Q. acutifolia*, así como un individuo producto de la hibridación *Q. peduncularis* x *glaucescens*, con lo cual se propone que en el predio Los Ocotones coexisten 13 taxa del género. La presencia los 13 taxa de *Quercus* en la zona de estudio probablemente está determinado por la heterogeneidad del relieve del predio y por su ubicación en la parte media de la cadena montañosa de la Sierra Madre de Chiapas (PMLO, 2013), lo que hace que Los Ocotones sea un sitio idóneo para albergar una gran riqueza de encinos (Cruz-Jiménez, 2021).

Los robles son un componente dominante en los bosques de montaña y bosques secos de tierras bajas en México, y se encuentran entre los árboles más importantes para el sustento rural, principalmente debido a su amplio uso como leña y madera (Oldfield y Eastwood, 2007; Romero *et al.*, 2015). En Estados Unidos y en México, los robles son el género que posee la mayor riqueza de especies en sus bosques, gracias a su aprovechamiento, los robles se encuentran entre los cinco géneros con mayor riqueza de especies de árboles forestales (Cavender-Bares, 2016). Tanto *Q. peduncularis* y *Q. sapotifolia* son unos de los mejores árboles del país para la leña, debido a su alta densidad y la facilidad con que se puede cortar y dividir, así como su lento ritmo de quema y buena producción de calor (Oldfield y Eastwood, 2007).



En todo el mundo, muchas especies de robles están en peligro de extinción, debido a que, durante los últimos 200 años grandes áreas de bosques de encino en las tierras altas de México y América Central han sido despejados para realizar cafetales y pastoreo de ganado, así como sobreexplotación de madera, leña y carbón, y cosecha no sostenible, por lo tanto, es posible que varias especies de encinos estén en una condición de vulnerabilidad (Oldfield y Eastwood, 2007). A pesar de ello, el estado de conservación de las especies de robles es poco conocido en varias partes del mundo. Por ejemplo, a pesar de que especialistas consideran a México como el centro de diversificación de género (Valencia-Ávalos, 2004; Romero *et al.*, 2015), en México actualmente aún no hay certeza del número exacto de especies para el género, y además no existen datos suficientes sobre la abundancia y distribución para muchas especies descritas como para ubicarlas en alguna categoría de riesgo (Oldfield y Eastwood, 2007). Como muestra de ello, se puede observar que tanto en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001 y la NOM-059-SEMARNAT-2010, no incluyen a ninguna especie de *Quercus* (SEMARNAT, 2002; SEMARNAT, 2010). Por su parte, la modificación y actualización del Anexo Normativo III de la NOM-059-SEMARNAT-2010 de 2019 (SEMARNAT, 2019), incluye únicamente a *Quercus macdougallii* Martínez. en la categoría de riesgo Amenazada (A), sin embargo, esta especie no se encuentra registrada en el predio de Los Ocotones.

A pesar de la falta de información por parte del gobierno mexicano, podemos utilizar a estudios de otras partes del mundo que nos ayuden a conocer el estado de conservación de las especies. Por ejemplo, el informe del estado de conservación en la naturaleza de los robles en todo el mundo del 2007, de la Unión Internacional para La conservación de la Naturaleza (IUCN por sus siglas en inglés), considera a cuatro especies de *Quercus* presentes en el predio: *Q. calophylla* Née (antes *Q. candicans*; Valencia-Ávalos *et al.*, 2018), *Q. elliptica* Née, *Q. sapotifolia* Liebm. y *Q. peduncularis* Née. en un estado de conservación de preocupación menor (LC), no obstante, considera a *Q. vicentensis* Trel. dentro de la lista de robles amenazados globalmente, calificando su estado de conservación como Vulnerable (VU) (Oldfield y Eastwood, 2007).

Actualmente, la Lista Roja de Especies Amenazadas de la IUCN (IUCN, 2022) considera siete especies de *Quercus* presentes en el predio: *Q. calophylla* Trel., *Q. elliptica* Née., *Q. sapotifolia* Liebm. *Q. scytophylla* Liebm. *Q. glabrescens* Benth. *Q. glaucescens* Humb., y *Q. peduncularis* Née. como especies con un estado de conservación de preocupación menor (LC). Sin embargo, considera a: *Q. acutifolia* Née., *Q. rubramenta* Trel., y *Q. vicentensis* Trel (dos especies más en comparación con el listado de 2007) en un estado de conservación Vulnerable (VU) (IUCN, 2022). Cabe aclarar que la Lista Roja de Especies Amenazadas de la IUCN considera a un taxón como Preocupación Menor (LC) cuando la evidencia indica que los taxones son abundantes, sin embargo, considera como Vulnerable (VU) a un taxón cuando la evidencia indica que enfrenta un alto riesgo de extinción en la naturaleza (IUCN, 2022).

En relación con este tema, se tiene conocimiento que, durante los primeros años, el manejo forestal sustentable del predio particular Los Ocotones contaba con la comercialización de carbón vegetal obtenido de encinos (*Quercus* spp.), sin embargo, las carboneras con las que contaba el predio fueron derribados por un sismo en el 2017, por lo que desde entonces dejaron de aprovechar los encinos para ese fin (PMLO, 2013; Caballero *et al.*, 2017; Martínez-Meléndez *et al.*, 2021), por lo cual es posible que durante los años de aprovechamiento de carbón de los encinos haya tenido efecto en la abundancia de los mismos en el predio Los Ocotones. Los estudios de Cruz-Jiménez (2021) y Martínez-Meléndez *et al.*, (2022), han demostrado que el manejo forestal del predio permite la presencia de al menos cinco especies de encinos *Q. calophylla* Schldl. *Q. elliptica* Née, *Q. glaucescens* Bonpl., *Q. peduncularis* Née, y *Q. sapotifolia* Liebm. Por lo cual, es probable que estas cinco especies toleren la perturbación que implica MDS aplicado hasta el momento, sin embargo, es necesario realizar un estudio específico para ver lo que sucede con las demás especies, el cual podría ser un aspecto que debería ser considerado y abordado en estudios futuros.

Respecto al efecto de la intensidad del manejo forestal en el predio, Martínez-Meléndez (2022) señala que hasta ahora el aprovechamiento forestal no ha tenido un impacto negativo en la riqueza efectiva de especies de árboles en los sitios muestreados, sin embargo, la estructura arbórea sí presenta cambios significativos, ya que la densidad de encinos pequeños y medianos fueron más altos en NT (Sin

tratamiento) y más bajos en CL (Corta de liberación) (Martínez-Meléndez, 2022). Esto se debe a que durante las intervenciones del método de desarrollo silvícola aplicado (MDS), se reduce la densidad y tamaño de los árboles, lo cual promueve la regeneración y crecimiento de las especies de interés maderable (PMLO, 2013; Martínez-Meléndez *et al.* 2021). Martínez-Meléndez *et al.* (2021), también dan a conocer que los encinos remanentes que dejan en pie durante la aplicación de los tratamientos del MDS, están funcionando como reservorios de epífitas, las cuales tienen un papel importante para mantener el ecosistema saludable (Martínez-Meléndez, 2022). Asimismo, Cruz-Jiménez (2021), en su estudio sobre el efecto de la estructura de la vegetación del predio Los Ocotones en la diversidad de aves, señala que a pesar de que los sitios sin manejo forestal presentan la mayor riqueza y diversidad de aves, la diversidad de aves no se ve afectada por la estructura de la vegetación, probablemente debido a la aplicación del manejo forestal sustentable.

Martínez-Meléndez y López-Santiago (2019), señalan que los estudios actuales sobre los encinos en Chiapas, en México y en el mundo deben ser multidisciplinarios, ya que para dilucidar y concebir el tremendo peso que los encinos tienen en la vegetación de climas templados y sub-tropicales del hemisferio boreal, nos lleva a estudiar no solo al género *Quercus*, sino también al ambiente y a la estructura de la comunidad vegetal circundante (Martínez-Meléndez y López-Santiago, 2019). De esta forma es necesario informar a las autoridades del predio para que tomen más acciones de conservación y protección para los encinos presentes en el predio, debido a su importancia ecológica como refugio de otras especies de flora amenazadas y asociadas a *Quercus*, como lo son las epífitas (Martínez-Meléndez, 2022), sugiriendo de esta manera a las autoridades del predio que el manejo forestal tome medidas de conservación especial para *Q. acutifolia*, *Q. rubramenta*, y *Q. vicentensis*, ya que la lista de robles amenazados de la IUCN los considera en un estado de conservación Vulnerable (VU) (IUCN, 2022). Tal y como lo que se realiza dentro de áreas protegidas de La Reserva de la Biosfera El Triunfo con la especie de roble *Q. benthamii*, la cual se encuentra globalmente amenazada (Oldfield y Eastwood, 2007).

## IX. CONCLUSIONES

- Los análisis de descripción taxonómica morfológica cualitativa, permitieron identificar formalmente a 10 especies para el predio Los Ocotones. También se reconocieron dos morfotipos y un individuo posiblemente híbrido, que se tomaron como unidades taxonómicas operativas (taxa) adicionales a las 10 especies formalmente reconocidas, de esta manera son 13 el número de especies potenciales en Los Ocotones.
- Esta investigación adiciona dos nuevos registros de encinos para el predio: *Q. glabrescens* Benth. y *Q. rubramenta* Trel.
- El análisis estadístico indica una amplia variación morfométrica y traslape de las nueve variables morfométricas en los 13 taxa, a pesar de ello, permite distinguir con fiabilidad algunas especies. El análisis discriminante a partir de medias aritméticas resultó efectivo para separar claramente a cinco taxa: *Q. acutifolia* mfsp.2, *Q. calophylla* mfsp.1 y mfsp.2, *Q. rubramenta* y *Q. scytophylla*, y en menor grado a dos taxa más: *Q. acutifolia* mfsp.1 y *Q. glaucescens*.
- Los caracteres más útiles para separar las especies fueron (LL), (LP), (LTH), (LL/AM) y (LBAM\*100/ LTH).
- El análisis de funciones discriminantes sugiere que el individuo híbrido *Q. glaucescens* x *peduncularis*, es morfométricamente más parecido a *Q. peduncularis*.
- La amplia variación foliar (variación fenotípica) puede ser atribuido a la plasticidad fenotípica, en respuesta al estrés hídrico, grado de exposición, entre otros factores ambientales. La variación foliar tiene un componente genético probablemente igual de importante que el ambiental, ya que se observó que cada árbol presentó un genotipo distinto. La interacción genotipo ambiente puede tener un efecto mayor en *Quercus calophylla*, así como *Q. acutifolia*, ya que a ambas se proponen dos morfoespecies.
- En las 99 secuencias amplificadas, la primera especie con mayor porcentaje de identidad en el GenBank, es distinta a las determinaciones hechas previamente

en esta investigación. Únicamente 37 secuencias (de los marcadores MatK, ITS 1-2 e ITS 3-4), coinciden con secuencias de la misma especie o con las especies: *Q. acutifolia*, *Q. candicans* (sinonimia de *Q. calophylla*) y *Q. elliptica*, las cuales se encuentran presentes en el predio. Cabe destacar, que con el marcador ITS 1-2, en 16 de 24 secuencias analizadas y con un porcentaje de identidad (>91.32%) hubo consistencia, entre la especie identificada en campo con la ubicada en el GenBank.

- Se lograron identificar cinco haplotipos para el marcador CD\_CD (tRNL), seis haplotipos para el marcador Maturase K (MatK), ocho haplotipos para los marcadores de cloroplasto concatenados y 21 para los marcadores de ribosomales nucleares ITS 1-2 e ITS 3-4 concatenados. El alto número de haplotipos observados validan el uso de los marcadores de cloroplasto y ribosomal-nuclear, como herramienta para estudios filogenéticos.
- *Q. acutifolia* *mfsp.* 1 puede ser considerada como el taxa con mayor diversidad genética cloroplástico, debido a que posee tres haplotipos.
- Los análisis de identidad filogenética son congruentes con la asignación taxonómica a nivel de subgénero, ya que lograron separar a los 13 taxa en los subgéneros: *Lobatae* y *Quercus*. Sin embargo, no son congruentes con la asignación taxonómica a nivel de especie.
- La reconstrucción filogenética a partir de secuencias de ADN cloroplástico y ADN ribosomal nuclear, permitió separar a *Q. elliptica*, *Q. sapotifolia* y *Q. scytophylla*. Sin embargo, *Q. scytophylla* es el único taxa que pudo ser distinguido tanto genéticamente como morfológicamente de los demás taxa analizados.
- Se puede asociar la diversidad morfológica que presentan las especies analizadas como respuestas a los factores ambientales y eso puede llegar a ser observado en los individuos de *Q. acutifolia* y *Q. calophylla* en el predio Los Ocotones, ya que estos presentaron dos morfotipos, los cuales pudieron ser separados morfológicamente, sin embargo, genéticamente no mostraron diferencias significativas para ser considerados como taxa distintos.

- Se encontró que de acuerdo con la Lista Roja de Especies Amenazadas de la IUCN actual, tres taxa de *Quercus* presentes en el predio: *Q. acutifolia* Née., *Q. rubramenta* Trel., y *Q. vicentensis* Trel (dos especies más en comparación con el listado de 2007) están considerados en un estado de conservación Vulnerable (VU) (IUCN, 2022).

## X. RECOMENDACIONES

- Analizar un mayor número de hojas por cada individuo, y un mayor número de individuos de cada especie, con el fin de reducir el sesgo de medición.
- Utilizar otros caracteres morfológicos diagnóstico para separar mejor a las especies que se empalman morfométricamente, o bien, realizar estudios complementarios sobre morfometría geométrica, tal y como realizaron Liu *et al.* (2018).
- Analizar un mayor número de individuos para cada taxa, así como realizar estudios de genética de poblaciones de manera individual para cada taxa, con el fin de estimar la viabilidad de estas.
- Utilizar un mayor número de marcadores moleculares para lograr una mejor separación y delimitación de especies, tal como lo realizaron Yang *et al.* (2017).
- Realizar un estudio que permita confirmar la potencial hibridación entre *Q. peduncularis x glaucescens* y de esta manera corroborar que el individuo ID. 35 es resultado de una hibridación y pueda ser reconocido formalmente.
- Se recomienda realizar un análisis enfocado en el estudio del flujo genético de *Q. peduncularis* (ID. 9), *Q. acutifolia* mfsp.2 (ID. 24) y el híbrido *Q. peduncularis x glaucescens* (ID. 35) para comprender la razón por la cual presentan características genéticas de más especies presentes en el predio, o bien, están más emparentados con otros individuos distintos a sus especies reconocidas.
- Se sugiere que el manejo forestal incluya medidas de propagación y establecimiento especial para las especies vulnerables (VU): *Q. acutifolia*, *Q. rubramenta* y *Q. vicentensis* dentro de áreas protegidas.
- Se propone realizar una revisión a los documentos de la certificación del predio, por parte de la Rain Forest Alliance de 2012, para incluir la conservación de los fragmentos de encinares (Martínez-Meléndez Manuel, com. pers.).
- De igual importancia, consideramos que las áreas sin tratamiento son una prioridad para el bienestar del predio y para la conservación de especies relacionadas y dependientes de los árboles de *Quercus* como las epífitas vasculares y las aves (Martínez-Meléndez, 2022).

## XI. REFERENCIAS DOCUMENTALES

- Albarrán-Lara, A. L., Mendoza-Cuenca, L., Valencia-Ávalos S., González-Rodríguez A., y Oyama, K. 2010. Leaf fluctuating asymmetry increases with hybridization and introgression between *Quercus magnoliifolia* and *Quercus resinosa* (Fagaceae) through an altitudinal gradient in México. *International Journal of Plant Sciences*. Pp 171(3):310–322.
- Álvarez, I., y Wendel, J. F. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Journal Molecular Phylogenetics and evolution*. 29 (3): 417-434.
- Álvarez-Moctezuma, J. G., Ochoa-Gaona, S., de Jong, B. H. J. y Soto-Pinto, M. L. 1998. Hábitat de las especies del género *Lepidobalanus* (*Quercus* spp. Fagaceae) en la meseta central de Chiapas, México. 48 pp.
- Arriaga, L.C., Espinoza, J. M., Aguilar, C. Z., Martínez, E. R., Gómez, L. M., y Loa, E. L. 2000. Regiones terrestres prioritarias de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México City.
- Bacilieri, R., Ducouso, A. y Kremer, A. 1995. Genetic, morphological, ecological and phenological differentiation between *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L. in a mixed stand of northwest of France. *Silvae Genetica Journal* 44:1-10.
- Bacon, J. R., y Spellenberg R. 1996. Hybridization in two distantly related Mexican black oaks *Quercus conzattii* and *Quercus eduardii* (Fagaceae: *Quercus*: section *Lobatae*). *Journal SIDA Contributions to Botany*. 17(1): 17–41.
- Baranski, M. 1975. An analysis of variation within white oak (*Quercus alba* L.). North Carolina. *Agric. Exp. Sta. Tech. Journal Bull*. No. 236.
- Barrientos-Llosa, Z. 2003. Zoología General. Editorial Universidad Estatal a Distancia EUNED. San José Costa Rica. 507 pp.
- Bellarosa, R., Simeone, M. C., Papini, A., y Schironea, B. 2005. Utility of ITS sequence data for phylogenetic reconstruction of Italian *Quercus* spp. *Journal Molecular Phylogenetics and Evolution*. 34: 355–370.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. y Stryer, L. 2007. Bioquímica. Editorial Reverté, Sexta edición. Barcelona, España. 1026 pp.



- Blue, M. P. y Jensen, R. J. 1988. Positional and seasonal variation in oak (*Quercus*: Fagaceae) leaf morphology. *American Journal of Botany* 75:939–947.
- Bonfil, C. 1993. Del herbario, la riqueza de encinos. *Revista ciencias*. 29: 13-15.
- Borek, K. y Silvieus, S. 2009. DNA Barcoding of *Quercus* sp. at Pierce Cedar Creek Institute Using the MatK Gene. Aquinas College. Biology Department. 12 pp. Grand Rapids. Michigan. EE. UU.
- Benson D. A., Cavanaugh M., Clark K., Karsch-Mizrachi I., Lipman D. J., Ostell J. y Sayers E. W. (2013). GenBank. *Nucleic Acids Res. Journal D36–D42 Vol. 41, Database issue*.
- Breedlove, D. 1981. Flora of Chiapas. Part I: Introduction to the Flora of Chiapas. California Academy of Sciences, San Francisco, California, EU.
- Bruschi, P., Grossoni, P., y Bussotti, F. 2003. Within and among tree variation in leaf morphology of *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. Natural populations. *Revista Trees* 17: 164-172.
- Bruschi, P, Vendramin, G. G., Bussotti, F., y Grossoni, P. 2000. Morphological and molecular differentiation between *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus pubescens* Willd. (Fagaceae) in Northern and Central Italy. *Ann Bot.* 85:325–333
- Caballero, R. A., Farrera, V. N., Nájera Aguilar, H. A., y Tejeda C. C. 2017. Sustentabilidad de la Unidad de Manejo Forestal Los Ocotones, en Cintalapa, Chiapas, México. *Lacandonia Revista de Ciencias de la UNICACH*. 2 (1): 63-72.
- Campbell Neil A., Reece Jane B. 2007. Biología. Séptima edición. Editorial Médica Panamericana, 1532 pp.
- Castro-Campillo, A., Ramírez-Pulido, J., y López-Ochoterena E. 1994. El concepto de especie, las escuelas de sistemática. *Revista Mexicana de Historia Natural*. 12 pp.
- Cavender-Bares, J., Keen, A., y Miles, B. 2006. Phylogenetic structure of Floridian plant communities depends on taxonomic and spatial scale. *Revista Ecology* 87: S109–S122.

- Cavender-Bares J. 2016. Diversity, distribution and ecosystem services of the North American oaks. *Revista International Oaks* 27: 37–49.
- Cavender-Bares J. 2018. Diversification, adaptation, and community assembly of the American oaks (*Quercus*), a model clade for integrating ecology and evolution. *Revista New Phytologist*. 221: 669–692.
- CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America PNAS Journal*. 106 (31):12794-12797.
- China Plant BOL Group. 2011. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America PNAS journal*. 108 (49): 19641–19646.
- Cruz-Jiménez, M. F. 2021. Efecto de la estructura de la vegetación de un bosque con manejo forestal en la diversidad de aves. Tesis de Licenciatura. Instituto de Ciencias Biológicas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.
- Curtis, H., Schnek, A., Barnes, N. S., y Massarini, A. 2008. Curtis Biología. Séptima Edición en español. Editorial Médica Panamericana. Santiago de Chile. Chile. 451 pp.
- Dorado R. O., y Rangel, A. G. 2014. Cruza entre plantas: Hibridación. *Hypatia, Revista de divulgación científico-tecnológica del estado de Morelos*. México.
- Doyle, J. J. y Doyle J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, vol. 19, pp 11-15. Método de extracción CTAB 2X, modificado para hojas de *Quercus* 2019. Laboratorio de genética, El Colegio de La Frontera Sur ECOSUR. 2 pp.
- Encina Domínguez, J. A., y Villarreal Quintana, J. A. 2002. Distribución y aspectos ecológicos del género *Quercus* (*Fagaceae*), en el estado de Coahuila, México. *Revista Polibotánica* 13:1-23.
- Erlich, A. H. y Arnheim, N. 1992. Genetic analysis using the polymerase chain reaction. *Revista anual Genetic*. 26: 479-506.

- Espinosa Asuar L. 2007. Guía práctica sobre la técnica de PCR. En: Eguiarte, L., Souza, V. y Aguirre, X. (Eds.). Ecología molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad e Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, D. F., México, pp. 517-526.
- GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> Consultado el 22 de abril de 2022.
- Gernandt, D. S., Zerón Flores, O. y Goyenechea, I., 2007. Inferencia Filogenética mediante secuencias de DNA: Un ejemplo con los pinos piñoneros. En: Contreras-Ramos, A., Cuevas Cardona, C., Goyenechea, I., Iturbe, U. (Eds.) La sistemática, base del conocimiento de la biodiversidad. Editorial Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México. pp. 55-65.
- Gil-Pelegrin, E., Peguero-Pina, J. J. y Sancho-Knapik D. 2017. Capítulo 1. Oaks and People: A Long Journey Together. En: Gil-Pelegrin, E., Peguero-Pina, J. J., y Sancho-Knapik D. (Eds.). Oaks Physiological Ecology. Exploring the Functional Diversity of Genus *Quercus* L., *Tree Physiology Journal*. 7: 01-12.
- González-Bueno, A. 1998. Historia de la ciencia y de la técnica. Los sistemas de clasificación de los seres vivos. Editorial Akal. Madrid, España. Pp. 7-8.
- González-Rodríguez, A., Bain J. F., Golden, J. L. y Oyama, K. 2004. Chloroplast DNA variation in the *Quercus affinis* - *Q. laurina* complex in Mexico: geographical structure and associations with nuclear and morphological variation. *Revista Molecular Ecology* 13: 3467-3476.
- González-Rodríguez, A. y Oyama, K. 2005. Leaf morphometric variation in *Quercus affinis* and *Q. laurina* (Fagaceae), two hybridizing Mexican red oaks. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 147, 427–435.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball S. L, y deWaard, J. R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. The Royal Society London. B. Journal*. 270, 313–321.
- Hilu, K. W., Borsch, T., Muller, K., Soltis, D. E., Soltis P.S., Savolainen, V., Chase M.W., Powell, M. P., Alice, L.A., Evans, R., Sauquet, H., Neinhuis, C., Slotta T., Rohwer, J. G., Campbell, C. S., y Chatrou, L. W. 2003.

Angiosperm Phylogeny Based on MatK Sequence Information. *American Journal of Botany* 90(12): 1758-1776.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). 2000. Carta geológica escala 1: 250 000, Clave Juchitán E15-10, D15-1. 1 pp.

IUCN. 2022. The IUCN Red List of Threatened Species. Versión 2021-3. <https://www.iucnredlist.org/>. Consultado el 29 de abril de 2022.

Kaul, R. B. 1985. Reproductive morphology of *Quercus* (Fagaceae). *American Journal of Botany*. 72(2):1962-1977.

Kimura, M. 1980. A simple method estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*. 16: 111-120.

Klier, K., Leoschke, M. J. y Wendel, J. F. 1991. Hybridization and introgression in white and yellow ladyslipper orchids (*Cypripedium candidum* and *C. pubescens*). *Journal of Heredity*. 82: 305–319.

Li, X. W., Yang, Y., Henry, R. J., Rossetto, M., Wang, Y. T., y Chen, S. L. 2015. Plant DNA barcoding: from gene to genome. *Journal Biol. Rev.* (90): 157–166.

Librado, P. y Rozas J. 2009. DNASp V5. A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics Journal*. 25: 1451-1452.

Liu, Y., Li, Y., Song, J., Zhang, R., Yan, Y., Wang, Y. y Du, F. K. 2018. Geometric morphometric analyses of leaf shapes in two sympatric Chinese oaks: *Quercus dentata* Thunberg. and *Quercus aliena* Blume. (Fagaceae). INRA and Springer-Verlag France SAS, part of Springer Nature. *Journal Annals of Forest Science* (2018) 75: 90

Leray, M., Knowlton, N., Shian-Lei H., Nguyen, B. N., y Machida R. J. 2019. GenBank is a reliable resource for 21st century biodiversity research. *Journal PNAS*. 6 pp.

López de Heredia, U., Sánchez, H., y Soto, A. 2013. Direccionalidad de la hibridación e introgresión de encina (*Quercus ilex* L.) y alcornoque (*Quercus suber* L.) 6to Congreso Forestal Español. Grupo de Investigación de Genética y Fisiología Forestal. E.T.S. de Ingenieros de Montes. Universidad Politécnica de Madrid.

- Los Ocotones. 2018. Conjunto predial Los Ocotones Cintalapa, Chiapas, Renovando para el futuro. <http://www.ocotones.org>. Consultado el 31 de agosto del 2020.
- Martínez-Cabrera, D., Terrazas, T. y Zavala-Chávez F. 2003. Arquitectura foliar y anatomía de la corteza y de la madera de *Quercus sartorii* y *Q. xalapensis* (Fagaceae). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 73: 63-72.
- Martínez-Castilla, L. 2007. Capítulo 4. Reconstrucción de la historia de cambio de los caracteres. En: Eguiarte, L. E., Souza, V. y Aguirre, X. (Eds). Ecología molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. pp. 87-160.
- Martínez-López, O. G. 2015. La taxonomía integral y su importancia para la conservación. 6. Unidad para el Conocimiento, Uso y Valoración de la Biodiversidad, Centro de Estudios Conservacionistas (CECON). Universidad de San Carlos de Guatemala. 6: 54-64.
- Martínez-Meléndez, N. 2012. Comunidades epífitas en un bosque de coníferas con aprovechamiento forestal, Chiapas, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias biológicas. Universidad de Ciencias y artes de Chiapas, México.
- Martínez-Meléndez, N. y López-Santiago, J. W. (2019) - Diversidad de encinos en un refugio de la Sierra Madre de Chiapas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. *Revista Desde el Herbario CICY*. 11: 102–107.
- Martínez-Meléndez, N., Ramírez-Marcial, N., Martínez-Zurimendi, P., Cach-Pérez, M. J., y García-Franco, J. G. 2021. How Timber Harvest Affects the Structure and Diversity of a Montane Forest in Southern Mexico. *Journal Forest*, 12, 895.
- Martínez-Meléndez, N., Ramírez-Marcial, N., García-Franco, J. G., Cach-Pérez, M. J., y Martínez-Zurimendi, P. 2022. Importance of *Quercus spp.* for diversity and biomass of vascular epiphytes in a managed pine-oak forest in Southern Mexico. *Journal Forest Ecosystems* (9): 12 pp.

- Marzocca, A. 1985. Nociones básicas de taxonomía vegetal. Instituto Interamericano de cooperación para la agricultura. San José Costa Rica. pp. 7-48.
- Matesánz, S. y Valladares, F. 2013. Capítulo 32. El papel de la plasticidad fenotípica en la respuesta de la vegetación mediterránea al cambio climático. En: Herrero A., Zavala M. A., (Eds.). Impactos, Vulnerabilidades y Adaptación de los Bosques y la Biodiversidad de España frente al cambio climático. MAGRAMA, Madrid, España. Pp. 377-384.
- McCarthy, C. 1998-2018. Technelysium Pty Ltd. Chromas Version 2.6.6. School of Health Science, Griffith University. Queensland, Australia.
- Nilsson R. H., Ryberg M., Kristiansson E., Abarenkov K., Karl-Henrik L., y Kõljalg, U. (2006). Taxonomic reliability of DNA sequences in public sequence databases: A fungal perspective. *Journal PLoS One Taxonomy and DNA Databases Issue 1*, e59.
- Nixon, K. C. 1993. The genus *Quercus* in Mexico Oxford, UK: Oxford University Press.
- Núñez-Castillo, S. M., Álvarez-Moctezuma, J. G., Zavala-Chávez, F. y Espinosa-Robles, P. 2011. Análisis morfológico y de hábitat en el híbrido *Quercus glabrescens* x *Q. rugosa*. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. 2(3): 83-100.
- Oldfield S. y Eastwood A. 2007. The Red List of Oaks IUCN/SSC Fauna & Flora International. Cambridge, UK. 35 pp.
- Passarge, E. 2009. Genética texto y atlas. 3a Edición. Editorial Médica Panamericana, Madrid, España. 486 pp.
- Pérez-De Castro, A. M. 2011. Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR) Artículo docente PCR. Universitat Politècnica de València. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. RiuNet repositorio UPV. <http://hdl.handle.net/10251/10700>. Consultado el 10 de marzo de 2019.
- Petit, R. J., Bodénès, C., Ducouso, A., Roussel, G. y Kremer, A. 2003. Hybridization as a mechanism of invasion in oaks. *Revista New Phytologist* 161: 151–164.

- Plan Maestro Los Ocotones. PMLO (2013) Programa de manejo forestal del predio particular Los Ocotones, municipio de Cintalapa, Chiapas. Plan Maestro Los Ocotones S.P.R. de C.V. de R.L., Chiapas, México
- POWO (2022). "Plants of the World Online. Facilitated by the Royal Botanic Gardens, Kew. Published on the Internet; <http://www.plantsoftheworldonline.org/>
- Ramírez-Valiente, J.A., Koehler K., y Cavender-Bares, J. 2015. Climatic origins predict variation in photoprotective leaf pigments in response to drought and low temperatures in live oaks (*Quercus* series *Virentes*). *Tree Physiology*. 35: 521–534.
- Red Nacional de Biobancos. 2011. PNT Protocolo de extracción de ácidos nucleicos. Instituto de Salud Carlos III. Madrid, España. 30 pp.
- Romero Rangel, S., Rojas Zenteno, E. C. y Rubio Licona, E. 2015. Encinos de México (*Quercus*, Fagaceae) 100 especies. Editorial Universidad Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala. México. D.F. Pp. 3-24.
- Ruelas Inzunza, E. 2018. El concepto de especie en Biología. Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada, Universidad Veracruzana. *Revista ciencia*. 69 (4): 22-29.
- Ruíz-Domínguez, A. C. 2016. Variación genética y morfológica de *Quercus spp.* en Chiapas, México. Tesis de Licenciatura. Instituto de Ciencias Biológicas. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.
- Rzedowski, J. 2006. Vegetación de México. Primera edición digital. Comisión Nacional Para la Conservación y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. 504 pp.
- Sabás-Rosales J., Sosa-Ramírez J. y Luna-Ruíz J. 2015. Diversidad, distribución y caracterización básica del hábitat de los encinos (*Quercus*: Fagaceae) del estado de San Luis Potosí, México. *Journal Botanical Sciences* 93 (4): 881-897.
- SEMARNAT. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-059-ECOL-2001, Protección ambiental– Especies nativas de México de flora y fauna silvestres– Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o

cambio– Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación 06 marzo, 2002.

SEMARNAT. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, Protección ambiental– Especies nativas de México de flora y fauna silvestres– Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio– Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación 30 diciembre, 2010.

SEMARNAT. 2019. Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, modificación del Anexo Normativo III, Lista de especies en riesgo de la Norma Oficial Mexicana NOM-059- SEMARNAT-2010 Protección ambiental– Especies nativas de México de flora y fauna silvestres– Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio– Lista de especies en riesgo. Diario Oficial de la Federación 14 de noviembre, 2019.

Seehausen, O. 2004. Hybridization and adaptive radiation. *Journal Trends Ecol. Evol.* 19: 198- 207

Serrato Díaz, A., Flores Rentería, L., Aportela Cortez, J., y Sierra Palacios, E. 2014. PCR: reacción en cadena de la polimerasa. En: Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos Cornejo Romero A., Serrato Díaz, A., Renón Aguilar, B., Rocha Munive, M. G., (Eds.) Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (INECC - SEMARNAT). México D.F. Pp. 53 – 73.

Simeone, M. C., Piredda, R., Papini, A., Vessella F. y Schirone, B. 2013. Application of plastid and nuclear markers to DNA barcoding of Euro-Mediterranean oaks (*Quercus*, Fagaceae): problems, prospects and phylogenetic implications. *Botanical Journal of the Linnean Society.* 172: 478–499.

Sisó, S., Camarero, J. J. y Gil-Pelegrin, E. 2001. Relationship between hydraulic resistance and leaf morphology in broadleaf *Quercus* species: a new interpretation of leaf lobation. *Journal Trees, Structure and Function* 15: 341-345.

StatPoint Technologies Inc. 1982-2012. Statgraphics Centurion XV. Statistical Exploration and Modeling Software.



- Sunderland, T. 2012. ¿Por qué la taxonomía es importante para la ciencia que estudia la biodiversidad? Sitio web: LOS BOSQUES EN LAS NOTICIAS <https://forestsnews.cifor.org/9509/que-la-taxonomia-es-importante-para-la-ciencia-que-estudia-la-biodiversidad?fnl=es> Consultado el Feb 07 2019.
- Swofford, D. L. y Bell, C. D. 2017. Phylogenetic Analysis Using PAUP version 4.0
- The Plant List 2019, a working list of all known plant species <http://www.theplantlist.org/>. Consultado el 10 de mayo del 2019
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. y Higgins, D. G. 1997. The Clustal\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25 (24): 4876-4882.
- Tovar-Sánchez, E., y Oyama, K. 2004. Natural hybridization and hybrid zones between *Quercus crassifolia* and *Quercus crassipes* (Fagaceae) in México: Morphological and Molecular Evidence. *American Journal of Botany*. 91: 1352-1363.
- Tropicos. 2019. Missouri Botanical Garden <https://www.tropicos.org/>. Consultado el 10 de mayo del 2019
- Valadez, E. y G. Kahl. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas (Teoría y protocolos de laboratorio). Universidad Autónoma Chapingo. México. 147 pp.
- Valencia-Ávalos, S. 1991. El problema de la especie. *Revista Ciencias*. No. 24. Pp. 13-22
- Valencia-Ávalos, S. 2004. Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 75: 33-53.
- Valencia-Ávalos, S. 2018. Características morfológicas generales utilizadas en la identificación de especies de encinos. Herbario de la facultad de ciencias, UNAM-Taller de identificación de encinos mexicanos, Oaxaca (Sociedad botánica de México). 19 pp. Documento inédito.
- Valencia-Ávalos, S., Flores-Franco G., Jiménez-Ramírez J. y Mora-Jarvio, M. 2017, Distribucion and diversity of Fagaceae in Hidalgo, México. *Revista Botanical Sciences*. 95 (4): 660-721.

- Valencia-Ávalos, S. y Jiménez-Ramírez J. 1991. Redescrpción de *Quercus rubramenta* (Fagaceae) una especie del estado de Guerrero (México). *Anales Inst. Biol. Univ. Nac. Autón. México. Ser. Bot.* 61(1): 5-10.
- Valencia-Cuevas, L., Mussali-Galante, P., Piñero, D., Castillo-Mendoza, E. Rangel-Altamirano, G., Tovar-Sánchez, E. 2015. Hybridization of *Quercus castanea* (Fagaceae) across a red oak species gradient in Mexico. *Journal Plant Syst Evol.* 301:1085–1097.
- Valladares, F., Vilagrosa, J., Peñuelas, R. O., Camarero, J. J., Corcuera, L., Sisó, S. y Gil-Pelegrín, E. 2004. Estrés hídrico: ecofisiología y escalas de la sequía. En: Valladares, F. (Ed.). *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante*. Ministerio de Medio Ambiente, EGRAF, S. A., Madrid. pp. 163-190
- Van-Valen, L., 1976. Ecological species, multispecies, and oaks. *Journal Taxon.* 25 (2/3): 233-239.
- Villaseñor J. L. 2016. Catálogo de las plantas vasculares nativas de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad.* 87:559–902.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. y Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. y White T. J. (Eds.) *PCR protocols: A Guide to Methods and Applications*. Part three Genetics and evolution. Ed. Academic Press Inc. pp. 315-322.
- Yang, J., Vázquez, L., Chen, X., Li, H., Zhang, H., Liu, Z. y Zhao, G. 2017. Development of Chloroplast and Nuclear DNA Markers for Chinese Oaks (*Quercus* Subgenus *Quercus*) and Assessment of Their Utility as DNA Barcodes. *Evolutionary and Population Genetics, a section of the journal Frontiers in Plant Science.* 8:16 (8): 1-17.
- Zúñiga, E. A., Sánchez-González, A. y Granados, D. S. 2009. Análisis de la variación morfológica foliar en *Quercus laeta* Liebm. en el parque nacional Los Mármoles, Hidalgo, México. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 15 (2): 87-93.

## XII. ANEXOS

### **Anexo 1. - Equipo institucional de laboratorio de genética de El Colegio De La Frontera Sur utilizado en la extracción y amplificación de ADN de las especies del género *Quercus*.**

- Baño María con agitación marca Sheldon®, modelo SWBR17.
- Cámara de electroforesis con fuente de poder marca BIO-RAD®
- Centrífuga marca Eppendorf®, modelo 5427 R.
- Concentrador de ADN marca Eppendorf®, modelo 5301.
- Congelador marca General Electric, modelo FMC 9DTA WH a -20 °C
- Espectrofotómetro marca Thermo Scientific®, modelo Nanodrop 2000.
- Fotodocumentador marca KODAK® modelo EDAS 290
- Termociclador de punto final marca BIO-RAD®, modelo T100 Thermal Cycler.
- Micropipetas
  - BioHit Proline® 100- 1000 µl
  - BioHit Proline® 10- 100 µl
  - BioHit Proline® 2 – 20 µl
  - BioHit Proline® 1 – 5 µl
  
  - Rainin SL® 10- 100 µl
  - Rainin SL® 20 µl
  - Rainin SL® 10 µl
  - Rainin SL® 2 µl
  
  - Corning LAMBDA Plus® 10- 100 µl

**Anexo 2. - Método de extracción CTAB 2X, modificado para hojas de *Quercus* 2019. Laboratorio de genética, El Colegio de La Frontera Sur ECOSUR.**

Día 1

1. Lavar minuciosamente con agua de la llave las muestras de los ápices de rebrotes (si están presentes, sino hojas maduras), para retirar la suciedad, seguido de un lavado con agua destilada. Secar con toallas de papel tipo sanitas y dejar secar a temperatura ambiente.
2. Pesar aproximadamente 0.0100 a 0.0200g de tejido foliar seleccionado (evitar nervaduras primarias), trocear con la ayuda de una tijera de un estuche de disección y macerar en un mortero de porcelana con pistilo de manera suave, no muy brusca (para evitar daño en el ADN) con la ayuda de nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo lo más fino posible.
3. Agregar a un tubo Eppendorf de 1.5 ml, junto con 1000 µl de CTAB 2X. pasar a vortex por 15 segundos para homogeneizar la mezcla.
4. Dejar incubar en baño María con agitación por una noche a una temperatura de 65°C y 80 Rpm.

Día 2.

5. Centrifugar a 12 700 Rpm. en la centrífuga, durante 8 minutos y trasladar aproximadamente 700 µl de sobrenadante a tubos nuevos.
6. Agregar 700 µl de cloroformo: octanol (24:1), agitar hasta homogeneizar y centrifugar a 10 000 Rpm durante 10 minutos
7. Trasladar aproximadamente 600 µl de sobrenadante a un tubo nuevo que contenga 700 µl de alcohol puro al 96%. Este paso es fundamental para obtener ADN limpio, se debe evitar recuperar material de la difase que se forma.
8. Dejar reposar durante 4 noches a una temperatura de -20°C.

Día 6.

9. Centrifugar a 12 700 Rpm. durante 9 minutos. Eliminar el sobrenadante decantando el tubo en un recipiente con sumo cuidado, para evitar que se caiga el *pellet* o botón formado en el fondo del tubo.

10. Limpiar *pellet* agregando 300  $\mu$ l de etanol al 80% frío y centrifugar a 12 700 Rpm. durante 7 minutos.
11. Eliminar sobrenadante decantándolo en un recipiente con sumo cuidado y dejar reposar durante 5 minutos.
12. Centrifugar los tubos en el concentrador de ADN, durante 8 minutos con la tapa de los tubos abiertos.
13. Hidratar *pellet* con 200  $\mu$ l de agua tridestilada desionizada esterilizada o agua grado biología molecular.
14. Cuantificar las muestras de ADN en el espectrofotómetro, agregando 1  $\mu$ l de cada muestra a la vez.
15. Si las muestras se notan impuras se realiza un lavado de fenol.
16. Agregar 100  $\mu$ l de fenol-cloroformo-isoamil alcohol mixture, y pasar a vortex por 15 segundos. Centrifugar a 12 700 Rpm. durante 6 minutos.
17. Recuperar aproximadamente 200  $\mu$ l de sobrenadante y agregarlo a nuevo tubo Eppendorf que contenga 800  $\mu$ l de alcohol isopropanol al 96%.
18. Dejar reposar durante dos noches a una temperatura de -20°C.

Día 8.

19. Centrifugar a 12 700 Rpm. durante 9 minutos. Eliminando el sobrenadante decantado en un tubo
20. Limpiar el Pellet agregando 300  $\mu$ l de etanol al 80 % frío y centrifugar a 12 700 Rpm. durante 7 minutos.
21. Eliminar sobrenadante decantándolo y dejar secar por 5 minutos. Centrifugar en el concentrador de ADN durante 8 minutos.
22. Hidratar el Pellet con 80  $\mu$ l de agua libre de nucleasas.
23. Visualizar ADN en un gel de agarosa al 1%. Agregando 3  $\mu$ l de ADN y 2  $\mu$ l de colorante azul, y dejar corriendo con un voltaje de 87 Watts.
24. Dejar reposar en bromuro de etidio durante 15 minutos, después de eso visualizar y tomar una foto con la cámara.

**Anexo 3. - Electroforesis en gel de agarosa al 1% (P/V) para visualización de ADN.**

1. Preparar solución de agarosa al 1% en TAE al 1X. Se disuelven 0.3 g de Agarosa en 30 ml de amortiguador TAE 1X en un matraz Erlenmeyer de 125 ml, y se realiza una agitación leve.
2. El matraz se mete a un horno de microondas durante 1:05 minutos aproximadamente, hasta que la mezcla se vea homogénea y cristalina.
3. Retirar matraz y dejar enfriar a temperatura ambiente aproximadamente 5 minutos.
4. Preparar el molde de la cámara de electroforesis, el cual debe de estar sobre un lugar que se encuentre plano (tener en cuenta el nivelador), vaciar la mezcla en el molde y colocar el peine para los pozos necesarios (10-15 según sea necesario).
5. Esperar de 15 a 20 minutos a temperatura ambiente para que la mezcla se solidifique por completo.
6. Una vez que el gel esté sólido, se retira el peine con mucho cuidado, para evitar romper el gel y sumergir el gel en la cámara de electroforesis que contiene amortiguador TAE 1X. En la cámara de electroforesis, el nivel de TAE al 1X debe cubrir al gel en su totalidad.
7. En un parafilm se colocan 2  $\mu$ l de colorante marcador (*Blue orange*) por cada muestra. Se toma 4  $\mu$ l de ADN y se mezclan con el colorante con la ayuda de la micropipeta, y esta mezcla se coloca en uno de los pozos del gel (Colocarlos de manera ordenada para evitar confusiones).
8. Tapar la cámara de electroforesis y colocar los electrodos, asegurándose que la terminal negativa (negro) se encuentre en el extremo superior.
9. Encender la fuente de poder a un voltaje de 87 volts por 35 minutos aprox.
10. Apagar la fuente de poder cuando el frente de color y las bandas se encuentren a 2 cm del extremo inferior (positivo).
11. Retirar el gel de la cámara de electroforesis, y colocarlo durante 15 minutos en una charola que contiene 80 $\mu$ l de bromuro de etidio disueltos en 500ml de agua destilada.
12. Retirar el gel de la charola con ayuda de guantes y espátulas.
13. Finalmente observar el gel en el transiluminador de luz ultravioleta por unos segundos.

14. Fotografiar el gel directamente del transiluminador, a través del fotodocumentador, guardar o imprimir la imagen en blanco y negro.
15. Apagar el transiluminador, y con ayuda de una espátula retirar el gel, y depositarlo en el contenedor de desechos contaminados.

#### **Anexo 4. - Electroforesis en gel de agarosa al 2% (P/V) para visualización de ADN amplificado.**

1. Preparar solución de agarosa al 2% en TAE al 1X: Disolver en un matraz Erlenmeyer de 125 ml, 0.6 g de agarosa en 30 ml de amortiguador TAE 1X, y realizar una agitación leve.
2. El matraz se mete a un horno de microondas durante 1:05 minutos aproximadamente, hasta que la mezcla se vea homogénea y cristalina. Cuando el microondas marque 40 segundos, detenerlo y sacar el matraz con cuidado para agitarlo levemente, volver a meter y seguir con el proceso.
3. Retirar matraz y dejar enfriar a temperatura ambiente aproximadamente 5 minutos, o bien deja enfriar en un recipiente con agua hasta que la parte interior de la mano soporte el calor, antes de que el gel haya solidificado.
4. Preparar el molde de la cámara de electroforesis, el cual debe de estar sobre un lugar que se encuentre plano (tener en cuenta el nivelador), vaciar la mezcla en el molde y colocar el peine para los pozos necesarios (10-15 según sea necesario).
5. Esperar de 15 a 20 minutos a temperatura ambiente para que la mezcla se solidifique por completo.
6. Una vez que el gel esté sólido, se retira el peine con mucho cuidado, para evitar romper el gel y sumergir el gel en la cámara de electroforesis que contiene amortiguador TAE 1X. En la cámara de electroforesis, el nivel de TAE al 1X debe cubrir al gel en su totalidad.
7. En un parafilm se colocan 2  $\mu$ l de colorante (Blue Orange) por cada muestra. Se toman 3  $\mu$ l de muestra de ADN y se re suspende con el colorante con la ayuda de la micropipeta, y dicha mezcla se coloca en uno de los pozos del gel.

8. En uno de los pozos, colocar el marcador de peso molecular (ladder) de 100 pb. El tampón de carga para el marcador molecular es de 2 µl de ladder más 2 µl de Azul de bromofenol o Blue Orange.
9. La cámara de electroforesis se conecta a la fuente de poder a un voltaje de 89 voltios por aproximadamente una hora y media.
10. Una vez que el gel haya corrido, se saca el molde de la cámara y se tiñe por 15 minutos en una charola que debe contener 80 µl de Bromuro de etidio disueltos en 500 ml de agua corriente.
11. Con ayuda de la espátula destinada al uso de Bromuro de etidio, se saca el gel de la charola y se pasa al transiluminador de luz ultravioleta. Se cierra la tapa, asegurándose que el transiluminador cubra por completo la luz ultravioleta para evitar daños en los ojos.
12. Se fotografía el gel directamente con ayuda del fotodocumentador.
13. Se apaga el transiluminador, se retira la tapa del mismo y con ayuda de la espátula, se retira el gel para ser depositado en el recipiente para geles teñidos.
14. Con una servilleta, se retira el exceso de bromuro del transiluminador. La servilleta y los guantes utilizados son desechados en el recipiente rotulado como “Basura contaminada”.

**Anexo 5. Marcadores moleculares utilizados para la identificación de especies en el predio Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas. Tm (°C) = Temperatura de alineamiento. Bp (Pares de bases)**

Referencia	Región amplificada	Secuencias de los primers	Tm (°C)	Longitud secuencias analizadas
White et al. (1990)	ITS 1-2	Forward (5'-3') TCCGTAGGTGAACCTGCGG Reverse (3'-5') GCTGCGTTCTTCATCGATGC	57°C	260 pb
White et al. (1990)	ITS 3-4	Forward (5'-3') GCATCGATGAAGAACGCAGC Reverse (3'-5') TCCTCCGCTTATTGATATGC	52°C	370 pb
Yang et al. (2017)	MatK	Forward (5'-3') ACCCAGTCCATCTGGAAATCTTGTTTC Reverse (3'-5') CGTACAGTACTTTTGTGTTTACGAG	55°C	698 pb
Yang et al. (2017)	CD_CD (tRNL)	Forward (5'-3') CTTGACAGGGCGGTGCTCT Reverse (3'-5') TAATGGGGACGGACTGTAAAT	55°C	491 pb



**Anexo 6.- Lista de especies de *Quercus* colectadas en el predio Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas. y la descripción de sus caracteres morfológicos foliares.**

Especie e ID de colecta de individuos	Descripción
<p><b><i>Q. acutifolia</i></b>  <b>mfsp. 1 Née.</b>                      Individuos con ID de colecta 13, 19 y 23</p>	<p><b>Forma:</b> Hojas lanceoladas simples alternas de ápice acuminado y aristado; bases acuminadas y/o atenuadas tanto iguales, como desiguales.                      Haz con superficie brillante y envés glauco,  <b>Margen:</b> sinuado dentado (9-19 aristas).  <b>Venación:</b> Pinnada, 10-13 venas secundarias a cada lado                      El individuo 13 presenta hojas menos mucronadas y con borde más entero</p>
<p><b><i>Q. acutifolia</i></b>  <b>mfsp. 2 Née.</b>                      Individuos con ID de colecta 7, 21 y 24</p>	<p><b>Forma:</b> Hojas lanceoladas simples alternas de ápice acuminado y de bases acuminadas y/o atenuadas desiguales.                      Haz con superficie muy brillante y envés glauco con presencia de pubescencia en las venas axilares.  <b>Margen:</b> Entero  <b>Venación:</b> Pinnada, 10-13 venas secundarias a cada lado                      El individuo 8 presenta algunas hojas con borde ondulado</p>
<p><b><i>Q. calophylla</i></b>  <b>mfsp.1 Trel.</b>                      Individuos con ID de colecta 15 y IV</p>	<p><b>Forma:</b> Hojas cóncavas cuneadas a elípticas simples alternas de ápice cuspidado y mucronado; bases truncadas desiguales.                      Haz con superficie brillante y envés glabro con mucha pubescencia color blanquecina.  <b>Margen:</b> dentado (15-19 aristas)  <b>Venación:</b> Pinnada, 10-12 venas secundarias a cada lado                      El individuo IV presenta hojas de forma cuneadas y de borde ondulado con pequeños mucrones</p>
<p><b><i>Q. calophylla</i></b>  <b>mfsp. 2 Trel.</b>                      Individuos con ID de colecta II, III y 22</p>	<p><b>Forma:</b> Hojas cóncavas obovadas simples alternas de ápice cuspidado y mucronado; bases truncadas u obtusas, tanto iguales, como desiguales.                      Haz con superficie brillante y envés glabro con mucha pubescencia color blanquecina.  <b>Margen:</b> doblemente aserrado (16-25 aristas).  <b>Venación:</b> Pinnada, 10-12 venas secundarias a cada lado</p>
<p><b><i>Q. elliptica</i></b>  <b>Née.</b>                      Individuo con ID de colecta 18</p>	<p><b>Forma:</b> Hojas elípticas a obovadas simples alternas de ápice redondeado; bases redondeadas y/o obtusas tanto iguales, como desiguales.                      Haz con superficie brillante y envés glauco,  <b>Margen:</b> Entero  <b>Venación:</b> Pinnada, 9-15 venas secundarias a cada lado.</p>

<p><b>Q.</b> <b><i>glaucescens</i></b> <b>Humb.</b> Individuos con ID de colecta 8, 12, 30 y 31</p>	<p><b>Forma:</b> Hoja oblanceoladas a lanceoladas simples alternas de ápice agudo a cuspidado; bases acuminadas y atenuadas tanto iguales, como desiguales. Haz con superficie brillante y envés glauco con presencia de pubescencia en las venas axilares. <b>Margen:</b> Undulado y/o dentado a lobulado. <b>Venación:</b> Pinnada, 9-11 venas secundarias a cada lado. El individuo 8 presenta hojas de forma elípticas y de borde entero</p>
<p><b>Q.</b> <b><i>glabrescens</i></b> <b>Benth.</b> Individuos con ID de colecta V y 11</p>	<p><b>Forma:</b> Hoja cuneadas (oblanceoladas) simples alternas de ápice agudo; bases truncadas, cordadas y reniformes tanto iguales, como desiguales. Haz con superficie brillante y envés glabro con mucha pubescencia (inclusive en las ramillas). <b>Margen:</b> dentado- aserrado con mucrones en cada diente corresponden a cada vena. <b>Venación:</b> Pinnada, 10-12 venas secundarias a cada lado.</p>
<p><b>Q.</b> <b><i>peduncularis</i></b> <b>Née.</b> Individuos con ID de colecta 9, 10, 14 y 16</p>	<p><b>Forma:</b> Hoja cuneadas (oblanceoladas) simples alternas de ápices agudos, obtusos obcordados y/o retusos; bases truncadas, cordadas y reniformes tanto iguales, como desiguales. Haz con superficie brillante y envés glabro con mucha pubescencia inclusive en las ramillas. <b>Margen:</b> undulado y aserrado y/o festonado (parecen ser lobuladas), con mucrones (que corresponden a cada vena) en cada ondulación. <b>Venación:</b> Pinnada, 8-15 venas secundarias a cada lado. Los individuos 9,10 y 14 presentan hojas en lugar de ser onduladas, parecen dentadas y de forma cuneadas (oblanceoladas).</p>
<p><b>Q. rubramenta</b> <b>Trel.</b> Individuo con ID de colecta 33</p>	<p><b>Forma:</b> Hojas acuminadas, aristadas Y/o subuladas simples alternas de ápice acuminado y/o cuspidado; bases redondeadas y/o obtusas cordadas y/o reniformes tanto iguales, como desiguales. Haz con superficie poco brillante con pubescencia en las venas primarias y secundarias; envés glabro con poca pubescencia inclusive en las ramillas. <b>Margen:</b> Entero <b>Venación:</b> Pinnada, 13-18 venas secundarias a cada lado.</p>
<p><b>Q. sapotifolia</b> <b>Liebm.</b> Individuos con ID de colecta I, 17, 25 y 32</p>	<p><b>Forma:</b> Hojas oblongas, oblanceoladas a elípticas simples alternas de ápice obtusos a redondeados y/o agudos; bases redondeadas y/o truncadas tanto iguales, como desiguales. Haz con superficie brillante y pubescencia en las venas primarias; envés glauco. <b>Margen:</b> Entero</p>

	<p><b>Venación:</b> Pinnada, 13-19 venas secundarias a cada lado (venas secundarias grandes gruesas y pequeñas delgadas intercaladas entre sí).</p> <p>El individuo 17 presenta algunas hojas muy muy grandes</p> <p>El individuo 32 posee hojas de forma subulada, con un color verde aceituna, además de presentar pubescencia en el envés de la hoja</p>
<p><b>Q. scytophylla</b> <b>Liebm.</b> Individuo con ID de colecta VI</p>	<p><b>Forma:</b> Hojas subuladas a elípticas simples alternas de ápice acuminado, aristado; bases truncadas, atenuadas, cordadas y/o reniformes desiguales.</p> <p>Haz con superficie brillante y envés glabro con poca pubescencia.</p> <p><b>Margen:</b> doblemente aserrado (15-19 aristas) a espinoso</p> <p><b>Venación:</b> Pinnada, 8-12 venas secundarias a cada lado. El 1er par de venas secundarias se encuentra unido en la vena central.</p>
<p><b>Q. vicentensis</b> <b>Trel.</b> Individuo con ID de colecta 34</p>	<p><b>Forma:</b> Hoja oblongas a lanceoladas simples alternas de ápice agudo y/cuspidado; bases truncadas, cordadas y reniformes tanto iguales, como desiguales.</p> <p>Haz con superficie brillante y envés glabro con mucha pubescencia inclusive en las ramillas.</p> <p><b>Margen:</b> ondulado y/o dentado con mucrones que corresponden a cada vena.</p> <p><b>Venación:</b> Pinnada, 13-15 venas secundarias a cada lado.</p>
<p><b>híbrido Q.</b> <b>glaucescens x</b> <b>peduncularis</b> Individuo con ID de colecta 35</p>	<p><b>Forma:</b> Hojas cuneadas (oblanceoladas) y elípticas simples alternas de ápice agudos, obtusos a cuspidado; bases tanto atenuadas, redondeadas truncadas, cordadas y reniformes con terminación igual o desigual.</p> <p>Haz con superficie brillante, de color verde aceituna y envés glabro con poca pubescencia presente inclusive en las ramillas.</p> <p><b>Margen:</b> entero y ondulado</p> <p><b>Venación:</b> Pinnada, 13-14 venas secundarias a cada lado.</p>
<p><b>TOTAL: 30 Individuos pertenecientes a 13 unidades taxonómicas operativas (especies)</b></p>	

**Anexo 7. Determinación de las especies de *Quercus* presentes en el predio de Los Ocotones Cintalapa, Chiapas con base en la comparación de secuencias del marcador cloroplástico tRNL (CD\_CD). – Secuencias no amplificadas. MAL: Secuencias con características no aceptables y no utilizadas para los análisis filogenéticos.**

Especie identificada con el ID. colecta	CD_CD	Primer especie con mayor % de identidad	Porcentaje de identidad 1er especie	Sequence ID	Especies presentes en el predio	Porcentaje de identidad 2da especie	Sequence ID
<i>Quercus acutifolia</i> mfsp.1 (13)	Si	<i>Quercus marilandica</i>	100.00%	MG709436.1			
<i>Quercus acutifolia</i> mfsp.1 (19)	Si	<i>Quercus rubra</i>	99.80%	KU186950.1			
<i>Quercus acutifolia</i> mfsp.1 (23)	Si	<i>Quercus rubra</i>	99.80%	KU186950.1			
<i>Quercus acutifolia</i> mfsp.2 (7)	MAL						
<i>Quercus acutifolia</i> mfsp.2 (21)	Si	<i>Quercus rubra</i>	99.80%	KU186950.1			
<i>Quercus acutifolia</i> mfsp.2 (24)	Si	<i>Quercus rubra</i>	100.00%	KU186950.1			
<i>Quercus calophylla</i> mfsp.1 (IV)	Si	<i>Quercus rubra</i>	100.00%	KU186952.1			
<i>Quercus calophylla</i> mfsp.1 (15)	Si	<i>Quercus rubra</i>	99.79%	KU186954.1			
<i>Quercus calophylla</i> mfsp.2 (II)	Si	<i>Quercus marilandica</i>	100.00%	MG709436.1			
<i>Quercus calophylla</i> mfsp.2 (III)	Si	<i>Quercus marilandica</i>	100.00%	MG709436.1			
<i>Quercus calophylla</i> mfsp.2 (22)	Si	<i>Quercus marilandica</i>	99.80%	MG709436.1			
<i>Quercus elliptica</i> (18)	Si	<i>Quercus rubra</i>	99.80%	KU186950.1			
<i>Quercus glabrescens</i> (V)	-						
<i>Quercus glabrescens</i> (11)	Si	<i>Quercus stellata</i>	100.00%	MG709405.1			
<i>Quercus glaucescens</i> (8)	Si	<i>Quercus stellata</i>	100.00%	MG709405.1			
<i>Quercus glaucescens</i> (12)	Si	<i>Quercus stellata</i>	99.39%	MG709405.1			

<i>Quercus glaucescens</i> (30)	Si	<i>Quercus stellata</i>	100.00%	MG709405.1
<i>Quercus glaucescens</i> (31)	Si	<i>Quercus stellata</i>	100.00%	MG709405.1
<i>Quercus peduncularis</i> (9)	Si	<i>Quercus rubra</i>	100.00%	KU186950.1
<i>Quercus peduncularis</i> (10)	-			
<i>Quercus peduncularis</i> (14)	Si	<i>Quercus stellata</i>	100.00%	MG709405.1
<i>Quercus peduncularis</i> (16)	Si	<i>Quercus stellata</i>	100.00%	MG709405.1
<i>Quercus rubramenta</i> (33)	Si	<i>Quercus rubra</i>	100.00%	KU186950.1
<i>Quercus sapotifolia</i> (I) (17)	Si	<i>Quercus marilandica</i>	100.00%	MG709436.1
<i>Quercus sapotifolia</i> (25)	-			
<i>Quercus sapotifolia</i> (32)	Si	<i>Quercus rubra</i>	100.00%	KU186950.1
<i>Quercus scytophylla</i> (VI) (34)	Si	<i>Quercus marilandica</i>	99.80%	MG709436.1
<i>Quercus vicentensis</i> (34)	-			
<i>Quercus</i> híbrido (35)	Si	<i>Quercus stellata</i>	99.80%	MG709405.1
<b>TOTAL</b>	<b>25 Individuos analizados</b>		<b>99.91%</b>	<b>0 secuencias con identidad similar a las especies presentes en el predio</b>

**Anexo 8. Determinación de las especies de *Quercus* presentes en el predio de Los Ocotones Cintalapa, Chiapas con base en la comparación de secuencias del marcador cloroplástico Maturase K (MatK). – Secuencias no amplificadas. MAL: Secuencias con características no aceptables y no utilizadas para los análisis filogenéticos.**

Especie identificada con el ID. colecta	MATK	Primer especie con mayor % de identidad	Porcentaje de identidad 1er especie	Sequence ID	Especies presentes en el predio	Porcentaje de identidad 2da especie	Sequence ID
<i>Quercus acutifolia</i> mfsp.1 (13)	Si	<i>Quercus incana</i>	100.00%	<a href="#">MH551845.1</a>	<i>Quercus candicans</i>	99.86%	<a href="#">MF044999.1</a>
<i>Quercus acutifolia</i> mfsp.1 (19)	Si	<i>Quercus coccinea</i>	99.86%	<a href="#">NC047481.1</a>	<i>Quercus candicans</i>	99.71%	<a href="#">MF044999.1</a>
<i>Quercus acutifolia</i> mfsp.1 (23)	Si	<i>Quercus incana</i>	100.00%	<a href="#">MH551845.1</a>	<i>Quercus candicans</i>	99.86%	<a href="#">MF044999.1</a>
<i>Quercus acutifolia</i> mfsp.2 (7)	Si	<i>Quercus coccinea</i>	100.00%	<a href="#">NC047481.4</a>	<i>Quercus candicans</i>	100.00%	<a href="#">MF044999.1</a>
<i>Quercus acutifolia</i> mfsp.2 (21)	Si	<i>Quercus incana</i>	100.00%	<a href="#">MH551845.1</a>	<i>Quercus candicans</i>	99.86%	<a href="#">MF044999.1</a>
<i>Quercus acutifolia</i> mfsp.2 (24)	-						
<i>Quercus calophylla</i> mfsp.1 (IV)	Si	<i>Quercus incana</i>	99.05%	<a href="#">MH551845.1</a>	<i>Quercus candicans</i>	98.90%	<a href="#">MF044999.1</a>
<i>Quercus calophylla</i> mfsp.1 (15)	Si	<i>Quercus grahamii</i>	100.00%	<a href="#">MK239964.1</a>	<i>Quercus candicans</i>	99.71%	<a href="#">MF044999.1</a>
<i>Quercus calophylla</i> mfsp.2 (II)	Si	<i>Quercus incana</i>	100.00%	<a href="#">MH551845.1</a>	<i>Quercus candicans</i>	99.86%	<a href="#">MF044999.1</a>
<i>Quercus calophylla</i> mfsp.2 (III)	Si	<i>Quercus incana</i>	100.00%	<a href="#">MH551845.1</a>	<i>Quercus candicans</i>	99.86%	<a href="#">MF044999.1</a>
<i>Quercus calophylla</i> mfsp.2 (22)	Si	<i>Quercus incana</i>	100.00%	<a href="#">MH551845.1</a>	<i>Quercus candicans</i>	99.86%	<a href="#">MF044999.1</a>
<i>Quercus elliptica</i> (18)	Si	<i>Quercus incana</i>	99.85%	<a href="#">MH551845.1</a>	<i>Quercus candicans</i>	99.71%	<a href="#">MF044999.1</a>
<i>Quercus glabrescens</i> (V)	Si	<i>Quercus liebmannii</i>	99.71%	<a href="#">MK239967.1</a>			
<i>Quercus glabrescens</i> (11)	Si	<i>Quercus liebmannii</i>	100.00%	<a href="#">MK239967.1</a>			
<i>Quercus glaucescens</i> (8)	Si	<i>Quercus liebmannii</i>	100.00%	<a href="#">MK239967.1</a>			

<i>Quercus glaucescens</i> (12)	Si	<i>Quercus liebmannii</i>	100.00%	MK239967.1			
<i>Quercus glaucescens</i> (30)	Si	<i>Quercus liebmannii</i>	100.00%	MK239967.1			
<i>Quercus glaucescens</i> (31)	Si	<i>Quercus liebmannii</i>	100.00%	MK239967.1			
<i>Quercus peduncularis</i> (9)	Si	<i>Quercus incana</i>	100.00%	<u>MH551845.1</u>	<i>Quercus candicans</i>	99.86%	<u>MF044999.1</u>
<i>Quercus peduncularis</i> (10)	-						
<i>Quercus peduncularis</i> (14)	Si	<i>Quercus liebmannii</i>	99.71%	MK239967.1			
<i>Quercus peduncularis</i> (16)	Si	<i>Quercus liebmannii</i>	100.00%	MK239967.1			
<i>Quercus rubramenta</i> (33)	Si	<i>Quercus incana</i>	100.00%	<u>MH551845.1</u>	<i>Quercus candicans</i>	99.86%	<u>MF044999.1</u>
<i>Quercus sapotifolia</i> (I)	Si	<i>Quercus incana</i>	100.00%	<u>MH551845.1</u>	<i>Quercus candicans</i>	99.86%	<u>MF044999.1</u>
<i>Quercus sapotifolia</i> (17)	Si	<i>Quercus incana</i>	99.71%	<u>MH551845.1</u>	<i>Quercus candicans</i>	99.57%	<u>MF044999.1</u>
<i>Quercus sapotifolia</i> (25)	-						
<i>Quercus sapotifolia</i> (32)	Si	<i>Quercus incana</i>	100.00%	<u>MH551845.1</u>	<i>Quercus candicans</i>	99.86%	<u>MF044999.1</u>
<i>Quercus scytophylla</i> (VI)	-						
<i>Quercus vicentensis</i> (34)	Si	<i>Quercus incana</i>	100.00%	<u>MH551845.1</u>	<i>Quercus candicans</i>	99.86%	<u>MF044999.1</u>
<i>Quercus</i> híbrido (35)	Si	<i>Quercus incana</i>	100.00%	<u>MH551845.1</u>	<i>Quercus candicans</i>	99.86%	<u>MF044999.1</u>
<b>TOTAL</b>	<b>26</b> <b>Individuos</b> <b>analizados</b>		<b>Promedio:</b> <b>99.92%</b>		<b>18 secuencias con</b> <b>identidad similar a</b> <b>las especies</b> <b>presentes en el predio</b>		

**Anexo 9. Determinación de las especies de *Quercus* presentes en el predio de Los Ocotones Cintalapa, Chiapas con base en la comparación de secuencias del marcador ribosomal nuclear ITS 1-2 (espaciadores transcritos internos, por sus siglas en inglés). – Secuencias no amplificadas. MAL: Secuencias con características no aceptables y no utilizadas para los análisis filogenéticos.**

Especie identificada con el ID. colecta	ITS 1-2	Primer especie con mayor % de identidad	Porcentaje de identidad 1er especie	Sequence ID	Especies presentes en el predio	Porcentaje de identidad 2da especie	Sequence ID
<i>Quercus acutifolia</i> mfsp.1 (13)	Si	<i>Quercus falcata</i>	98.53%	<a href="#">EU646163.1</a>	<i>Quercus acutifolia</i>	91.32%	<a href="#">MK169246.1</a>
<i>Quercus acutifolia</i> mfsp.1 (19)	Si	<i>Quercus hintonii</i>	97.12%	<a href="#">MK169265.1</a>	<i>Quercus acutifolia</i>	93.44%	<a href="#">MK169246.1</a>
<i>Quercus acutifolia</i> mfsp.1 (23)	Si	<i>Quercus hintonii</i>	96.71%	<a href="#">MK169265.1</a>	<i>Quercus acutifolia</i>	93.44%	<a href="#">MK169246.1</a>
<i>Quercus acutifolia</i> mfsp.2 (7)	Si	<i>Quercus hintonii</i>	97.52%	<a href="#">MK169265.1</a>	<i>Quercus acutifolia</i>	92.98%	<a href="#">MK169246.1</a>
<i>Quercus acutifolia</i> mfsp.2 (21)	Si	<i>Quercus hintonii</i>	98.35%	<a href="#">MK169265.1</a>	<i>Quercus acutifolia</i>	93.80%	<a href="#">MK169246.1</a>
<i>Quercus acutifolia</i> mfsp.2 (24)	Si	<i>Quercus rubra</i>	98.35%	<a href="#">MT227761.1</a>	<i>Quercus acutifolia</i>	95.06%	<a href="#">MK169246.1</a>
<i>Quercus calophylla</i> mfsp.1 (IV)	MAL						
<i>Quercus calophylla</i> mfsp.1 (15)	Si	<i>Quercus rubra</i>	97.93%	<a href="#">MT227761.1</a>	<i>Quercus candicans</i>	96.28%	<a href="#">KM200958.1</a>
<i>Quercus calophylla</i> mfsp.2 (II)	MAL						
<i>Quercus calophylla</i> mfsp.2 (III)	Si	<i>Quercus rubra</i>	97.11%	<a href="#">MT227761.1</a>	<i>Quercus candicans</i>	95.45%	<a href="#">KM200958.1</a>
<i>Quercus calophylla</i> mfsp.2 (22)	Si	<i>Quercus rubra</i>	98.35%	<a href="#">MT227761.1</a>	<i>Quercus candicans</i>	96.69%	<a href="#">KM200958.1</a>
<i>Quercus elliptica</i> (18)	Si	<i>Quercus hintonii</i>	99.17%	<a href="#">MK169265.1</a>	<i>Quercus elliptica</i>	96.69%	<a href="#">MK169261.1</a>
<i>Quercus glabrescens</i> (V)	Si	<i>Quercus stellata</i>	97.22%	<a href="#">AF174636.1</a>	<i>Quercus candicans</i>	96.28%	<a href="#">KM200958.1</a>
<i>Quercus glabrescens</i> (11)	Si	<i>Quercus pyrenaica</i>	97.12%	<a href="#">FM244221.1</a>			
<i>Quercus glaucescens</i> (8)	Si	<i>Quercus pungens</i>	96.41%	<a href="#">KM200975.1</a>			



<i>Quercus glaucescens</i> (12)	Si	<i>Quercus vaseyana</i>	99.20%	<a href="#">KM200976.1</a>			
<i>Quercus glaucescens</i> (30)	Si	<i>Quercus pungens</i>	96.41%	<a href="#">KM200975.1</a>			
<i>Quercus glaucescens</i> (31)	Si	<i>Quercus robur</i> subsp. <i>robur</i>	98.01%	<a href="#">FM244237.1</a>			
<i>Quercus peduncularis</i> (9)	Si	<i>Quercus hintonii</i>	97.10%	<a href="#">MK169265.1</a>	<i>Quercus candicans</i>	96.28%	<a href="#">KM200958.1</a>
<i>Quercus peduncularis</i> (10)	Si	<i>Quercus robur</i> subsp. <i>robur</i>	98.01%	<a href="#">FM244237.1</a>			
<i>Quercus peduncularis</i> (14)	Si	<i>Quercus dentata</i>	98.01%	<a href="#">KM051445.1</a>			
<i>Quercus peduncularis</i> (16)	MAL						
<i>Quercus rubramenta</i> (33)	MAL						
<i>Quercus sapotifolia</i> (I)	MAL						
<i>Quercus sapotifolia</i> (17)	Si	<i>Quercus rubra</i>	99.17%	<a href="#">MT796544.1</a>	<i>Quercus candicans</i>	96.28%	<a href="#">KM200958.1</a>
<i>Quercus sapotifolia</i> (25)	Si	<i>Quercus rubra</i>	98.76%	<a href="#">MT227761.1</a>	<i>Quercus elliptica</i>	96.69%	<a href="#">MK169261.1</a>
<i>Quercus sapotifolia</i> (32)	Si	<i>Quercus rubra</i>	97.93%	<a href="#">MT227761.1</a>	<i>Quercus candicans</i>	96.28%	<a href="#">KM200958.1</a>
<i>Quercus scytophylla</i> (VI)	Si	<i>Quercus hintonii</i>	97.93%	<a href="#">MK169265.1</a>	<i>Quercus candicans</i>	96.28%	<a href="#">KM200958.1</a>
<i>Quercus vicentensis</i> (34)	Si	<i>Quercus robur</i> subsp. <i>robur</i>	96.81%	<a href="#">FM244237.1</a>			
<i>Quercus</i> híbrido (35)	MAL						
<b>TOTAL</b>	<b>24</b> <b>Individuos</b> <b>analizados</b>		<b>97.80%</b>		<b>16 secuencias con</b> <b>identidad similar a</b> <b>las especies</b> <b>presentes en el predio</b>		

**Anexo 10. Determinación de las especies de *Quercus* presentes en el predio de Los Ocotones Cintalapa, Chiapas con base en la comparación de secuencias del marcador ribosomal nuclear ITS 3-4 (espaciadores transcritos internos, por sus siglas en inglés). – Secuencias no amplificadas. MAL: Secuencias con características no aceptables y no utilizadas para los análisis filogenéticos.**

Especie identificada con el ID. colecta	ITS 3-4	Primer especie con mayor % de identidad	Porcentaje de identidad 1er especie	Sequence ID	Especies presentes en el predio	Porcentaje de identidad 2da especie	Sequence ID
<i>Quercus acutifolia</i> mfsp.1 (13)	Si	<i>Quercus rubra</i>	99.12%	<a href="#">MT796544.1</a>			
<i>Quercus acutifolia</i> mfsp.1 (19)	Si	<i>Quercus humboldtii</i>	100.00%	<a href="#">MK138673.1</a>			
<i>Quercus acutifolia</i> mfsp.1 (23)	Si	<i>Quercus humboldtii</i>	99.71%	<a href="#">MK138673.1</a>			
<i>Quercus acutifolia</i> mfsp.2 (7)	Si	<i>Quercus ilicifolia</i>	99.64%	<a href="#">MG237163.1</a>			
<i>Quercus acutifolia</i> mfsp.2 (21)	Si	<i>Quercus rubra</i>	98.82%	<a href="#">MT796544.1</a>			
<i>Quercus acutifolia</i> mfsp.2 (24)	Si	<i>Quercus rubra</i>	98.82%	<a href="#">MT796544.1</a>			
<i>Quercus calophylla</i> mfsp.1 (IV)	Si	<i>Quercus environmental sample voucher</i>	99.38%	<a href="#">KU568522.1</a>	<i>Quercus candicans</i>	98.33%	<a href="#">KM200958.1</a>
<i>Quercus calophylla</i> mfsp.1 (15)	Si	<i>Quercus rubra</i>	98.53%	<a href="#">MT796544.1</a>			
<i>Quercus calophylla</i> mfsp.2 (II)	Si	<i>Quercus rubra</i>	98.53%	<a href="#">MT796544.1</a>			
<i>Quercus calophylla</i> mfsp.2 (III)	Si	<i>Quercus rubra</i>	97.95%	<a href="#">MT796544.1</a>			
<i>Quercus calophylla</i> mfsp.2 (22)	Si	<i>Quercus ilicifolia</i>	99.01%	<a href="#">MG237163.1</a>			
<i>Quercus elliptica</i> (18)	Si	<i>Quercus petraea subsp. iberica</i>	85.83%	<a href="#">KM588211.1</a>	<i>Quercus elliptica</i>	81.73%	<a href="#">MK169261.1</a>
<i>Quercus glabrescens</i> (V)	MAL						
<i>Quercus glabrescens</i> (11)	Si	<i>Quercus pontica</i>	98.46%	<a href="#">FM244159.1</a>			
<i>Quercus glaucescens</i> (8)	Si	<i>Quercus pontica</i>	98.77%	<a href="#">FM244159.1</a>			

<i>Quercus glaucescens</i> (12)	Si	<i>Quercus petraea</i> <i>subsp. petraea</i>	97.52%	<a href="#">FM244058.1</a>		
<i>Quercus glaucescens</i> (30)	Si	<i>Quercus pontica</i>	98.77%	<a href="#">FM244159.1</a>		
<i>Quercus glaucescens</i> (31)	Si	<i>Quercus infectoria</i> <i>subsp. boisseri</i>	97.83%	<a href="#">FM243939.1</a>		
<i>Quercus peduncularis</i> (9)	Si	<i>Quercus fulva</i>	99.66%	<a href="#">MK169262.1</a>	<a href="#">Quercus candicans</a>	98.33% <a href="#">KM200958.1</a>
<i>Quercus peduncularis</i> (10)	Si	<i>Quercus robur</i> <i>subsp. robur</i>	99.07%	<a href="#">FM244244.1</a>		
<i>Quercus peduncularis</i> (14)	Si	<i>Quercus infectoria</i> <i>subsp. boisseri</i>	97.83%	<a href="#">FM243939.1</a>		
<i>Quercus peduncularis</i> (16)	-					
<i>Quercus rubramenta</i> (33)	MAL					
<i>Quercus sapotifolia</i> (I)	Si	<i>Quercus ilicifolia</i>	98.68%	<a href="#">MG237163.1</a>		
<i>Quercus sapotifolia</i> (17)	Si	<i>Quercus ilicifolia</i>	99.67%	<a href="#">MG237163.1</a>		
<i>Quercus sapotifolia</i> (25)	Si	<i>Quercus candicans</i>	91.92%	<a href="#">KM200958.1</a>		
<i>Quercus sapotifolia</i> (32)	Si	<i>Quercus ilicifolia</i>	98.68%	<a href="#">MG237163.1</a>		
<i>Quercus scytophylla</i> (VI)	-					
<i>Quercus vicentensis</i> (34)	MAL					
<i>Quercus</i> híbrido (35)	MAL					
<b>TOTAL</b>	<b>24</b> <b>Individuos</b> <b>analizados</b>		<b>98.01%</b>		<b>3 secuencias con</b> <b>identidad similar a</b> <b>las especies</b> <b>presentes en el</b> <b>predio</b>	

**Anexo 11.** Haplotipos únicos generados a partir de 25 secuencias del marcador CD\_CD (tRNL) para *Quercus*, pertenecientes a 12 de las 13 especies de *Quercus* identificadas en el predio Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas. Los números entre paréntesis a la derecha del nombre de la especie corresponden al identificador de colecta.

Haplotipos	Frecuencia	Especies dentro de cada haplotipo
H1	7	<i>Q. glaucescens</i> (8, 30 y 31) <i>Q. glabrescens</i> (11) <i>Q. peduncularis</i> (14 y 16) <i>Q. híbrido</i> (35)
H2	1	<i>Q. scytophylla</i> (VI)
H3	6	<i>Q. acutifolia</i> mfsp.1 (13) <i>Q. calophylla</i> mfsp.1 (IV) <i>Q. calophylla</i> mfsp.2 (II, III y 22) <i>Q. sapotifolia</i> (I)
H4	10	<i>Q. acutifolia</i> mfsp.1 (19 y 23) <i>Q. acutifolia</i> mfsp.2 (21 y 24) <i>Q. calophylla</i> mfsp.1 (15) <i>Q. elliptica</i> (18) <i>Q. peduncularis</i> (9) <i>Q. rubramenta</i> (33) <i>Q. sapotifolia</i> (25 y 32)
H5	1	<i>Q. glaucescens</i> (12)

**Anexo 12.** Haplotipos únicos generados a partir de 26 secuencias del marcador Maturase K (MatK) para *Quercus*, pertenecientes a 12 de las 13 especies de *Quercus* identificadas en el predio Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas. Los números entre paréntesis a la derecha del nombre de la especie corresponden al identificador de colecta.

Haplotipos	Frecuencia	Especies dentro de cada haplotipo
H1	13	<i>Q. acutifolia</i> mfsp.1 (13 y 23) <i>Q. acutifolia</i> mfsp.2 (21) <i>Q. calophylla</i> mfsp.1 (15) <i>Q. calophylla</i> mfsp.2 (II y III) <i>Q. elliptica</i> (18) <i>Q. peduncularis</i> (9) <i>Q. rubramenta</i> (33) <i>Q. sapotifolia</i> (I y 32) <i>Q. vicentensis</i> (34) <i>Q. híbrido</i> (35)
H2	8	<i>Q. glabrescens</i> (V y 11) <i>Q. glaucescens</i> (8, 12, 30 y 31) <i>Q. peduncularis</i> (14 y 16)

H3	2	<i>Q. calophylla</i> mfsp.2 (22) <i>Q. sapotifolia</i> (17)
H4	1	<i>Q. acutifolia</i> mfsp.2 (7)
H5	1	<i>Q. acutifolia</i> mfsp.1 (19)
H6	1	<i>Q. calophylla</i> mfsp.1 (IV)

**Anexo 13.** Haplotipos únicos generados a partir de 22 secuencias de las regiones de ADN cloroplástico Maturase K (MatK) y CD\_CD (tRNL) para *Quercus* concatenados, pertenecientes a 11 de las 13 especies de *Quercus* identificadas en el predio Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas. Los números entre paréntesis a la derecha del nombre de la especie corresponden al identificador de colecta.

Haplotipos	Numero de haplotipos	Especies dentro de cada haplotipo
H1	6	<i>Q. glabrescens</i> (11) <i>Q. glaucescens</i> (8,30 y 31) <i>Q. peduncularis</i> (14 y 16)
H2	4	<i>Q. acutifolia</i> mfsp.1 (13) <i>Q. calophylla</i> mfsp.2 (II y III) <i>Q. sapotifolia</i> (I)
H3	7	<i>Q. peduncularis</i> (9) <i>Q. calophylla</i> mfsp.1 (15) <i>Q. elliptica</i> (18) <i>Q. acutifolia</i> mfsp.1 (23) <i>Q. acutifolia</i> mfsp.2 (21) <i>Q. rubramenta</i> (33) <i>Q. sapotifolia</i> (32)
H4	1	<i>Q. calophylla</i> mfsp.1 (IV)
H5	1	<i>Q. calophylla</i> mfsp.2 (22)
H6	1	<i>Q. glaucescens</i> (12)
H7	1	<i>Q. acutifolia</i> mfsp.1 (19)
H8	1	<i>Q. híbrido</i> (35)

**Anexo 14.** Haplotipos únicos generados a partir de 21 secuencias concatenadas de las regiones de ADN ribosomal ITS 1-2 e ITS 3-4 para *Quercus*, pertenecientes a 9 de las 13 especies de *Quercus* identificadas en el predio Los Ocotones, Cintalapa, Chiapas. Los números entre paréntesis a la derecha del nombre de la especie corresponden al identificador de colecta.

Haplotipos	Numero de haplotipos	Especies dentro de cada haplotipo
H1	1	<i>Q. acutifolia</i> mfsp.2 (22)
H2	1	<i>Q. sapotifolia</i> (25)
H3	1	<i>Q. sapotifolia</i> (17)
H4	1	<i>Q. acutifolia</i> mfsp.2 (21)
H5	1	<i>Q. acutifolia</i> mfsp. 1 (19)
H6	1	<i>Q. glabrescens</i> (11)
H7	1	<i>Q. glaucescens</i> (31)
H8	1	<i>Q. acutifolia</i> mfsp.1 (23)
H9	1	<i>Q. glaucescens</i> (12)
H10	1	<i>Q. acutifolia</i> mfsp.2 (7)
H11	1	<i>Q. peduncularis</i> (14)
H12	1	<i>Q. peduncularis</i> (9)
H13	1	<i>Q. glaucescens</i> (30)
H14	1	<i>Q. calophylla</i> mfsp.2 (22)
H15	1	<i>Q. glaucescens</i> (8)
H16	1	<i>Q. acutifolia</i> mfsp.1 (13)
H17	1	<i>Q. sapotifolia</i> (32)
H18	1	<i>Q. calophylla</i> mfsp.2 (III)
H19	1	<i>Q. peduncularis</i> (10)
H20	1	<i>Q. elliptica</i> (18)
H21	1	<i>Q. calophylla</i> mfsp.1 (15)