

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS**

**Relaciones filogenéticas del género *Quercus* en México:
establecimiento de marcadores moleculares para la serie
Lanceolatae
(sección *Lobatae*)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Orientación Biología Ambiental)**

P R E S E N T A

BIÓL. SELENE RAMOS ORTIZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA

Morelia, Michoacán

Octubre, 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el Centro de Investigaciones en Ecosistemas, CIEco, bajo la asesoría del Dr. A. Ken Oyama Nakagawa. Para la realización de este trabajo se contó con el apoyo del proyecto 2004-C01-97 del CONACYT, “Centros de Biodiversidad, indicadores biológicos y estado de conservación de poblaciones de encinos en México”, y del proyecto SDEI-PTID-02 de la UNAM, “Manejo de ecosistemas y desarrollo humano”.

Agradecimientos

Mi más profundo agradecimiento al Dr. Ken Oyama, por su asesoría, apoyo y comentarios certeros en el desarrollo de este trabajo.

Al comité tutorial, Dra Ana María Cevallos y Dr. Sergio Zamudio, por sus puntuales e importantes aportaciones y sugerencias en la tesis.

A la Dra. Susana Valencia, por su valiosa asesoría en la identificación de las especies y aportación invaluable del estudio morfológico de la serie *Lanceolatae*, además de sus sugerencias acertadas en la revisión de la tesis.

Al Dr. Antonio González, por su enorme apoyo en la realización de los análisis fenéticos y asesoría en el desarrollo del trabajo, además de su compañerismo y amistad.

Al Dr. Juan José Valdez por el apoyo incondicional en el montaje del marcador molecular y su valiosa contribución en el mejoramiento del escrito.

Al Dr. Omar Chassin por su colaboración en el análisis filogenético y su gran amistad.

A la M. en C. Nidia Pérez por su invaluable y apreciable amistad además de su apoyo en el laboratorio de ecología genética y molecular, CIEco.

Al laboratorio de sistemas de información geográfica, CIEco por la elaboración del mapa de distribución de las especies de estudio.

A Doña Lolis por su ayuda incondicional en el trabajo de laboratorio y por hacer que mi estancia en el laboratorio fuera placentera.

A mis compañeros y colegas del laboratorio de ecología, genética y molecular: Ana y Juan Manuel, gracias por su ayuda en el campo, Hermilo, Erasto, Irene, Dolores, Rafael, Víctor, Felipe, Lorena, Aurea y Ross.

A quienes me hacen vivir...

Agradezco enormemente a mi hermosa familia: **Sol, Toño, Bere, Bruno, Juan y Rosalba**, pues sin ellos no hubiera podido culminar esta meta tan esperada.

A mis irremplazables amigas: **Lía, Marisol, Diana, Flor, Waly, Luisa, Adriana, Ingrid y Ofa**, por haber coincidido conmigo, aquí y ahora.

A mis grandiosos amigos: **Jesús, Ricardo, Enrique, David, Francisco y Abraham**, por pertenecer a mi locura y aventurada forma de vivir.

CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

I. RESUMEN

II. INTRODUCCIÓN

II.1 Descripción de la familia Fagaceae

II.2 Descripción del género *Quercus*

II.2.1 Taxonomía del género *Quercus*

II.2.2 Distribución geográfica de los encinos y datos de su evolución a nivel mundial y a nivel nacional

II.2.3 Estado actual de la taxonomía del género *Quercus*

II.2.4 Estudios particulares del género *Quercus*

II.3 La serie *Lanceolatae*

II.4 Los conceptos de especie en el género *Quercus*

II.5 Marcadores Moleculares

II.6 AFLPs

II.6.1 Aplicaciones

II.6.2 Ventajas y Limitantes

III. OBJETIVOS

III.1 GENERAL

III.2 PARTICULARES

IV. HIPÓTESIS

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 Selección de taxa

V.2 Trabajo de herbario

V.3 Trabajo de campo

V.4 Identificación de ejemplares en el herbario

V.5 Extracción de ADN

V.6 Cuantificación de ADN

V.7 Calidad y Pureza del ADN

V.8 Montaje y análisis de AFLP en *Quercus*

V.8.1 Extracción y digestión del ADN

V.8.2 Alineación de los pares de adaptadores

V.8.3 Reacción ligación-restricción y dilución

V.8.4 Amplificación preselectiva

V.8.5 Amplificación selectiva

V.8.6 Preparación del buffer de carga y electroforesis en
secuenciador

V.9 Elección de oligonucleótidos para la amplificación selectiva

VII. ANÁLISIS DE DATOS

VII.1 Análisis filogenéticos

VII.2 Análisis fenéticos

VIII. RESULTADOS

VIII.1 Topología general del análisis cladístico

VIII.2 Fenéticos

VIII.2.1 Análisis de agrupamiento (UPGMA)

VIII.2.2 Análisis de Neighbor- Joining (N-J)

VIII.2.3 Análisis de coordenadas principales (ACP)

IX. DISCUSIÓN

X. CONCLUSIONES

XI. REFERENCIAS

XII. GLOSARIO

XIII. ABREVIATURAS USADAS

XIV. APÉNDICE I. SINOPSIS DESCRIPTIVA DE LOS TAXA EXTERNOS INCLUIDOS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Relaciones filogenéticas del subgénero *Quercus*, basada en datos morfológicos.

Figura 2. Relaciones de los grupos infragenéricos de los encinos americanos propuesta por Trelease (1924).

Figura 3. Diagrama del método de AFLP.

Figura 4. Electroferograma de una corrida de AFLP, analizadas con el software GeneMapper versión 4.0 AFLP.

Figura 5. Localización geográfica de las 26 especies empleadas en este estudio, con 3 individuos por cada una.

Figura 6. Amplificación preselectiva de reacciones AFLP.

Figura 7. Electroferograma de tres especies: *Q. laurina*, *Q. ocoteifolia* y *Q. candicans*, analizadas con el software GeneMapper versión 4.0 AFLP.

Figura 8. Árbol de consenso de 4 árboles más parsimoniosos del análisis filogenético de la serie *Lanceolatae* del género *Quercus* con caracteres moleculares.

Figura 9. Árbol de consenso más parsimonioso del análisis filogenético de la serie *Lanceolatae* del género *Quercus* con caracteres morfológicos, propuesto por Valencia (2005).

Figura 10. Dendrograma de similitud utilizando el método de UPGMA con los valores de similitud de Nei-Li.

Figura 11. Dendrograma de similitud construido mediante el método de Neighbor Joining con los valores de similitud de Nei-Li disponible en GenAlEx 6.0.

Figura 12. Gráfico de análisis de coordenadas principales de las 22 especies (66 individuos) de estudio sin grupo externo.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies del género *Quercus* que ha comprendido la serie *Lanceolatae* de acuerdo con diferentes autores.

Tabla 2. Ventajas, desventajas y aplicaciones del marcador molecular AFLP.

Tabla 3. Especies y series del género *Quercus* incluidas en el análisis cladístico molecular.

Tabla 4. Ubicación geográfica de las 26 especies del género *Quercus* analizadas en este estudio.

Tabla 5. Selección de las 23 combinaciones de oligonucleótidos para el análisis AFLP.

I. RESUMEN

Se abordaron las relaciones filogenéticas de la serie *Lanceolatae* del género *Quercus*, sección *Lobatae* usando el marcador molecular (AFLP). La serie *Lanceolatae* comprende tres especies, sin embargo, se analizaron 26 especies en total, que incluyen especies de otras series relacionadas y algunas de otra sección como grupo externo. Se puso a prueba la hipótesis de que la serie *Lanceolatae* es un grupo monofilético por medio de los análisis filogenéticos y fenéticos de las especies que la integran.

Se revisaron ejemplares de herbario y se colectaron muestras de las especies en 13 estados del país para el análisis molecular. Posteriormente se llevó a cabo el montaje del marcador AFLP en un secuenciador automático (ABI 3100-AVANT). Para el análisis filogenético, se analizó la variación encontrada entre las especies, mediante los programas Winclada y NONA, donde se utilizó el modelo de Parsimonia Ratchet y se obtuvieron árboles de consenso a los cuales se aplicó un análisis de soporte de ramas: Bootstrap y Jackknife. Para el análisis fenético, se usó el programa GenAlEx6 donde se realizó un análisis de coordenadas principales (ACP) y el programa N-TSYS para realizar análisis de agrupamiento como UPGMA y Neighbor Joining; todos estos análisis se realizaron con una matriz de distancia Nei-Li. Los resultados obtenidos con los análisis filogenético y fenético presentan una cierta congruencia con análisis morfológicos previos. A pesar de que los AFLPs han sido cuestionados como marcadores útiles en análisis filogenéticos por la homología de sus bandas, en este estudio se encontró congruencia entre ambos datos.

Se encontró que la serie *Lanceolatae* es un grupo parafilético y que la clasificación previa de Trelease (1924) para esta serie en particular es artificial.

De acuerdo con nuestros resultados, es posible utilizar AFLPs como una herramienta útil para resolver relaciones filogenéticas cuando no existan otros marcadores informativos, y se tenga una hipótesis morfológica previa que lo sustente.

Palabras clave: *Quercus*, Filogenia, AFLP, Parafilético.

ABSTRACT

The phylogenetic relationships of the *Lanceolatae* serie of the genus *Quercus*, section *Lobatae* were analyzed using molecular markers (AFLPs). The serie *Lanceolatae* includes three species, for its connotation, we include 26 of other serie and some others external group. It was tested the hypothesis that *Lanceolatae* serie is a monophyletic group by means of the phylogenetic and phenetic analysis of the species that integrate it.

Herbarium samples were reviewed and the species were collected in 13 states of the country for their molecular analysis. Later I carried out the assembly of marker AFLPs in an automatic sequencer (ABI 3100-AVANT). For the phylogenetic analysis, the variation found between the species was analyzed, using Winclada and NONA programs, where the model of Parsimony Ratchet Strategy was used and consensus trees obtained themselves to which applied an analysis of support of branches: Bootstrap and Jackknife. For the phenetic analysis, we use the GenAlEx6 program to make an analysis of principal coordinates (APC). Then, analyses of group like UPGMA and Neighbor Joining was made using program NTSYS-pc; these analyses were made with a matrix of Nei-Li distance. The results obtained with the phylogenetic and phenetic analyses display a certain congruence with previous morphologic analyses. In spite of the AFLPs have been questioned as markers equipment in phylogenetics analysis because of the bands homologies; our results are congruent between both data. It was found that the *Lanceolatae* serie is a paraphyletic group and that the previous classification of Trelease for these individual serie is artificial. In agreement with our results, that's possible to use AFLPs like a useful tool to solve phylogenetics relations while they don't exist other informative markers, and a previous hypothesis morphologic that is had it sustains it.

Key words: *Quercus*, Phylogeny, AFLPs, Paraphyletic.

II. INTRODUCCIÓN

II.1 Descripción de la familia Fagaceae

La familia Fagaceae a nivel mundial es considerada como uno de los grupos de plantas más importantes debido a su alta riqueza de especies. Esta familia esta formada por 6 géneros incluyendo al género *Quercus*.

Los encinos pertenecen al género *Quercus*, que es el más importante dentro de esta familia por presentar el mayor número de especies, además representa a uno de los grupos de árboles caducifolios y perennifolios más importantes en los bosques del hemisferio norte (Kaul, 1985). Esta familia se caracteriza por la presencia de una estructura leñosa denominada cúpula que es el resultado de la fusión de ramillas con función de protección, que rodea la base de una o varias flores imperfectas. Las flores son unisexuales, monoicas, presenta tres carpelos con 2 óvulos cada uno (aprox. 2mm). El ovario se desarrolla en un fruto indehiscente, unilocular y con una sola semilla denominada bellota; en conjunto, la cúpula y la bellota constituyen el fruto, que es el carácter que define al género (Nixon, 1989; Borgardt y Pigg, 1999). Presentan yemas escamosas, axilares y apicales, hojas 1-30 cm de largo, polen tricolpado y su dispersión es anemófila.

II.2 Descripción del género *Quercus*

Es un género de árboles de gran porte por lo general, aunque también se incluyen arbustos. Los hay de hojas perennes o caducas. Las flores masculinas presentan una estructura denominada amento, inflorescencias complejas colgantes, habitualmente con seis estambres de largos filamentos (pero los hay que tienen de cuatro a diez). Las flores femeninas están organizadas en espigas o cabezuelas, con tres estigmas; cúpula con un solo fruto, de origen axilar (de brote). Ovulos anátropos. Cotiledones planos.

La corteza suele ser lisa en los ejemplares jóvenes pero se va agrietando con la madurez (Cronquist, 1981; 1988). A las especies del género *Quercus* se les encuentra formando bosques de encino, comunidades muy características de las zonas montañosas de México. De hecho junto con los miembros del género *Pinus* constituyen la mayor parte de la cubierta vegetal de áreas de clima templado y semihúmedo; sin embargo, no se limitan a estas condiciones, pues penetran en regiones de clima caliente formando también bosques, no faltan en las regiones húmedas, siendo elementos del bosque tropical perennifolio y bosque mesófilo de montaña, y aún existen en las regiones semiáridas formando parte del matorral xerófilo, en donde asumen con frecuencia la forma arborescente (Rzedowski, 1978).

Los encinos tienen un valor ecológico importante, son pioneros de la vegetación secundaria, se consideran especies formadoras de suelo, además albergan un gran número de plantas epífitas y animales invertebrados y vertebrados (Bello y Labat, 1987).

Muchas especies tienen importancia económica por su madera de excelente calidad, su corteza y sus frutos (bellotas). Éstas han sido explotadas a escala local para su uso, en construcción; como leña, carbón, en la fabricación de muebles, mangos de diversas herramientas, cercas, pisos, barricas para el añejamiento del vino, entre otros. Alimentario; algunos frutos son comestibles como: *Quercus ilex* ssp. *ballota*, *Quercus macrolepis* y *Quercus vallonea*, y de Norteamérica, *Quercus alba*. Industrial; suministran materias colorantes *Quercus tinctoria* de Norteamérica, cuyas cortezas son tintoriales, y *Quercus coccifera*, de toda la región mediterránea, que produce una materia colorante parecida a la cochinilla, también se utiliza la corteza como "casca" para curtir pieles, ya que forman taninos con los proteínas de la piel, que son imputrescibles (suela, cuero). Farmacológico; especies mediterráneas, *Quercus infectoria* de Asia Menor, y *Quercus lusitanica* del Mediterráneo occidental producen agallas por picaduras de himenópteros galígenos, *Cynips*

galleae, en la región cambial de los brotes jóvenes; en el comercio se puede encontrar agalla de Alepo, Agalla de Basora, etc., que contienen de 60 a 70% de ácido tánico, 3% de ácido gálico y 2 % de ácido elágico, utilizadas como astringentes y hemostáticas. De ellas se obtiene ácido gálico (por hidrólisis del tánico), muy utilizado en la fabricación de muchos productos farmacéuticos, así como para la preparación de la tinta azul-negra. Botica; las cortezas de *Quercus jóvenes*, (de 12 a 20 años, en especial de *Quercus robur* en Europa y *Quercus prinus* en Norteamérica, se utilizan en terapéutica como astringentes contienen del 16 al 20 % de ácido tánico. No obstante se ha hecho un mal uso de este recurso, menospreciando el valor real que representa para México y el mundo (Rzedowski, 1981; Zavala, 1990).

II.2.1 Taxonomía del género *Quercus*

El género *Quercus* se divide a nivel mundial en dos subgéneros *Cyclobalanopsis* y *Quercus*; dentro de este último se reconocen cuatro secciones: *Cerris*, *Lobatae* (encinos rojos), *Protobalanus* (encinos intermedios) y *Quercus* (encinos blancos), de las cuales estas tres últimas secciones se encuentran en México (Nixon, 1989; Manos *et al.*, 1999)(Figura 1).

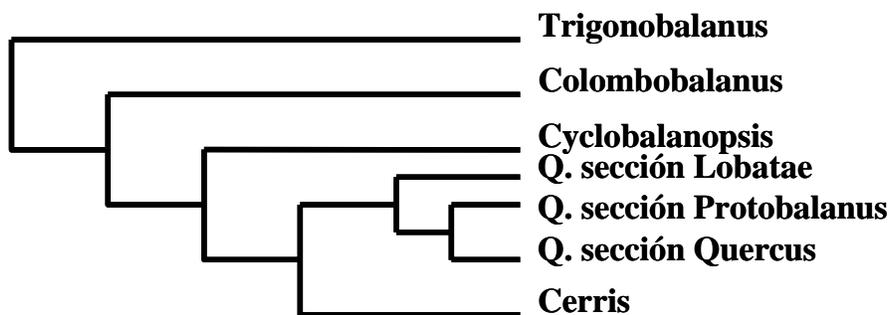


Figura 1. Relaciones filogenéticas del subgénero *Quercus*, basadas en datos morfológicos (Manos *et al.*, 1999).

Sin embargo, existen dudas sobre la delimitación taxonómica de las especies dentro del género. Originalmente se agruparon en grupos denominados “series”, circunscritos y descritos por Trelease (1924) y retomados por Camus (1936-1952) como subsecciones. La obra de Trelease (1924) comprende 133 series las cuales parecen ser grupos artificiales e inexactos a la luz de las evidencias recientes. (Figura 2).

AMERICAN OAKS.

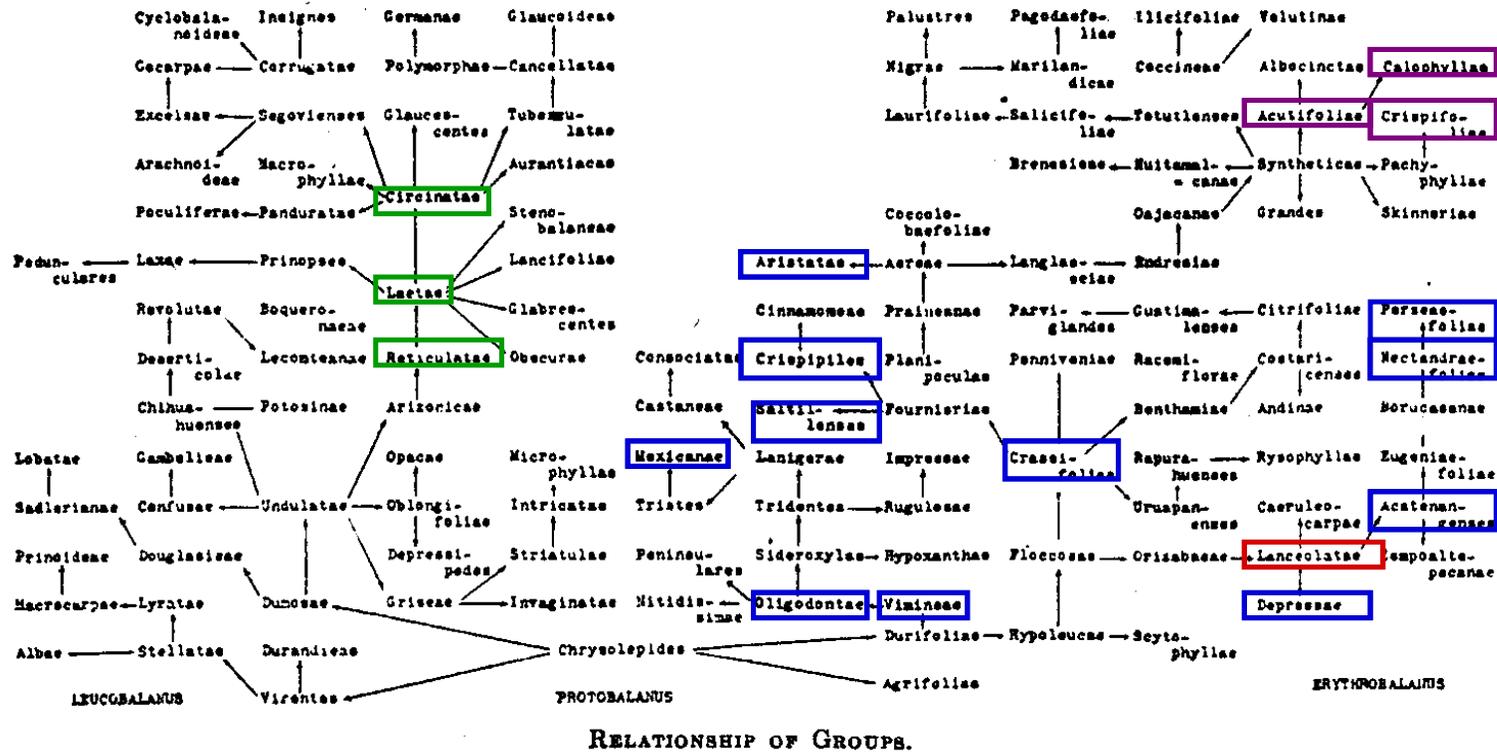


Figura 2. Relaciones de los grupos infragenéricos de los encinos americanos propuesta por Trelease (1924). En el rectángulo rojo la serie *Lanceolatae*, en los azules las series de la sección *Lobatae* que se incluyeron en el estudio, y en los verdes las series que pertenecen al grupo externo.

II.2.2 Distribución geográfica de los encinos y datos de su evolución a nivel mundial y a nivel nacional

La distribución de las especies del género *Quercus* en el Continente Americano ha variado en épocas geológicas relativamente recientes y ha mostrado discontinuidades específicas (Davis, 1981). Posiblemente, los cambios a climas más cálidos y secos han favorecido de manera reincidente la distribución de los encinos.

De unas 500 especies de encinos reportadas en el mundo (Nixon, 1989), se estiman cerca de 200 en el Continente Americano (McVaugh, 1974), en tanto que para México, la estimación más reciente comprende 161 especies de las que 109 son endémicas de México (61 rojos, 47 blancos y 1 intermedio) (Valencia, 2004).

De las 161 especies mexicanas, 73 son de la sección *Lobatae*, muchas de las cuales son especies endémicas del país (61 especies) unas de distribución restringida y otras de distribución amplia que rebasan las fronteras hacia Estados Unidos (6 especies) y Centroamérica (Valencia, 2004).

Valencia (2005) menciona que para el género *Quercus* en México, la Sierra Madre Oriental, presenta una mayor riqueza de especies, albergando el 37.5% del total de especies de encinos mexicanos distribuidos en un intervalo altitudinal de 1000 a 3000 msnm, a diferencia de la Sierra Madre Occidental y el Eje Volcánico Transversal de nuestro país. Al respecto, Nixon (1993) señala brevemente la escasez de encinos rojos en áreas relativamente secas, en contraposición a los blancos que suelen ser dominantes, este patrón refleja la escasez de especies de encinos rojos en las regiones áridas del norte de México y suroeste de Estados Unidos.

Este autor propone una regionalización en la distribución de encinos en el país considerando seis regiones geográficas y una relación de especies para cada una.

Como se mencionaba anteriormente, se considera a la Sierra Madre Oriental como la más diversa del país en especies del género *Quercus*, esta región parece ser un centro de mezcla de especies provenientes del norte y occidente del país, así como un posible puente hacia el sur del país.

Prácticamente hay encinos en todas las entidades del país, con excepción de los estados de la Península de Yucatán, en un gradiente altitudinal que va desde el nivel del mar (e. g. *Q. oleoides*) (Montoya, 1966) hasta por encima de los 3500 msnm (e.g. *Q. laurina*) (Zavala, 1990); aunque más del 95 % de las especies mexicanas se encuentran entre los 1200 y 2800 msnm (Rzedowski, 1978). Además, existen encinos en lugares con tipo de clima muy diverso, desde el cálido con época seca más o menos larga (Am, Aw) (Montoya, 1966), hasta el frío semiárido extremoso [E (T) H (e)] (*Q. greggii*) (García-Arévalo y González- Elizondo, 1991), donde la humedad edáfica o atmosférica puede ser un factor importante en la presencia de encinos, tal como sucede con *Q. agriifolia* y *Q. dumosa* en Baja California (Peinado et al., 1994). Algunas de las especies suelen encontrarse en hábitats relativamente xéricos (e.g. *Q. eduardii* en San Luis Potosí) (Zavala, 1998).

Los bosques del género *Quercus* se han estimado en 5.5% de la superficie total del territorio mexicano y 13.7% junto con *Pinus* (Rzedowski, 1978), considerándose así como uno de los componentes más ampliamente distribuidos dentro de la vegetación forestal en las zonas templadas (Bello y Labat, 1987).

México puede dividirse en dos porciones, una al norte que agrupa entidades con igual o menor número de especies de encinos rojos que de blancos y otra al sur donde las

especies de encinos blancos son de igual o menor número que de rojos. Cabe mencionar que las especies del norte del país parecen encontrarse en lugares con altitudes menores pero más secos, en tanto que las del sur se encuentran en lugares comparativamente más húmedos de las altas montañas (Rzedowski, 1978; Mohler, 1990; Nixon, 1993; Müller-Using, 1994).

II.2.3 Estado actual de la taxonomía del género *Quercus*

Es un género de taxonomía complicada, muchas de sus especies son poco conocidas (Zavala, 1990), gran parte de ellas son notablemente variables morfológicamente, lo que podría indicar una plasticidad fenotípica considerable, además de hibridarse con relativa facilidad y mostrar, consecuentemente, introgresión genética interespecífica (Whittemore y Schaal, 1991; Howard *et al.*, 1997).

Como resultado, existe una variabilidad tal que se han descrito muchas más especies de las que parece haber realmente; hay demasiados nombres de especies de encinos, particularmente para las mexicanas. Muchos nombres han aumentado la lista de sinonimias y otros permanecen en duda para incorporarlos a la relación de especies aceptadas en la literatura taxonómica del género (Muller y McVaugh, 1972; McVaugh, 1974).

Por lo anterior el propósito de esta tesis es realizar un análisis filogenético de la serie *Lanceolatae* Trelease (1924) utilizando marcadores moleculares. El estudio fue realizado bajo los siguientes criterios: 1) el montaje del marcador molecular informativo AFLP para el estudio de la diferenciación genética entre especies del género *Quercus* y 2) el establecimiento de las relaciones filogenéticas de las especies que integran la serie *Lanceolatae* Trel.

II.2.4. *Estudios particulares del género Quercus*

Los primeros estudios que se llevaron a cabo para los encinos datan del siglo XVIII, estos eran poco reconocidos desde el punto de vista botánico, solo algunas especies de *Quercus* fueron descritas por Linneo, en su obra *Species Plantarum* (1753), en donde se nombran nueve especies correspondientes a Europa y cuatro de Norteamérica (Martínez, 1981). Entre los principales trabajos que consideran los encinos americanos destaca el de Michaux (1801), en ese mismo año se realizó uno de los primeros trabajos en México para el género *Quercus* que es el de Luis Née (1801), en seguida Humboldt y Bonpland (1809) describen 20 especies nuevas del género, trabajos posteriores son los de Schlechtendal y Chamizo (1830-1832), Bentham (1840-1842), Martens y Galeotti (1843), Liebman (1854), De Candolle (1864), Oersted (en Liebmann, 1869), quienes hacen aportaciones importantes al conocimiento del género *Quercus* en México (Tomado de González, 1993).

En el siglo XX, los trabajos más trascendentes son el de Trelease (1924) en donde trata de manera monográfica a las especies de encinos de América. Éste es el mejor intento que se ha hecho por agrupar a las especies de *Quercus* de América en categorías infragenéricas (Muller, 1942). El autor menciona la abundancia que tiene este género en México y hace notar que no existe otro país con tal cantidad de especies de encinos, habiendo reconocido 112 especies para la República Mexicana. Posteriormente, se publica la obra monográfica de Camus (1936-1952), considerada la más completa que se ha publicado sobre el género *Quercus* para todo el mundo, esta obra incluye a toda la familia Fagaceae.

Después surgen una serie de trabajos para nuestro país, en donde se presentan descripciones de las especies encontradas, acompañadas de claves para su identificación y comentarios de su distribución o delimitación de algunas especies.

McVaugh (1974) realizó un estudio florístico para el territorio de Nueva Galicia. Martínez (1981) estudia caracteres generales, haciendo referencia al estado actual de la taxonomía y la descripción de numerosas especies. Rzedowski (1978) reconoce más de 150 especies de *Quercus* para México, además mencionó que es uno de los géneros mejor representados en la cubierta vegetal en áreas de clima templado y semihúmedo.

De manera más específica, se han hecho estudios en diferentes estados de la Republica Mexicana; Espinosa (1979) publicó las especies para el Valle de México, González-Villareal (1986) hace una aportación en el estado de Jalisco, Bello y Labat (1987) realizaron un estudio de los encinos del estado de Michoacán, Valencia (1995) hace una contribución al conocimiento florístico del género *Quercus* en el estado de Guerrero. Otros trabajos que permiten tener una idea de la riqueza aproximada de este género en México son el de Nixon (1993a), González (1993) y Valencia (2004).

Los trabajos que han estudiado complejos o delimitado grupos de especies, son el de Nixon (1993a) y Manos *et al.* (1999) donde trabajaron a nivel de subgénero y de sección del género *Quercus*, en esa misma época, Muller y Nixon (1992) trabajaron la subsección *Glaucoidae*, Spellenberg y Bacon (1996) estudiaron la subsección *Racemiflorae*, Valencia (1994) trabajo la serie *Lanceolatae*, Romero *et al.* (2000) estudio el complejo *Q. acutifolia-Q. conspersa* de la serie *Acutifoliae*, González *et al.* (2004) trabajaron hibridación del complejo *Q. affinis-Q. laurina* de la serie *Lanceolatae*, Tovar-Sánchez *et al.* (2004) estudiaron zonas de hibridación entre *Q. crassifolia* y *Q. crassipes* en México y por último Valencia (2005) estudio las relaciones filogenéticas de la serie *Lanceolatae* con caracteres morfológicos.

II.3 La serie *Lanceolatae*

La serie *Lanceolatae* fue descrita por Trelease (1924) pertenece al subgénero *Quercus*, sección *Lobatae*, encinos rojos (Nixon, 1993a) con distribución en la Meseta Mexicana (que se extiende en dirección SE-NO y que limita al sur con la cordillera Neovolcánica Transmexicana, al oeste con la sierra Madre occidental, al este con la sierra Madre oriental y al norte con el río Bravo) y en las cordilleras adyacentes. En un inicio la descripción de la serie incluyó 15 taxas y posteriormente, Valencia (1994) concluyó solo con 3: *Q. affinis*, *Q. laurina* y *Q. acatenangensis* (Tabla 1).

Trelease (1924) describe al grupo como:

“Árboles más bien pequeños con ramillas delgadas más o menos glabras, yemas ovoides, hojas medianas o pequeñas generalmente lanceoladas, moderadamente largas pecioladas, enteras, o con aristas cortas o poco dentadas; generalmente glabrescentes, venas más o menos elevadas en ambas superficies y fruto anual o bianual, más bien pequeño, cortamente pedicelado con escamas adpresas, canescentes o glabras”.

En los análisis posteriores a la clasificación de Trelease (1924) se propusieron cambios de nombre de las especies que conformaban la serie (Camus, 1932), reducción de algunos a sinónimos (Muller y Mc Vaugh, 1972) y revisiones taxonómicas para determinar especies distintas con parecido morfológico (Valencia, 1994).

Tabla 1. Las columnas indican las especies del género *Quercus* que ha comprendido la serie *Lanceolatae* de acuerdo con diferentes autores indicados en el primer renglón. Los nombres marcados con asterisco (*) han sido propuestos como sinónimos de *Q. laurina* y los marcados con el signo "+" lo son para *Q. affinis* (tomado de Valencia, 2005).

Trelease (1924)	Camus (1932)	Muller y Mc Vaugh (1972)	Valencia (1994)
<i>Q. affinis</i>	<i>Q. affinis</i>	<i>Q.affinis</i>	<i>Q. acatenangensis</i> <i>Q. affinis</i>
<i>Q. affinis commutate</i>	<i>Q. affinis commutata</i>	<i>Q. affinis commutata+</i>	
<i>Q. affinis f. subintegra</i>	<i>Q. affinis f. subintegra</i>	<i>Q. affinis f. Subintegra+</i>	
<i>Q. barbinervis</i>	<i>Q. barbinervis*</i>		
<i>Q. bourgaei</i>	<i>Q. bourgaei*</i>		
<i>Q. b. var. ilicifolia</i>	<i>Q. b.var. ilicifolia</i>	<i>Q. bourgaei var. ilicifolia*</i>	
<i>Q. cuajimalpana</i>	<i>Q. cuajimalpana</i>	<i>Q. cuajimalpana (serie Mex.)</i>	
<i>Q. lanceolata</i>	<i>Q. lanceolata*</i>		
<i>Q. laurina</i>	<i>Q. laurina</i>	<i>Q. laurina</i>	<i>Q. laurina</i>
<i>Q. major</i>	<i>Q. treleaseana*</i>		
<i>Q. ocoteifolia</i>	<i>Q. ocoteifolia*</i>		
<i>Q. o. f.confusa</i>	<i>Q. o. f. confusa</i>	<i>Q. o. f. confusa+</i>	
<i>Q. o..f. podocarpa</i>	<i>Q. o.f.podocarpa</i>	<i>Q. o.f.podocarpa+</i>	
<i>Q. tlapuxahuensis</i>	<i>Q. tlapuxahuensis*</i>		
<i>Q. t.v.obcónica</i>	<i>Q. t.v.obcónica</i>	<i>Q.t.v.obcónica*</i>	

Finalmente, Valencia (1994) describe a la serie *Lanceolatae* como:

“Árboles de talla mediana, de 10-25 (-40) m de alto; ramillas delgadas de 1-3.7 mm de grueso, glabras o con escaso tomento glabrescente; estípulas ausentes; yemas ovoides, conoidales lustrosas o globosas, glabras o con escamas de margen ciliado, de 1-4 (5.5) mm de largo. Hojas maduras con pecíolos de (1-)3-20 (-36) mm de largo, ligeramente alados; láminas angostamente lanceoladas; elípticas; estrechamente elípticas; elíptico-lanceoladas; lanceoladas y ovado-lanceoladas; margen entero o ligeramente dentado-aristado hacia la mitad distal; superficies glabras o envés con algunos pelos fasciculados y estipitados en las axilas de las venas secundarias o vecindad de la vena media; areolas con arreglo azaroso; vena media con grosor de moderado a delgado, de 1-2 % respecto al ancho total de la hoja. Polen tricolpado o tricolporoidado. Frutos de maduración bianual. Se distribuyen en zonas templadas o frías de la Sierra Madre Oriental, Sierra de Oaxaca, Sierra Madre del Sur, Eje Neovolcánico Transversal, Chiapas y Centro América (Guatemala)”.

II.4 Los conceptos de especie en el género *Quercus*

En el desarrollo de los diferentes conceptos de especie, desde el concepto tipológico de la era pre-evolucionista (Darwin, 1859; Wallace, 1865) hasta los conceptos modernos (e.g. Templeton, 1998), se ha buscado una definición que contemple los diversos procesos biológicos y sistemas de reproducción que regulan el acervo genético de cada grupo taxonómico. Sin embargo, un concepto universal práctico ha sido difícil de definir, lo que ha provocado un cuestionamiento sobre la existencia real de la especie en la naturaleza (e.g. Mallet, 2001).

Entre los grupos problemáticos en la definición de las especies se incluye el género *Quercus*. Este género está representado por árboles y arbustos que principalmente son alógamos, pero que pueden reproducirse por medios autógamos o asexuales. Dentro de las diferentes secciones y series de *Quercus*, los procesos de hibridación, introgresión e interespecífica son comunes.

En este estudio particular solo se aplicarán algunos conceptos de especies tal es el caso de **especie evolutiva** la cual es un linaje (secuencia de ancestros y descendientes) de poblaciones u organismos que tienen sus propias tendencias evolutivas e historia geológica (Simpson, 1951) y **linaje general** (De Queiroz, 1998): es un linaje que ha evolucionando de manera separada de otros y que posee su propio papel unitario y sus propias tendencias (Simpson, 1951). Estos conceptos combinan la idea de la especie como un linaje histórico junto con el papel evolutivo y ecológico que juegan. Por tanto, estos conceptos enfatizan la independencia evolutiva del linaje y además reconocen los elementos históricos y biológicos en la definición de la especie. Sin embargo, la independencia de los procesos

evolutivos entre las poblaciones es difícil de documentar y aplicar a los taxa que forman híbridos o intercambian genes, como es el caso de *Quercus*.

Otro de los conceptos es el **fenético** aplicando *sensu stricto* basado en similitud entre caracteres, los feneticistas ignoran los procesos evolutivos y biológicos de la misma. Se utilizan técnicas de estadística multivariada, con la inclusión de múltiples caracteres que ayudan a definir los grupos con características similares (Sokal y Crovello, 1970), los cuales se consideran especies. La técnica *sensu stricto*, ha sido criticada por los filogenetistas, aunque en realidad, la misma es muy similar a los métodos intuitivos utilizados por la mayoría de los taxónomos, ya que organiza a los individuos en grupos distintos. El concepto fenético raramente es interpretado bajo la consideración de los elementos biológicos que afectan estas agrupaciones. Este concepto implica que se pueden incluir los datos de caracteres convergentes y por tanto, en tales casos, se estarían agrupando taxa parafiléticos o polifiléticos. Asimismo, en el caso de la presencia de polimorfismo y dimorfismo sexual, las características morfológicas pueden dar como resultado el reconocimiento de especies múltiples. Por otro lado, en el caso de las especies hermanas, el uso de técnicas fenéticas puede ocasionar que estas pasen desapercibidas, si solamente se incluyen los caracteres diagnósticos.

Por otro lado, el concepto que nos interesa aplicar principalmente en este estudio es el **concepto filogenético** que define a la especie como un grupo irreducible de organismos con características diagnósticas diferentes a las de otros grupos similares y que exhibe un patrón de ancestro descendencia, Hennig (1966), utilizó la monofilia (historia única de cada taxón) como el criterio principal para definir a la especie. Según este concepto, los eventos de especiación suceden cuando una población singamética se divide en dos ramas o linajes que, provienen de un mismo ancestro y entre los cuales no hay intercambio genético. De la

misma escuela nació la cladística, cuya premisa implica que la clasificación de los organismos debe de ser basada en la monofilia. Este concepto filogenético de la especie, resultó en una nueva manera de concebirla. Por tanto, los grupos parafiléticos (que no incluyen todos los descendientes de un ancestro) o polifiléticos (que provienen de diferentes linajes), según la cladística, no son naturales. Las especies se definen como segmentos de las ramas filogenéticas o linajes y por tanto, cada evento de ramificación resulta en un nuevo par de especies.

De Queiroz (1998) argumentó que aunque estos conceptos mencionados son aparentemente diferentes o contrarios, más bien tienden a enfatizar diferencialmente los caracteres o los criterios utilizados para definir a las especies. Sin embargo, todos reconocen directamente o de manera implícita que la distinción evolutiva del linaje es el concepto principal. En el caso de un género como *Quercus*, el estado de conocimiento genético y de los mecanismos de especiación no permite la aplicación de un concepto que refleje todos los procesos involucrados.

Por tanto, hasta que se entienda de manera más completa el comportamiento de los mecanismos reproductivos, la estructura genética y las relaciones de los nichos ecológicos con respecto a la evolución del grupo, así como las interacciones existentes entre los elementos que afectan el fenotipo de las plantas, los conceptos morfológicos y fenéticos son los más útiles para analizar la variación entre especies en los encinos.

II.5 Marcadores moleculares

La taxonomía siempre ha estudiado características morfológicas, químicas, anatómicas, lo que requiere observaciones muy exhaustivas de los organismos en diferentes estadios de desarrollo. Los criterios utilizados para definir los caracteres morfológicos particulares en ocasiones pueden carecer de definición y objetividad debido a las influencias ambientales. La aparición de los marcadores moleculares está ayudando a eliminar tanto los inconvenientes de una selección basada en el análisis exclusivo del fenotipo influenciado por el ambiente, como la identificación de especies y variedades de una forma más rigurosa y reproducible.

A través del tiempo han existido controversias entre usar caracteres morfológicos o moleculares. Las diferencias esenciales en los argumentos que en ocasiones se dan a favor de los caracteres morfológicos y en otras a favor de los caracteres moleculares son: el tamaño del conjunto de datos y el costo de los análisis (Hillis y Wiens, 2000). Sin embargo, en la actualidad ya se acepta que ambos grupos de caracteres, proporcionan información valiosa y a pesar de los posibles conflictos se prefiere usar ambos tipos de caracteres. Se puede definir como “marcador” (biológico) cualquier característica heredable que permita estudiar la diversidad biológica; hasta hace algunos años la mayoría de los marcadores que se utilizaban, eran marcadores morfológicos (fenotípicos), posteriormente con el advenimiento de las técnicas de estudio de material genético (ADN), se han implementado los marcadores moleculares, que analizan diferencias en la composición (secuencia de nucleótidos) del material genético.

El uso de estos marcadores moleculares para resolver problemas taxonómicos en plantas se inició en la década de los cincuenta con el uso de las isoenzimas técnica que

persistió hasta los setenta (Market y Moller, 1959; Gottlieb, 1971; Selander *et al.*, 1986), ya en los ochenta las técnicas de manipulación y análisis habían avanzado lo suficiente como para poder estudiar las variaciones en la secuencia del ADN y ARN (Moritz y Hillis, 1996), en forma explosiva durante la última década con las modernas técnicas de biología molecular. La tendencia actual es el estudio de la diversidad y variabilidad del material genético y no de su expresión fenotípica (Awise, 1994). Las tres grandes áreas de aplicación de la sistemática molecular son a) la estructura genética de poblaciones (como variación geográfica, heterocigocidad), b) la delimitación de especies (incluyendo híbridos) y c) en la inferencia filogenética (Baverstock y Moritz, 1996).

Actualmente el uso de estos marcadores se ha vuelto tan común, que se emplean para resolver problemas taxonómicos en plantas a partir de la información de la secuencia de aminoácidos de proteínas particulares, serología (serotipificación), hibridación ADN-ADN, electroforesis de isoenzimas (MLEE), cambios en sitios los de restricción y en la secuencia de ácidos nucleicos.

Los marcadores moleculares (genotípicos) son biomoléculas que se pueden relacionar con un rasgo genético, estas son las proteínas (antígenos e isoenzimas) y el ADN (genes conocidos o fragmentos de secuencia y función desconocida). Cuando varios marcadores moleculares se asocian inequívocamente con un rasgo genético, se dice que forman un QTL (loci de rasgos cuantitativos o cuantificables). Un marcador molecular monomórfico es invariable en todos los organismos estudiados, pero cuando presenta diferencias en el peso molecular, actividad enzimática, estructura, o sitios de restricción, se dice que es polimórfico.

El uso de éstos en los análisis genéticos y en el mejoramiento de las plantas ha tenido una difusión extremadamente rápida, por ahora se vienen empleando en la

diferenciación de individuos, el análisis de la estructura y diversidad genética en poblaciones naturales y de mejoramiento, discriminación entre clones, análisis filogenéticos entre diferentes individuos y especies, análisis taxonómicos, construcción de mapas genéticos de alta cobertura genómica y la localización de genes de interés económico, cuantificación de variabilidad génica intra e interespecífica, mejoras genéticas, detección de infecciones o propensión a sufrirlas, localización de resistencia a enfermedades, dispersión de especies y mapeo de características de herencia cuantitativa QTL (Quantitative Trait Loci). Particularmente en los estudios filogenéticos se incluyen dos tipos básicos de datos del ADN: cambios en el contenido u orden del genoma y el análisis de polimorfismos en la estructuración o composición del genoma (RAPD, AFLP, etc) o el análisis de los polimorfismos en la secuencia de nucleótidos de un gen en particular.

La eficacia sistemática será mayor si el carácter utilizado no es el resultado de la influencia del medio sobre el fenotipo, por lo que el uso directo del material genético debe aportar los caracteres más fundamentales para una clasificación (Crawford, 1989; Clegg y Durban, 1990), con la ventaja adicional de que el número de datos que se pueden obtener está limitado solo por el tamaño del genoma (Hillis, 1987).

El contenido y orden de los genes es estable en las plantas (aunque en bacterias es más estable), y se ha demostrado que la tasa de cambio evolutivo en la molécula es apropiada para estudios filogenéticos prácticamente a cualquier nivel taxonómico (Palmer, 1986; 1987; Palmer *et al.* 1988).

II.7 AFLPs

La técnica fue desarrollada por Marc Zabeau para la compañía Dutch Keygene y publicada por primera vez por Vos *et al.* (1995) quienes desarrollaron la técnica de AFLP basado en la detección de fragmentos de restricción por la amplificación de PCR.

Posteriormente, Powell *et al.* (1996) sugieren que los AFLPs proporcionan altos niveles de resolución permitiendo la delimitación de estructuras genéticas complejas.

El procedimiento está basado en la amplificación selectiva de fragmentos de ADN cortados con enzimas de restricción con distintas frecuencias de corte, usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los polimorfismos detectados son de hecho cambios en, o cerca de los sitios de restricción (Simpson, 1997a; Simpson *et al.*, 1999).

El método AFLP es una combinación de RFLP con PCR donde la amplificación de la reacción es realizada usando iniciadores específicos para sitios con enzimas de restricción (Figura 3).

Los RAPD, DAF (huella digital obtenida por amplificación de secuencias al azar del ADN) y AFLP son marcadores moleculares multi-locus que analizan regiones al azar en todo el genoma (Simpson, 1997b; Simpson *et al.* 1999). Los datos de AFLP se obtienen de marcadores genéticos producto de una combinación del ADN digerido con enzimas de restricción y la ligación de las secuencias de nucleótidos específicos enlazados en los extremos por los fragmentos de restricción, seguidos por dos rondas de amplificaciones en la PCR usando iniciadores etiquetados con base en las secuencias enlazadas (Vos *et al.*, 1995; Wolfe y Liston, 1998). La técnica de AFLP se esquematiza en la Figura 3.

Simpson (1997a) y Simpson *et al.* (1999) consideran que la técnica consiste en la digestión del ADN genómico completo usando dos enzimas de restricción, generalmente las más usadas son *EcoRI* (corte raro, reconoce 6 pares de bases) y *MseI* (corte frecuente,

reconoce 4 pares de bases). Al final de los sitios de restricción se usan adaptadores moleculares adhesivos compatibles con las enzimas usadas y entonces se ligan a los fragmentos digeridos para producir fragmentos de ADN genómico bordeados por adaptadores de secuencias específicas.

De acuerdo con estos autores, se requieren dos reacciones de amplificación de PCR. En la primera amplificación (amplificación preselectiva) los oligonucleótidos usados corresponden a la secuencia de los adaptadores moleculares más un nucleótido extra interno al fragmento lo cual permite delimitar el total de productos potenciales de amplificación. Finalmente el resultado de esta amplificación es sólo fragmentos con el nucleótido extra, seguido directamente por los sitios de restricción que pueden ser amplificados; se asume que el 25% de todos los posibles fragmentos están en igual probabilidad que A, C, T y G seguido en cada sitio. Una alícuota de esta primera reacción de amplificación se toma para experimentar la segunda amplificación (amplificación selectiva) (Simpson, 1997a). En la segunda reacción se usan dos o tres nucleótidos adicionales dependiendo de la complejidad del genoma, lo que significa que sólo fragmentos con esta combinación en particular de 6 nucleótidos adyacentes a los sitios de restricción pueden ser amplificados. Uno de los oligonucleótidos en la amplificación de la segunda reacción (normalmente el homólogo al sitio de restricción de corte raro), es etiquetado con un fluoróforo (Simpson, 1997a; Simpson *et al.* 1999).

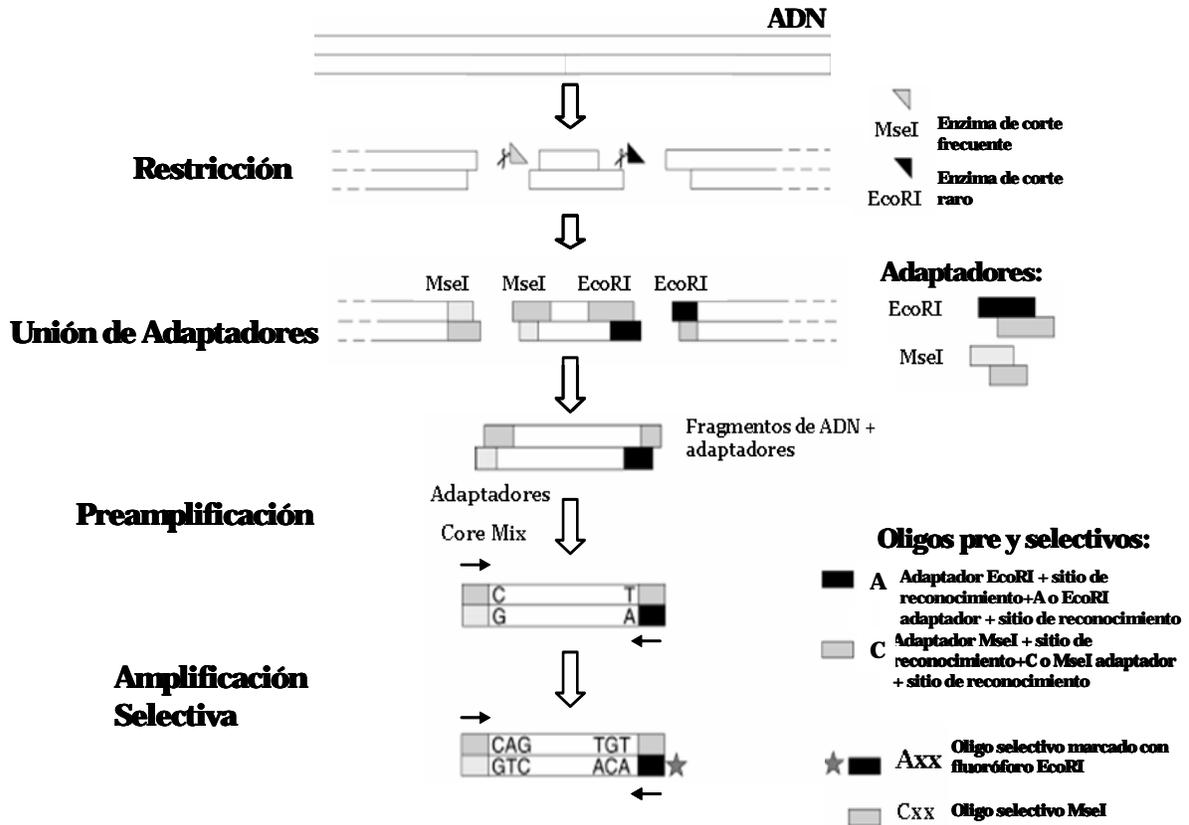


Figura 3. Diagrama del método de AFLP. Las etapas de la figura están indicadas a la izquierda y los componentes a la derecha. Para las enzimas de restricción (triángulos), adaptadores y oligonucleótidos, los símbolos rellenos con negro para la enzima de corte raro y los de gris son para la enzima de corte frecuente. La estrella representa marcaje en el extremo 5' (modificado de protocolo, Applied Biosystems, 2005).

Normalmente en el caso del ADN genómico de plantas bajo estas condiciones de amplificación, se observan 50-100 bandas por muestra (Simpson, 1997a). La selección ocurre en diferentes niveles, produciendo tres tipos de fragmentos en la digestión original: *EcoRI-EcoRI*, *EcoRI-MseI* y *MseI-MseI*; en general, Vos *et al.* (1995), sugieren que los fragmentos *MseI-MseI* y *EcoRI-EcoRI* están pobremente amplificados debido a la información de estructuras parecidas a un “ganchillo”.

Los fragmentos podrían también estar sin detectar al final del análisis desde que el oligonucleótido específico *EcoRI* está etiquetado, por lo que sólo fragmentos cortos *EcoRI-EcoRI*, *EcoRI-MseI* podrían ser detectados; este tamaño de fragmento de selección es

combinado con el uso de bases específicas seleccionadas como se menciona anteriormente, para producir un número de bandas, las que son fácilmente separadas y analizadas en geles de secuenciación, que permiten la separación de fragmentos con hasta un nucleótido de diferencia en su longitud (Simpson, 1997a). La posibilidad de usar diferentes combinaciones de oligonucleótidos selectivos en cada sitio de restricción y también el uso de diferentes enzimas de restricción hacen de la técnica AFLP una herramienta poderosa en la detección de polimorfismos a lo largo del genoma (Vos *et al.* 1995). Jugando con la complementariedad del oligonucleótido con el sitio de restricción se puede disminuir o aumentar el número de bandas amplificadas. Pequeñas variantes al protocolo de Vos y colaboradores se han propuesto, entre éstas, la de Reineke y Karlovsky (2000) en que reemplazan el iniciador etiquetado por la incorporación de nucleótidos durante la reacción de PCR o la detección por medio de quimioluminiscencia o incluso se ha usado tinción con plata (Lin *et al.*, 1997).

Las bandas observadas en los electroferogramas de AFLP son clasificadas como presentes o ausentes en cada individuo y el método es más comúnmente usado como un sistema dominante/recesivo (Simpson, 1997a)

La principal ventaja de los AFLPs es la capacidad de analizar muchos loci del genoma total de manera simultánea y rápidamente obtener gran número de marcadores y puede ser fácilmente automatizado cuando el número de muestras se incrementa.

Las marcas fluorescentes o quimioluminiscentes están reemplazando a las radiactivas y el número de puntos de datos producidos en un corto tiempo exceden los costos (Huang y Sun, 1999; Vaillancourt *et al.*, 1999). La electroforesis capilar (EC) ha sustituido rápidamente a la electroforesis en geles de acrilamida para la separación de fragmentos de ADN (Figura 4).

Comparado con los geles de acrilamida, el EC emplea más automatización, proporciona una mejor resolución e incrementa el rendimiento de procesamiento al disminuir los tiempos de corrida. Un hecho importante de recordar sobre EC [por lo menos en máquinas de ABI 3100] es que el ADN de la muestra es cargada sobre la matriz capilar de separación (un polímero líquido) por inyección electrocinética. El proceso de inyección electrocinética implica transferencia de iones negativamente cargados sobre la matriz capilar de la separación vía una fuerza electromotriz. Solamente ocurre la transferencia de los iones con carga negativa, en este proceso no hay ninguna pérdida significativa de volumen de muestra. La magnitud y la duración del voltaje aplicado a los tubos capilares durante la inyección, son directamente proporcionales a la cantidad de ADN cargado en el tubo capilar. Cuando existen las condiciones ideales, solo el ADN presente en la muestra contribuirá a la fuerza iónica y las inyecciones altamente reproductivas son posibles.

Los dos parámetros del voltaje: la inyección y el tiempo, controlan directamente la cantidad de ADN cargado sobre la matriz capilar de separación. Los valores específicos de los parámetros de la inyección son totalmente dependientes en la concentración del ADN en la muestra. Los parámetros son útiles para las reacciones selectivas de AFLP con concentraciones de los fragmentos purificados de AFLP en la gama de 50-100 ng/ul. Estos valores proporcionan las intensidades de la fluorescencia que hacen un promedio de cerca de 2100 unidades relativas de fluorescencia (urf). Esta es una intensidad ideal que no interferirá con la identificación (verdadera) del fragmento e intensidad de la fluorescencia, siendo proporcional con respecto a la concentración del fluoróforo.

Tubo capilar de ABI 3100

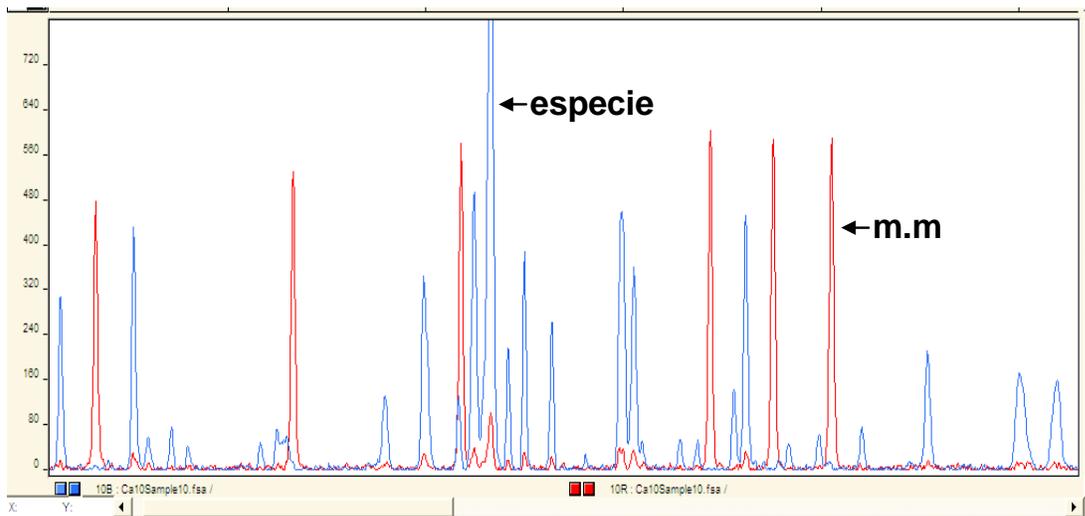


Figura 4. Electroferograma de una corrida de AFLP de *Q. candicans*, con el marcador molecular GeneScan-500 ROX en el secuenciador ABI 3100.

Comparado con los geles de acrilamida, el funcionamiento del tubo capilar realiza dos veces más exploraciones (9957 contra 19799) y proporciona la máxima resolución. Por otra parte, las bandas espectrales se definen y carecen mucho más uniformemente de las colas asimétricas visibles en los fragmentos separados en un gel de acrilamida. La sensibilidad de la detección del fluoróforo es mayor en el tubo capilar. La fuerza media de la señal del estándar IIs-600 es el rfu aproximadamente 650. De manera semejante, la intensidad media de la señal de los fragmentos de la muestra en la máquina capilar es también mayor pero no puede ser comparada directamente pues las concentraciones del fragmento son desconocidas (Figura 4). En los sistemas capilares, la velocidad de la migración del fragmento es mucho más constante sobre la gama del punto de ebullición 60-600 unidades y por lo tanto proporciona medidas más uniformes de intensidad espectral.

II.7.1 Aplicaciones

Vos *et al.* (1995) al inicio del diseño del marcador AFLP estaban interesados en el estudio del genoma, es decir la construcción de mapas genéticos de alta densidad o de fragmentos del genoma; se pretende que con este marcador se pudiera tender un puente entre los mapas genéticos y físicos (Vos *et al.* 1995).

El alto polimorfismo revelado por AFLPs ha interesado a investigadores de otros campos. Los marcadores tipo AFLP han demostrado ser útiles para evaluar diferencias genéticas entre individuos de las poblaciones incluyendo linajes independientes, dentro de especies (Mueller y Wolfenbarger, 1999), así como para el análisis de las relaciones entre especies, estudio de la diversidad genética, relaciones genéticas y estudios de variación, caracterización de genotipos, entre otros (Bai *et al.*, 1999; Barret *et al.*, 1998; Cervera *et al.*, 2001; Caicedo *et al.*, 1999; Koopman *et al.*, 2001; Lombard *et al.*, 2000; Massa *et al.*, 2001; Miyashita *et al.*, 1999; Saunders *et al.*, 2001; Schaal y Olsen, 2000; Shaun *et al.*, 2000).

También han sido usados en una amplia variedad de taxa, incluyendo plantas, hongos, animales y bacterias, para detección de variación genética, o de identificación de especies cercanamente relacionadas (e.g. Heun *et al.*, 1997; Russell *et al.*, 1997).

La mayoría de las aplicaciones de los AFLPs como marcadores moleculares están dirigidas actualmente a estudios de la diversidad y estructura genética (e.g. Russell *et al.* 1999), otros estudios tienen metas más específicas tales como investigaciones en la introgresión e hibridación (e.g. Rieseberg *et al.*, 1999; Beismann *et al.*, 1997).

Los AFLPs también se han utilizado a nivel del individuo para el análisis de paternidad y flujo génico (e.g. Krauss y Peakall, 1998).

Los marcadores multilocus brindan información rápida del genoma sobre distintos individuos, debido a esto dichos marcadores son escogidos para estudios filogenéticos (Lin

y Kuo, 1996). Una característica general de estos estudios, es que las especies o los géneros han sido investigados anteriormente usando otros marcadores (caracteres morfológicos, ADNcp, ITS, SSR, RAPDs y RFLPs); existen pocos estudios filogenéticos con AFLPs que no contaban con otros marcadores (e.g. Aggarwal *et al.*, 1999). Los estudios que han utilizado los AFLPs en análisis filogenéticos investigados previamente con otros marcadores son: Kardolus *et al.* (1998), estudiaron *Solanum*, Barret y Kidwell (1998) estudiaron *Arabidopsis* (Breyne *et al.* 1999), vid (Cervera *et al.*, 1998), arroz (Zhu *et al.*, 1998), cassava (Roa *et al.*, 1997), girasol (Hongtrakul *et al.*, 1997) y numerosas plantas (Hill y Malmberg, 1996, Powell *et al.*, 1996; Xu *et al.*, 2000). Sin embargo, otros investigadores utilizan AFLPs para crear dendrogramas, sugiriendo hipótesis evolutivas y correlacionando semejanza del patrón de AFLP con proximidad filogenética (e.g. Majer *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1997; Aggarwal *et al.*, 1999; Mace *et al.*, 1999).

También, existen estudios donde los AFLPs han sido usados para inferir relaciones filogenéticas basadas en medidas de disimilitud genética en especies cercanamente relacionadas (Huys *et al.*, 1996; Tohme *et al.*, 1996; Sharma *et al.*, 1996; Heun *et al.*, 1997; Keim *et al.*, 1997; Angiolillo *et al.*, 1999; Hansen *et al.*, 1999; Yee *et al.*, 1999; Mace *et al.*, 1999a; Ibid, 1999b; Loh *et al.*, 2000a; Roldán-Ruiz *et al.*, 2000) y en relaciones interespecíficas e intergenéricas (Loh *et al.*, 2000b; Saunders *et al.*, 2000; Van Huylenbroeck *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2000).

Más específicamente y de acuerdo con el enfoque de nuestro trabajo se han realizado estudios de relaciones filogenéticas entre especies con AFLPs, tal es el caso de Dodd *et al.* (2003) quienes estudiaron las relaciones filogenéticas entre cuatro especies de encinos rojos de California y la estructura genética de sus poblaciones.

Gottlieb *et al.* (2005) clarifican las relaciones filogenéticas de las especies representativas del género *Ilex* usando AFLPs en combinación con ITS. Mace *et al.* (1999a) con la técnica de AFLPs evaluaron las relaciones de 12 especies dentro de la tribu Datureae. Negi *et al.* (2000) investigaron las relaciones inter e intraespecíficas en las dos especies de *Withania* con la técnica AFLPs. Després *et al.* (2003) infirieron relaciones filogenéticas entre 15 especies de *Trollius* relacionadas cercanamente. Cammareri *et al.* (2004) establecieron las relaciones genéticas entre 14 especies de *Aster*, tomando en cuenta los caracteres morfológicos, número de cromosomas y diversidad genética con AFLPs. Koopman *et al.* (2001) establecieron relaciones cercanas entre 20 especies de *Lactuca*, corroborándolas con AFLPs. Segura *et al.* (2002) estudiaron los niveles intra e interespecífico dentro del género *Passiflora* con particular énfasis en el subgénero *Tacsonia* y las relaciones filogenéticas de 21 especies con el subgénero *Passiflora*. McGregor *et al.* (2002) y Vanden Berg *et al.* (2002) usaron AFLPs para diferenciar especies que son similares morfológicamente. Lara *et al.* (2004) estudiaron inferencias filogenéticas de las especies de *Solanum* sect *Petota*. del norte y centro América, comparando los resultados con ADNcp y datos morfológicos.

II.6.2 Ventajas y limitantes

Las ventajas del uso de los AFLPs como marcador molecular son: (1) no se requiere información precisa de las secuencias; (2) detectan un gran número de bandas polimórficas; (3) la técnica es altamente reproducible; (4) las amplificaciones se realizan bajo condiciones de alta selectividad (alta astringencia), “mostrando casi una perfecta replicabilidad” (Wolfe y Liston, 1998; Mueller y Wolfenbarger, 1999); (5) utilizan pequeñas cantidades de ADN (las muestras pueden estar parcialmente degradadas);

(6) pueden ser generados a gran velocidad; (7) pueden segregarse de forma mendeliana y ser usados para análisis genéticos de poblaciones y análisis tipo QTL; (8) el nivel de resolución es bueno tanto en electroforesis en geles de agarosa, en geles de poliacrilamida o con métodos automatizados como la electroforésis capilar (EC) (Mueller y Wolfenbarger, 1999) (Tabla 2).

Las limitantes incluyen (1) el número de pasos requeridos es mayor para la producción de resultados; (2) la mayoría de otros métodos basados en PCR pueden usar geles de agarosa para llevar a cabo la electroforesis y teñidos con bromuro de etidio; (3) el costo es mayor, comparada con las técnicas tradicionales (Martínez, 1997); (4) la separación de fragmentos radioetiquetados necesita del uso de electroforesis en geles de poliacrilamida o en un secuenciador automatizado para fragmentos etiquetados radiactivamente (Wolfe y Liston, 1998) (Tabla 2).

Tabla 2. Ventajas, desventajas y aplicaciones del marcador molecular AFLP.

Ventajas	Desventajas	Aplicaciones
Es una técnica robusta y confiable, no afecta variaciones pequeñas en los procesos de amplificación	La calidad de los datos es limitada porque el marcador es dominante (no es discernible la heterocigocidad) las bandas pueden algunas veces consistir en productos comigrantes y es difícil asignar su identidad (bandas no-independientes)	Análisis de relaciones filogenéticas entre especies, géneros, tribus
Es una herramienta poderosa para estudios moleculares	Genera un alta cantidad de información que necesita análisis automatizados y tecnología computacional	Análisis de diferenciación molecular
Eficiencia de amplificar un gran número de fragmentos restringidos simultáneamente (alto proporción de polimorfismos) por PCR	Técnica demandante en laboratorio y especialmente en análisis de datos	Análisis de diversidad genética
Reconocimiento de bandas diagnósticas	Introduce sesgos dentro de los estimadores aun siendo analizados por estudios fenéticos o cladísticos	Mapeo genómico
Visualiza presencia o ausencia de fragmentos de restricción		Análisis de distancia genética
Los nucleótidos selectivos al final de los primers AFLP reducen el número de bandas (50-100 fragmentos)		
El número de fragmentos obtenidos incrementa, con el número del tamaño del genoma		
El numero de fragmentos amplificados es controlado por la frecuencia de la enzima de corte raro y el número de bases selectivas		
Correlación lineal entre núms. de fragmentos amplificados y el tamaño del genoma		
No información a prior de secuencias del genoma estudiado		
Distribución de bandas al azar a través del genoma		
Método aplicable a todas las especies y altamente reproducible		

III OBJETIVOS

III.1 OBJETIVO GENERAL

Realizar un estudio filogenético de las especies que forman la serie *Lanceolatae* Trelease, sección *Lobatae*, del género *Quercus* utilizando marcadores moleculares.

III.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Probar el marcador molecular AFLP para el estudio de la diferenciación genética entre especies del género *Quercus*.
- Establecer las relaciones filogenéticas de las especies que integran la serie *Lanceolatae* Trel. sección *Lobatae*, del género *Quercus* con base en caracteres moleculares.

IV. HIPÓTESIS

Las relaciones filogenéticas construidas con base en los marcadores moleculares confirmarán la hipótesis propuesta por Valencia (2005) con caracteres morfológicos sobre la parafilia y las relaciones filogenéticas de la serie *Lanceolatae*, la que no es reconocida como grupo monofilético.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 Selección de taxa

Este proceso se inició tomando como base el análisis filogenético de la serie *Lanceolatae* Trel. sección *Lobatae* del género *Quercus*, Fagaceae con base en caracteres morfológicos realizado por Valencia (2005); quien a su vez puso a prueba las relaciones de esta serie de encinos americanos propuestas por Trelease (1924) (Figura 2).

Debido a que el análisis filogenético con caracteres morfológicos mostró que la serie *Lanceolatae* es un grupo parafilético y que la mayoría de las series representadas en este análisis son artificiales (Valencia, 2005), se consideró importante realizar un estudio con caracteres moleculares para confirmar la parafilia de la serie *Lanceolatae*. En esta tesis se incluyeron las tres especies pertenecientes a la serie, reconocidas por Valencia, 2005 (*Q. affinis*, *Q. laurina* y *Q. ocoteifolia*) y otras especies pertenecientes a distintas series de la sección *Lobatae*, tales como: *Mexicanae*, *Saltillenses*, *Oligodontae*, *Viminae*, *Durifoliae*, *Benthamiae*, *Rapurahuenses*, *Uruapanenses*, *Depressae* y *Acatenangenses*, además, se incluyeron otras series consideradas como grupos externos alejados de la serie *Lanceolatae* como *Acutifoliae*, *Callophyllae* y *Crassifoliae*.

Finalmente se seleccionaron representantes de encinos de la sección *Quercus* (encinos blancos) como *Q. rugosa*, *Q. magnoliifolia*, *Q. laeta* y un representante del género *Fagus*: *Fagus mexicana* (perteneciente a la familia Fagaceae), la inclusión de grupos más alejados (de otra sección y de la misma familia) llevaría a obtener un árbol enraizado y así poder tener un grupo externo diferente a la sección *Lobatae* además de polarizar mejor el árbol.

En este estudio molecular se incluye a la mayoría de las especies consideradas en el análisis morfológico por Valencia (2005) (22 de las 30 especies: 73%) adicionando cuatro especies más como grupo externo, siendo un total de 26 especies (78 muestras: tres individuos por cada especie) (Tabla 3).

Tabla 3. Especies y series del género *Quercus* incluidas en el análisis cladístico molecular (* Series cercanas a *Lanceolatae*; ** Series alejadas a *Lanceolatae*). Entre paréntesis se incluye el número de especies incluidas de cada serie en el estudio y el número de especies que comprende la respectiva serie. (Modificado de Valencia, 2005)

SERIES	Especies incluidas en el análisis morfológicos (Valencia, 2005)	Especies incluidas en el análisis molecular
* <i>Acatenangenses</i>	<i>Q. acatenangensis</i> (1 de 1, 100%)	1 de 1
** <i>Acutifoliae</i>	<i>Q. acutifolia</i> (1 de 7, 14%)	1 de 1
** <i>Aristatae</i>	<i>Q. aristata</i> (1 de 1, 100%)	1 de 1
** <i>Benthamiae</i>	<i>Q. benthamii</i> , <i>Q. rubramenta</i> (2 de 3, 75%)	1 de 2
** <i>Calophyllae</i>	<i>Q. candicans</i> (1 de 1, 100%)	1 de 1
** <i>Crassifoliae</i>	<i>Q. crassifolia</i> (1 de 4, 25%)	1 de 1
* <i>Crispifoliae</i>	<i>Q. crispifolia</i> (1 de 1, 100%)	1 de 1
** <i>Crispripiles</i>	<i>Q. crispipilis</i> (1 de 1, 100%)	1 de 1
* <i>Depressae</i>	<i>Q. depressa</i> (1 de 1, 100%)	1 de 1
** <i>Durifoliae</i>	<i>Q. emoryi</i> (1 de 2, 50%)	0 de 1
<i>Lanceolatae</i>	<i>Q. laurina</i> , <i>Q. affinis</i> y <i>Q. ocoteifolia</i> (3 de 3, 100%)	3 de 3
** <i>Mexicanae</i>	<i>Q. mexicana</i> (1 de 2, 50%)	1 de 1
** <i>Nectandraefolia</i>	<i>Q. elliptica</i> (1 de 1, 100%)	1 de 1
** <i>Oligodontae</i>	<i>Q. eduardii</i> (1 de 1, 100%)	1 de 1
** <i>Perseaefolia</i>	<i>Q. sapotiifolia</i> (1 de 1, 100%)	1 de 1
** <i>Eugeniifoliae</i>	<i>Q. seemanni</i> (1 de 2, 50%)	0 de 1
** <i>Saltillenses</i>	<i>Q. saltillensis</i> y <i>Q. acherdophylla</i> (2 de 2, 100%)	2 de 2
** <i>Uruapenses</i>	<i>Q. trinitatis</i> (1 de 2, 50%)	0 de 1
** <i>Viminae</i>	<i>Q. viminea</i> (1 de 1, 100%)	1 de 1
Sin serie	<i>Q. gentryi</i> , <i>Q. hirtiifolia</i> , <i>Q. mulleri</i> , <i>Q. nixoniana</i> , <i>Q. pinnativenulosa</i> , <i>Q. sp.1</i> y <i>Q. sp. 2</i>	3 de 7
Especies externas <i>Reticulatae</i> <i>Laetae</i> <i>Cincinatae</i> <i>Familia Fagaceae</i>		<i>Q. rugosa</i> <i>Q. laeta</i> <i>Q. magnoliifolia</i> <i>Fagus mexicana</i>

V.2 Trabajo de herbario

Se llevó a cabo la revisión exhaustiva de ejemplares de las 26 especies de estudio (apéndice I) en los herbarios del instituto de Biología, UNAM (MEXU) y el Herbario de la Facultad de Ciencias, UNAM.

V.3 Trabajo de campo

Se realizaron 6 salidas al campo colectando en 13 estados: Michoacán (Feb-Mar, 2005) Guerrero, Estado de México, Hidalgo (Abril, 2005), Oaxaca (Julio, 2005), Nayarit, Sinaloa, Durango, Zacatecas, Tlaxcala, Puebla (Agosto, 2005), Jalisco (Septiembre, 2005), Chiapas (Marzo-Abril, 2006) donde se colectó material herborizado de todas las especies a estudiar (Tabla 4; Figura 5).

Se tomaron muestras de tres individuos por especie para: a) extracción de ADN de cada individuo se colectaron entre 5-10 hojas de las más jóvenes, las que fueron dispuestas en bolsas de plástico etiquetadas (localidad y núm. de colecta e.g: mot1 para la colecta del primer individuo de Motozintla de Mendoza) para llevar un control, el material colectado se colocó en un tanque de nitrógeno líquido y se transportó hasta el laboratorio, b) ejemplares de herbario, se colectaron 3 ramas de cada individuo, se tomaron datos de campo, etiquetaron, prensaron y secaron, para su posterior identificación.

V.4 Identificación de ejemplares en el herbario

La identificación de las 26 muestras del material herborizado de los encinos colectados, en el herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM con la asesoría de la Dra. Susana Valencia, experta en taxonomía de encinos.

Para conocer las características importantes de clasificación de los encinos colectados, los ejemplares se revisaron: claves dicotómicas de identificación, fotografías, artículos publicados de algunas de las especies de estudio y bibliografía especializada del género *Quercus* (Trelease, 1924; Muller, 1942; Mc Vaugh, 1974; González-Villareal, 1986; Bello *et al.*, 1987; Zavala-Chávez, 1992).

Los ejemplares de respaldo de la investigación se montarán y serán depositados, en el herbario de la fac. de ciencias UNAM y en la colección del laboratorio de ecología genética, CIEco.

Tabla 4. Ubicación geográfica de las 26 especies de *Quercus* analizadas en este estudio,

ESPECIES	LOCALIDAD
<i>Quercus acatenangensis</i> Trel.	Motozintla de Mendoza Lat. 15° 22' 51.5" N, Long. 92° 19' 44.5" W, 2296 msnm. CHIAPAS. Tenejapa Lat. 16° 49' 01.07" N, Long. 92° 31' 00.45" W, 2094 msnm. CHIAPAS. Teopisca Lat. 16° 31' 52.1" N, Long. 92° 28' 09.2" W, 1795msnm. CHIAPAS.
<i>Quercus acherdophylla</i> Trel.	Coscomatepec Lat. 19° 04' 04" N, Long. 97° 14' 24" W, 2400 msnm. VERACRUZ. Tonayan Lat. 19° 41' 32.11" N, Long. 96° 54' 02.31" W, 2300 msnm. VERACRUZ. Acaxochitlan Lat. 20° 10' 00.37" N, Long 98° 12' 28.12" W, 2244 msnm. HIDALGO.
<i>Quercus acutifolia</i> Née	Filo de Caballo Lat. 17° 36' 280" N, Long. 99° 47' 240" W, 6513 msnm. GUERRERO. Cuarenteño Lat. 21° 27' 846", Long. 105° 00' 88" W, 4199 msnm. NAYARIT. Santo Domingo Yanhuatlán Lat. 17° 32' 31.8" N, Long. 97° 22' 8.6" W, 2344 msnm. OAXACA.
<i>Quercus affinis</i> Scheidw	Acaxochitlan Lat. 20° 10' 00.37" N, Long 98° 12' 28.12" W, 2244 msnm.HIDALGO. Paxtepec Lat. 20° 03' 660" N, Long. 98° 26' 453" W. 7650 msnm. HIDALGO. San Juan Tlale Lat. 19° 14' 331"N, Long. 98° 30' 956" W, 2424 msnm. PUEBLA.
<i>Quercus aristata</i> Hook & Arn.	Cabo Corrientes Lat. 20° 23' 30" N, 105° 15' 00" W, 1190 msnm. JALISCO. Jalcocotlan Lat. 21° 28' 11.7" N, 105° 07' 11.6" W, 1000 msnm. NAYARIT. Moyahua Lat. 21° 16' 04.49" N, Long. 103° 10' 07.89" W, 1500 msnm. ZACATECAS.
<i>Quercus candicans</i> Nee	Cerro de San Miguel Lat. 19° 28' 517" N, Long. 101° 42' 246" W, 2266 msnm. MICHOACÁN. Tequila

	Lat. 20° 47' 746" N, Long. 103° 50' 973" W, 1205 msnm. JALISCO. Cha Lat. 17° 12' 424" N, Long. 97° 53' 130" W, 2176 msnm. OAXACA.
<i>Quercus crassifolia</i> H & B	Capultepec Lat. 17° 19' 394" N, Long. 96° 27' 513" W, 6897 msnm. OAXACA. Manantlan Lat. 19° 35' 762" N, Long. 104° 12' 871" W, 1289 msnm. JALISCO. Coacomán Lat. 18° 44' 116" N, Long. 103° 15' 770" W, 1898 msnm. MICHOACÁN.
<i>Quercus crispifolia</i> Trel.	San Miguel Mixtepec Lat. 16° 08' 17.2" N, Long. 97° 00' 55.5" W, 1006 msnm. OAXACA. San Miguel del Puerto Lat. 15° 59' 48" N, Long. 96° 6' 36" W, 1010 msnm. OAXACA. Paraíso Lat. 22° 22' 00" N, Long. 103° 27' 00" W, 4612 msnm. GUERRERO.
<i>Quercus crispipilis</i> Trel.	Comitán de Domínguez Lat. 16° 18' 01.6" N, Long. 92° 14' 44.3" W (2 individuos) CHIAPAS. Teopisca Lat. 16° 31' 52.1" N, Long. 92° 28' 09.2" W, 1795 msnm. CHIAPAS.
<i>Quercus depressa</i> Humb & Bonpl	Chiconquiaco Lat. 19° 44' 45.61" N, Long. 96° 46' 42.77" W, 1800 msnm. VERACRUZ. Acaxochitlan Lat. 20° 10' 00.37" N, Long. 98° 12' 28.12" W, 2244 msnm. HIDALGO. Santiago papasquiario Lat. 25° 02' 33.34" N, Long. 105° 25' 11.94" W, 2500 msnm. DURANGO.
<i>Quercus eduardii</i> Trel.	Canelas Lat. 25° 07' 338" N, Long. 106° 30' 192" W, 8535 msnm. DURANGO Sierra de Bolaños Lat. 21° 55' 263" N, Long. 103° 52' 722" W, 2544 msnm. JALISCO. El puertecito Lat. 21° 39' 434" N, Long. 103° 09' 194" W, 7767 msnm. ZACATECAS.
<i>Quercus elliptica</i> Née	El tuito Lat. 20° 19' 23.26" N, Long. 105° 19' 52.67" W, 550 msnm. JALISCO. Km 193 Lat. 15° 57' 970" N, Long. 96° 27' 769" W, 3807 msnm. OAXACA. Motozintla Lat. 15° 14' 37.6" N, Long. 92° 16' 48.4" W, 2321 msnm. CHIAPAS.
<i>Quercus gentry</i> C.H. Muller	Concordia Lat. 23° 16' 44.30" N, Long. 106° 04' 34.48" W, 1600 msnm. SINALOA. Cuitzeo Lat. 19° 57' 22.2" N, Long. 101° 07' 27.8" W, 2396 msnm. MICHOACÁN, (2 individuos).
<i>Quercus laurina</i> Humb & Bonpl.	Xácala Lat. 20° 49' 02" N, Long. 99° 15' 536" W, 6949 msnm. HIDALGO. Sierra de Bolaños Lat. 21° 55' 263", Long. 103° 52' 722" W, 2544 msnm. JALISCO. Motozintla Lat. 15° 22' 51.5" N, Long. 92° 19' 44.5" W, 2296 msnm. OAXACA.
<i>Quercus sp. 2</i>	Sierra de Iguatlatlaco Lat. 17° 36' 280" N, Long. 99° 47' 240" W, 6513 msnm. GUERRERO, (3 individuos).
<i>Quercus mexicana</i> Humb et Bonpl	Paxtepec Lat. 20° 03' 660" N, Long. 98° 26' 453" W, 7650 msnm. HIDALGO. San Juan Tlale Lat. 19° 14' 331" N, Long. 98° 30' 956" W, 2424 msnm. PUEBLA. Edo. México Lat. 19° 24' 743" N, Long. 100° 01' 666" W, 8799 msnm. EDO. DE MÉXICO.
<i>Quercus nixoniana</i> Valencia et Lozada	Atoyac de Alvarez Lat. 17° 12' 09.43" N, Long. 100° 25' 46.41" W, 46 msnm. GUERRERO. Sierra de Iguatlatlaco Lat. 17° 36' 280" N, Long. 99° 47' 240" W, 6513 msnm. GUERRERO, (2 individuos).
<i>Quercus ocoteifolia</i> Liebm	Teotitlán de Flores Magon Lat. 18° 10' 18.5" N, Long. 97° 00' 11.8" W, 2271 msnm. OAXACA. San Juan Ozolotepec Lat. 17° 16' 57.65" N, Long. 95° 34' 34.70" W, 259 msnm. OAXACA. Camarón Lat. 16° 33' 00" N, Long. 95° 57' 00" W, 1416 msnm. OAXACA.

<i>Quercus rubramenta</i> Trel.	Chichihualco Lat. 17° 40' 57.95" N, Long. 99° 38' 59.52" W, 1301 msnm. GUERRERO. Sierra de Igualatlaco Lat. 17° 36' 280" N, Long. 99° 47' 240" W, 6513 msnm. GUERRERO. Zimatlán Lat. 16° 51' 11.81" N, Long. 96° 46' 26.58" W. 1482 msnm. OAXACA.
<i>Quercus satillensis</i> Trel.	Monte Escobedo Lat. 22° 22' 00" N, Long. 103° 27' 00" W. ZACATECAS
<i>Quercus sapotifolia</i> Liebm	San Pedro Tapanatepec Lat. 16° 30' 32.3" N, Long. 94° 12' 03.8" W, 1183 msnm. OAXACA. San Miguel Chimalapa Lat. 16° 36' 55.0" N, Long. 94° 11' 46.9" W, 1135 msnm. OAXACA. Actopan Lat. 19° 30' 16.80" N, Long. 96° 36' 06.71" W, 233msnm. VERACRUZ.
<i>Quercus viminea</i> Trel.	Canelas Lat. 25° 07' 00" N, 106° 30' 00" W, 2845 msnm. DURANGO, (3 individuos).
<i>Quercus laeta</i>	Canelas Lat. 25° 07' 00" N, Long. 106° 30' 00" W, 2845 msnm. DURANGO, (2 individuos). Valparaíso Lat. 22° 40' 415", Long. 103° 45' 573" W, 6941 msnm. ZACATECAS.
<i>Quercus magnoliifolia</i>	Tejupilco Lat. 19° 02' 00" N, Long. 100° 04' 00" W, 1886 msnm. ESTADO DE MÉXICO. Papalutla Lat. 17° 44' 00" N, Long. 97° 54' 00" W, 2194msnm. OAXACA. Cacalutan Lat. 21° 05' 00" N, Long. 104° 14' 00" W, 1164msnm, NAYARIT.
<i>Quercus rugosa</i>	Tlalpujahuá Lat. 19° 46' W 100° 12' W, 2617 msnm. MICHOACAN. Ignacio Zaragoza Lat. 19° 42' N, Long. 97° 35' W, 2516msnm. PUEBLA. Terrenate Lat. 19° 30' N, Long. 97° 54' W, 2750 msnm. TLAXCALA.
<i>Fagus grandifolia</i> Ehrl. subs. <i>Mexicana</i>	Zacualtipán Lat. 20° 39' 03.11" N. Long. 98° 39' 15.87" W. 1980 msnm. HIDALGO, (3 individuos).

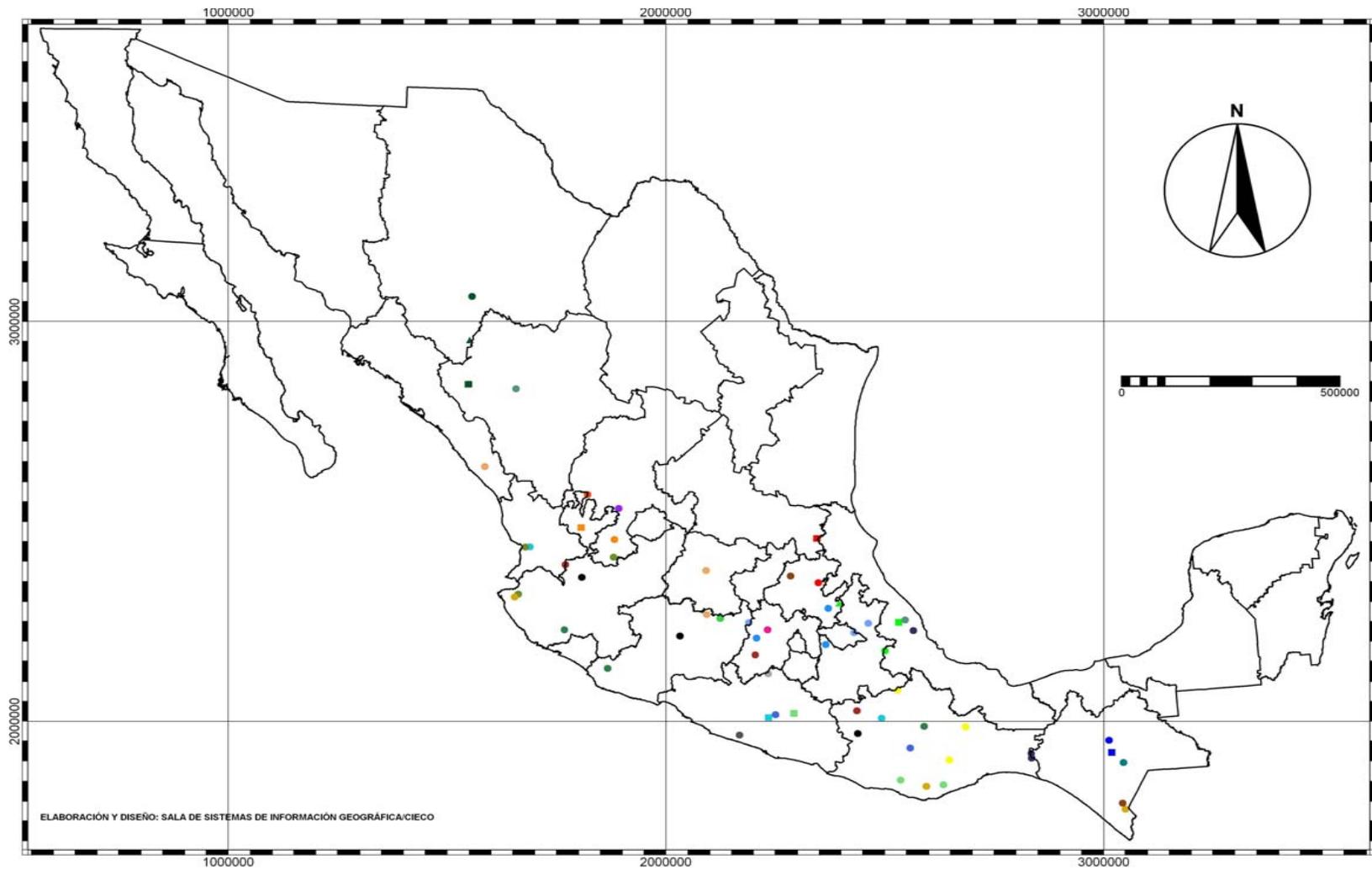


Figura 4. Localización geográfica de las 26 especies empleadas en este estudio, con 3 individuos por cada una (en la siguiente pagina se muestra la leyenda).

LEYENDA

- | | | |
|---|--|---|
| ● Fagus grandifolia Ehrh subs mexicana 1 | ● Quercus crispifolia Trel 1 | ● Quercus mexicana Humb & Bonpl 1 |
| ■ Fagus grandifolia Ehrh subs mexicana 2, F. grandifolia Ehrh subs mexicana 3 | ● Quercus crispifolia Trel 2 | ● Quercus mexicana Humb & Bonpl 2 |
| ● Quercus acatenangensis Trel. 1 | ■ Quercus crispifolia Trel 3 | ● Quercus mexicana Humb & Bonpl 3 |
| ● Quercus acatenangensis Trel. 2 | ● Quercus crispipilis 1,3 | ● Quercus nixoniana 1 |
| ■ Quercus acatenangensis Trel. 3, Q. crispipilis 2 | ● Quercus depressa Humb & Bonpl 1 | ● Quercus ocoteifolia Liebm 1 |
| ● Quercus acherdophylla 1 | ● Quercus depressa Humb & Bonpl 3 | ● Quercus ocoteifolia Liebm 2 |
| ■ Quercus acherdophylla 2, Q. affinis Scheid 2 | ● Quercus eduardii Trel 1 | ● Quercus ocoteifolia Liebm 3 |
| ▲ Quercus acherdophylla 3, Q. depressa Humb & Bonpl 2 | ■ Quercus eduardii Trel 2, Q. laurina Humb & Bonpl 2 | ● Quercus rubramenta Trel 1 |
| ● Quercus acutifolia Nee 2 | ● Quercus eduardii Trel 3 | ● Quercus rubramenta Trel 3 |
| ● Quercus acutifolia Nee 3 | ● Quercus elliptica Nee 1 | ● Quercus rugosa 1 |
| ■ Quercus acutifolia Née 1, Q. affinis Scheid 1, Q. sp2 1, Q. nixoniana 2, Q. rubramenta Trel 2 | ● Quercus elliptica Nee 2 | ● Quercus rugosa 2 |
| ● Quercus affinis Scheid 3 | ● Quercus elliptica Nee 3 | ● Quercus rugosa 3 |
| ● Quercus aristata Hook & Arn. 1 | ● Quercus gentryi C.H. Muller 1 | ● Quercus saltilensis 1, Q. saltilensis 2, Q. saltilensis 3 |
| ● Quercus aristata Hook & Arn. 2 | ● Quercus gentryi C.H. Muller 2 | ● Quercus sapotifolia Liebm 1 |
| ● Quercus aristata Hook & Arn. 3 | ● Quercus gentryi C.H. Muller 3 | ● Quercus sapotifolia Liebm 2 |
| ● Quercus candicans Nee 1 | ● Quercus laeta 3 | ● Quercus sapotifolia Liebm 3 |
| ● Quercus candicans Nee 2 | ● Quercus laurina Humb & Bonpl 1 | ● Quercus sp2 2, Q. nixoniana 3 |
| ● Quercus candicans Nee 3 | ● Quercus laurina Humb & Bonpl 3 | ● Quercus sp2 3 |
| ● Quercus crassifolia H & B 1 | ● Quercus magnoliifolia 1 | ■ Quercus viminea Trel 1, Q. laeta 1 |
| ● Quercus crassifolia H & B 2 | ● Quercus magnoliifolia 2 | ▲ Quercus viminea Trel 2, Q. laeta 2 |
| ● Quercus crassifolia H & B 3 | ● Quercus magnoliifolia 3 | ● Quercus viminea Trel 3 |

V.5 Extracción de ADN

El ADN se extrajo de las hojas colectadas y congeladas a -72°C , según el método Lefort y Douglas (1999) con las siguientes modificaciones. Se pesaron de 100-120 mg de tejido vegetal, el que se maceró en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino, inmediatamente se añadieron 160 μl de solución CTAB (Tris-HCl 1M, H_2O destilada, CTAB 1%, NaCl 5M, EDTA 0.5M, PVP-40, ácido ascórbico, DIECA (ácido diethyldithiocarbámico sal de sodio, 2- mercaptoetanol), previamente calentada en baño maría a 65°C durante 20 minutos, se molió hasta obtener una consistencia pastosa, enseguida se añadieron 600 μl de Solución Dellaporta (Tris 1M, EDTA 0.5M, NaCl 5M, H_2O) (Dellaporta *et al.*, 1983), se molió hasta obtener una consistencia homogénea y líquida, posteriormente la mezcla se transfirió a tubos Eppendorf de 1.5 ml esterilizados y previamente etiquetados, se agregaron 100 μl de SDS al 20%, se agitó vigorosamente (con las manos) durante 2 minutos. Los tubos se incubaron en baño maría a 65°C , por 5 minutos posteriormente se agitaron vigorosamente por 1 minuto y se incubaron otros 5 minutos en baño maría a 65°C . Los tubos se destaparon y se dejaron enfriar un poco, se agregaron 180 μl de solución de acetato de potasio 5M mantenida a -20°C enseguida, se agitaron los tubos durante 2 minutos, enseguida se incubaron durante 5 minutos a -20°C , enseguida se centrifugaron durante 20 minutos a 13,000 rpm.

La fase acuosa (aprox. 600 μl) se transfirió a tubos nuevos, se añadieron 600 μl de isopropanol previamente enfriado a -20°C , los tubos se agitaron suavemente e incubaron a -20°C durante 15 minutos o toda la noche.

Posteriormente se centrifugaron a 13,000 rpm durante 20 minutos, el sobrenadante se tiró y se decantaron los tubos por inversión sobre una sanita. Enseguida se agregó 600 μl

de TE pH8 (10 mM Tris, HCl pH8 y 1 mM EDTA) y se agito la pastilla (ADN) hasta resuspenderla. Enseguida se agregaron 1 μ l de ARNasa (Invitrogen) y se incubó durante 2 horas a 37°C. Posteriormente se agregaron 600 μ l de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1), se agitó y centrifugó durante 5 minutos a 13,000 rpm. La fase acuosa se transfirió a tubos nuevos y se agregaron 600 μ l de cloroformo-isoamílico, se centrifugaron durante 5 minutos a 13,000 rpm. La fase acuosa se transfirió a tubos nuevos, se agregó 60 μ l de acetato de sodio 3M y 600 μ l de isopropanol a -20°C, se agitaron suavemente los tubos y se incubaron a -20°C durante 10 minutos, enseguida se centrifugaron durante 5 minutos a 13,000 rpm, el sobrenadante se tiró y se decantaron los tubos nuevamente por inversión sobre una sanita.

Las pastillas se secaron durante 30 minutos en la estufa a 60°C y posteriormente se resuspendieron en 100 μ l de TE pH8, finalmente las alícuotas se almacenaron a 4°C.

V.6 Cuantificación del ADN

La concentración de ADN en las muestras, se calculó por la medición de la absorbancia a 260-280 nm con un biofotómetro (DyNA QUANT 200 Hoefer Pharmacia Biotech); la pureza respecto a la relación de absorbancia se determinó 260/280 nm (A_{260}/A_{280}) para proteínas y 260/230 (A_{260}/A_{230}) para polifenoles.

Para la cuantificación se diluyó 1 μ l de la muestra de ADN en 500 μ l de agua, transfiriéndose a una celda de 1ml para obtener la absorbancia de la solución. Se obtuvieron cantidades de ADN, que oscilaban entre 1000-5000 ng/ μ l= 1-5 μ g/ μ l.

V.7 Calidad y Pureza del ADN

Para asegurar que la calidad del ADN en la muestra fuera la suficiente para utilizarlo con la técnica AFLP, se digirió con la enzima *EcoRI* (Invitrogen). Utilizando el siguiente protocolo: en un tubo Eppendorf sobre hielo se adicionaron: cantidad variable (500 ng-2 µg) de la solución con ADN; 2 µl de amortiguador (10X); 20 µl de agua desionizada c.b.p.; 0.3 µl de enzima 10U. La mezcla de reacción se colocó a 37°C, por un tiempo mínimo de 2 h. La reacción se detuvo inactivando la enzima al colocarla a 95°C por 5 min o por adición de mezcla de carga del gel.

Por otra parte el ADN, se amplificó con un par de oligonucleótidos (para una región de cloroplasto intergénica) probados en encinos: *trnD-trnT* (5'- ACC AAT TGA ACT ACA ATC CC- 3', 5'- CTA CCA CTG AGT TAA AAG GG- 3') de la siguiente manera: se transfirió una cantidad de ADN genómico (200 ng), se agregó (1.5 mM) MgCl₂, seguido del amortiguador el cual estabilizó la reacción, posteriormente se adicionaron los dNTPs (0.2 mM), se adicionaron los oligonucleótidos (10 pmol) y por último se agregó 1U de la enzima *Taq* ADN polimerasa (Invitrogen), la reacción se realizó en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems), bajo las siguientes condiciones: 5 min a 95°C seguido de 30 ciclos por las siguientes etapas: 1 min 94°C, 30 s 50°C, 1 min 72°C y 7 min 72°C.

La integridad del ADN digerido y amplificado fue analizada por electroforesis en un gel de agarosa al 1% en el amortiguador de corrida TAE 1X (Tris acetato 40 mM, EDTA 2mM pH 8.3), 1 µl de ADN se mezcló con 1µl de amortiguador de carga (65% p/v sacarosa, 10 mM Tris HCl pH7.5, 10 mM EDTA, 0.3% p/v de azul de bromofenol), se usó un marcador molecular 1 kb plus (Gibco, BRL). El gel se corrió durante 20 min a 100 V,

una vez terminada la corrida, el gel se tiñó durante 15 min. con una solución de 0.5 µl/ml de bromuro de etidio en agua.

Finalmente se observó en un transiluminador de luz ultravioleta para visualizar las bandas de ADN y captar la imagen, con el sistema de fotodocumentación Eagle Eye II (Stratagene).

V.8 Montaje y análisis de AFLPs en *Quercus*

La técnica AFLP, constó de tres etapas principales: 1) El ADN genómico es cortado con dos endonucleasas de restricción (*EcoRI* y *MseI*) (Invitrogen) y ligado a adaptadores específicos (reacción restricción-ligación), 2) amplificación de los fragmentos cortados mediante PCR (preamplificación) y 3) análisis de los fragmentos amplificados en el secuenciador por medio de fluorescencia (Vos *et al.*, 1995).

El montaje se llevo a cabo usando el kit de la compañía Applied Biosystems AFLP 2005, partiendo del protocolo propuesto por la compañía posteriormente se estandarizó el sistema, para el estudio de las especies de *Quercus*. Este montaje se realizó inicialmente con tres especies (1 individuo de c/u): *Quercus laurina*, *Q. ocoteifolia* (serie *Lanceolatae*) y *Q. candicans* (especie lejana).

V.8.1 Extracción y digestión del ADN

Con el método de Lefort y Douglas (1999) modificado para las especies de este estudio, se obtuvo ADN de buena calidad y con suficiente concentración. La cuantificación promedio del ADN total osciló entre 1000-5000 ng/µl (1-5 µg/ µl), el cual fue suficiente para el análisis molecular con la técnica de AFLP.

V.8.2 Alineación de los pares de adaptadores

Para la alineación los pares de adaptadores *MseI* y *EcoRI*, los tubos se calentaron en baño maría a 95°C por 5 minutos, enseguida se dejaron enfriar a temperatura ambiente por alrededor de 10 minutos, finalmente se centrifugaron a 4000 rpm por 10 segundos.

V.8.3 Reacción ligación-restricción y dilución

En un tubo de 1.5 ml se pusieron los siguientes reactivos: 1 µl de amortiguador de ADN ligasa, 1 µl de NaCl 0.5M, 0.5 µl 1 mg/mL de albúmina sérica bovina (BSA diluida a 10 mg/ml si es necesario), 1µl de adaptador *MseI*, 1µl de adaptador *EcoRI* adaptador, 0.2 µl *EcoRI* (Invitrogen), 0.2 µl *MseI* (Invitrogen), 0.5 µl de amortiguador para *MseI*, 4 µl agua dde, 0.1 µl ligasa del bacteriófago T4 10X que incluye ATP (Invitrogen) y 0.5 µg de ADN genómico. La mezcla, se invirtió durante 10 segundos, se incubó a 37°C por 2 horas. Enseguida se agregaron 189 µl de buffer TE 0.1 y se mezcló por inversión para llevar la reacción a 200 µl. Finalmente la mezcla se almaceno a 2-6°C.

V.8.4 Amplificación preselectiva

Después del producto de la reacción restricción-ligación, se combinó la siguiente mezcla de PCR en un tubo de 0.2 ml: 4 µl de la reacción de ligación-restricción diluida, 1 µl de pares de oligonucleótidos preselectivos AFLP y 15 µl de la solución Core mix (amortiguador, dNTPs, MgCl₂, H₂O, BSA, *Taq* polimerasa) se colocaron las muestras en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems), con los siguientes parámetros:

Hold	Ciclo			Hold	Hold
72°C	94°C	56°C	72°C	60°C	4°C
2 min.	20 s.	30 s.	2 min.	30 min.	siempre

Para verificar el éxito de la amplificación, 10 µl del producto de la reacción se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% en buffer TBE 1X a 4V/cm durante 3-4 horas, el gel se tiñó con bromuro de etidio y se observó un barrido en el gel en un transluminador (Figura 6).

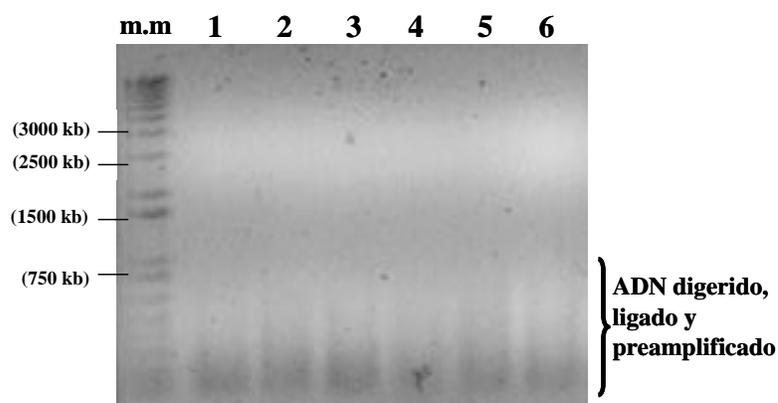


Figura 6. Amplificación preselectiva de reacciones de AFLP. Carril 1) marcador de tamaño molecular 1kb plus, carriles 1, 2, 3, 4, 5, 6) Producto de preamplificación de AFLP en un rango de ~ 100-1500pb.

Posteriormente se agregó 190 µl de TE_{10/1} buffer a los 10 µl de producto de preamplificación, se mezcló lentamente en una centrífuga durante 10 segundos.

Finalmente la mezcla se almacenó a 2-6°C. Hasta la utilización en la amplificación selectiva (Caicedo *et al.*, 1999; Simpson *et al.*, 1999; Vos *et al.*, 1995).

V.8.5 Amplificación selectiva

Se combinó en un tubo de PCR: 3 µl del producto diluido de la reacción de preamplificación, 1 µl MseI (oligo- Cxx) a 5 µM, 1 µl EcoRI [Dye-oligo- Axx] a 1 µM, 15 µl AFLP Core Mix. Se corrió la reacción de PCR en un termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, USA) con los siguientes parámetros.

Hold				No. de ciclos
94°C 2min.	94°C 20 seg	66°C 30 seg	72°C 2min	1
-	94°C 20 seg	65°C 30 seg	72°C 2min	1
-	94°C 20 seg	64°C 30 seg	72°C 2min	1
-	94°C 20 seg	63°C 30 seg	72°C 2min	1
-	94°C 20 seg	62°C 30 seg	72°C 2min	1
-	94°C 20 seg	61°C 30 seg	72°C 2min	1
-	94°C 20 seg	60°C 30 seg	72°C 2min	1
-	94°C 20 seg	59°C 30 seg	72°C 2min	1
-	94°C 20 seg	58°C 30 seg	72°C 2min	1
-	94°C 20 seg	57°C 30 seg	72°C 2min	1
-	94°C 20 seg	56°C 30 seg	72°C 2min	20
60°C 30 min	-	-	-	1
4°C siempre	-	-	-	1

V.8.6 Preparación del amortiguador de carga y electroforésis en secuenciador

Los productos de las reacciones se separaron mediante electroforésis capilar en un secuenciador de cuatro capilares ABI3100, combinando: 4 µl (se modificó), del producto de amplificación selectiva 0.5 µl del marcador de tamaño molecular GenScan-500 ROX

(tamaño Standard) y 15 µl (se modificó) de formamida desionizada, se desnaturalizaron durante 15 min (se modificó) a 95°C y se pasaron directamente a hielo, para su posterior lectura.

El tiempo de corrida por reacción fue alrededor de 30 min. Finalmente, se obtuvieron los electroferogramas y se analizaron las bandas con el software GeneMapper versión 4.0 AFLP (Applied Biosystems) (figura 7).

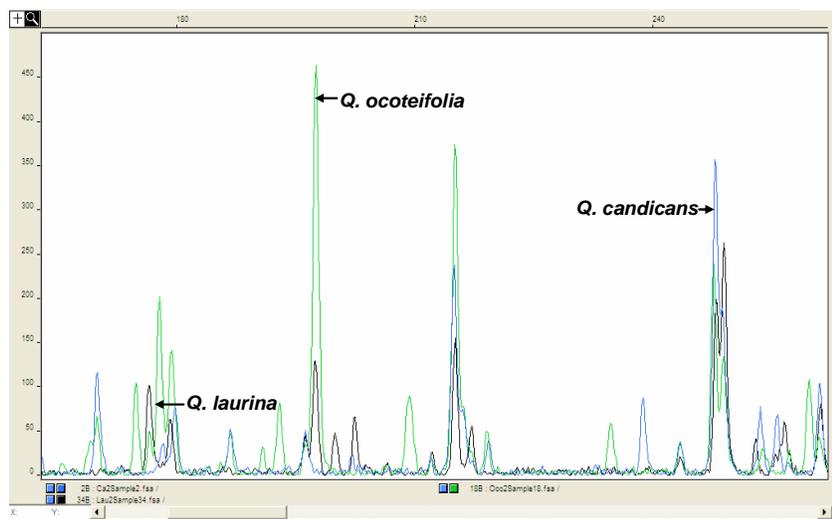


Figura 7. Electroferograma de tres especies, oligonucleótido CAC/AAG, *Q. laurina*, *Q. ocoteifolia* y *Q. candicans*, analizadas con el software GeneMapper versión 4.0 AFLP.

V.9 Elección de oligonucleótidos para la amplificación selectiva

Para la amplificación selectiva, se probaron 23 pares de oligonucleótidos, con el fin de hacer una selección detallada de los pares de oligonucleótidos que se usarían en el análisis, de forma tal que se pudiera abarcar el mayor número de combinaciones posibles, para que en la evaluación final se escogieran tres (Tabla 5).

MseI

	CAA	CAC	CAG	CAT	CTA	CTC	CTG	CTT
AAC	*			*				*
AAG		★		★	*		★	
ACA	*		*			*		*
ACC				*	*			
ACG				*	*			
ACT			*	*		*		
AGC		*					*	
AGG	*			*				*

EcoRI

Tabla 5. Selección de las 23 combinaciones de oligonucleótidos para el análisis AFLP. Los cuadros con asteriscos indican la secuencia de las combinaciones usadas, los cuadros con estrellas (CAC/AAG, CAT/AAG, CTG/AAG) son los 3 pares de oligonucleótidos usados para el análisis.

Finalmente de las 23 combinaciones de oligonucleótidos evaluados en este estudio, se seleccionaron las combinaciones CAC/AAG-**JOE** (173 bandas), CTG/AAG-**JOE** (185 bandas), CAT/AAG-**JOE** (243 bandas), dicha selección se realizó con base en el número de bandas polimórficas producidas con un total de 601.

VII. ANÁLISIS DE DATOS

VII.1 Análisis filogenéticos

A partir de la lectura de los electroferogramas obtenidos con los tres pares de oligonucleótidos seleccionados, se interpretaron las bandas y con el software GeneMapper versión 4.0 AFLP (Applied Biosystems) se construyeron tres matrices con los valores de presencia/ausencia de caracteres (1,0); posteriormente se obtuvo una matriz general, que sirvió de base para realizar los siguientes análisis.

Un primer análisis de reconstrucción filogenética se llevó a cabo usando máxima-parsimonia con el programa WINCLADA (Nixon, 1999a) en su versión beta (no definitiva) que permite hacer las matrices y editar los árboles, compatible con NONA que es el que procesa a través de un modelo de parsimonia (Goloboff, 1997). La búsqueda del árbol más parsimonioso se realizó a través de la opción ‘exhaustiva’ de una estrategia de búsqueda avanzada denominada ‘Ratchet’ (Nixon, 1999b) (permite saltar islas); y la optimización de caracteres mediante los procedimientos FAST (= ACCTRAN), SLOW (= DELTRAN) y UNAMBIGUOUS. Para la construcción de los árboles se siguió el criterio de “grupos externos” (outgroup), usando como tales tres especies de encinos blancos y una especie fuera del género *Quercus* (*F. mexicana*, este taxón fue el que se trató como raíz).

Para la matriz los caracteres fueron analizados como no aditivos (parsimonia de Fitch) además de asumirlos como no ordenados (“unordered”), con 2 estados posibles (0 y 1), y excluyendo aquellos caracteres filogenéticamente no-informativos.

Se obtuvieron los árboles de consenso más parsimoniosos, así como las longitudes del árbol para cada análisis, éstas reflejan el número de pasos requeridos para su construcción, y corresponde al número de cambios de estado de longitud 1 que se producen, siendo la primera medida básica que permite comprobar la idoneidad de un árbol.

Enseguida se generaron varios índices para evaluar la homoplasia presente en los árboles: el Índice de Consistencia (IC), que estima la cantidad de sinapomorfías y por tanto, el grado de homoplasia; cuando el valor del IC es 1 no hay homoplasia y la robustez del árbol descende a medida que lo hace el IC. También se estimó el Índice de Retención (IR), el cual reduce el sesgo debido a la autopomorfía, éste es alto cuando los cambios ocurren predominantemente en los nodos internos y bajo cuando los cambios están concentrados en ramas terminales (Morrone, 2000).

Para probar el soporte de las ramas de los árboles se usó una prueba de Bootstrap (Felsenstein, 1985) y otra de Jackknife (Lanyon, 1985; Siddall, 1995). En el Bootstrap, un juego de caracteres son muestreados aleatoriamente reemplazándolos del juego original; este juego aleatorio, que tiene el mismo número de caracteres que el juego original, es usado para construir el nuevo árbol. La topología de este árbol puede o no ser igual que al árbol inferido anteriormente. En el Jackknife, semejante al Bootstrap, consiste en eliminar al azar caracteres o taxones pero sin reponerlos. A partir de esta prueba, Siddall (1995) desarrolló un índice de monofilia que permite determinar que tan estables son los clados presentes en los cladogramas más parsimoniosos. Los dos procesos se repitieron 1000 veces. Al finalizar los cálculos los valores de porcentaje obtenidos de las pruebas Bootstrap y Jackknife fueron puestos en las ramas del consenso de mayoría que presenta valores robustos de sustento, es decir superiores al 50% aparecieron sobre las ramas del árbol y aquellas ramas soportadas por valores de Bootstrap/Jackknife inferiores al 50% se colapsaron.

VII.2 Análisis fenéticos

La matriz general de similitud entre todos los caracteres para los datos de las tres combinaciones de oligonucleótidos (que se empleo en los análisis de UPGMA y ACP), se estimó calculando el coeficiente de similitud de Nei-Li (1979) también conocido como similitud de DICE, cuya fórmula es:

$$S_{ij} = 2a / (2a + b + c)$$

Donde:

S_{ij} = similitud entre el individuo i y j

a= Número de bandas compartidas por los individuos i y j

b= Número de bandas presentes en i pero ausente en j

c= Número de bandas presentes en j pero ausente en i

Esta matriz se construyó a través del programa PAUP 4.0 (Swofford, 2002).

Un primer criterio de agrupamiento basado en la matriz de similitud, se realizó a través del programa NTSYS-pc (Rohlf, 1998) subprograma SAHN para construir dendogramas usando el método UPGMA. Las siglas de UPGMA significan método para agrupar pares de grupos mediante una media aritmética (sin peso). Es un método usado para la construcción de árboles de distancias con base en agrupaciones de pares de unidades taxonómicas operativas (OTUs por sus siglas en inglés) sin peso en función del promedio de sus distancias (Hedrick, 2000).

UPGMA emplea un algoritmo de acercamiento secuencial en el cual las relaciones topológicas locales son identificadas en orden de similitud.

Un segundo criterio de análisis de distancias fue realizado a través de Neighbor Joining (Saitou y Nei, 1987) (“vecino más próximo”); nuevamente se realizó a través del programa NTSYS-pc (Rohlf, 1998), la matriz de similitud se construyó a partir del programa GenAlEx versión 6 (Peakall y Smouse, 2006). El método se propone para reconstruir árboles filogenéticos de datos evolutivos por distancia. El principio de este método es encontrar pares de unidades taxonómicas operacionales [OTUs (= vecinos)] que reducen al mínimo la longitud total de la rama en cada etapa de agrupamiento de OTUs comenzando con un árbol en forma de estrella. Las longitudes de la rama así como la topología de un árbol parsimonioso pueden ser obtenidas rápidamente usando este método.

El método Neighbor Joining así como el método de Sattath y de Tversky (1977) demuestran ser en general mejores que otros métodos (e.g. método de Farris) para este tipo de análisis.

Un último criterio fue realizado a través de análisis de coordenadas principales (ACP). Es una técnica multivariada que permite encontrar y visualizar los patrones dentro de una matriz de datos multivariados.

El análisis se realizó a través del programa GenAlEx versión 6 (Peakall y Smouse, 2006), el cual grafica la relación entre los elementos de la matriz de distancia basados en sus primeras dos coordenadas principales, no obstante las opciones están disponibles para graficar otras combinaciones de coordenadas.

El análisis de coordenadas principales (ACP) es un procedimiento desarrollado por Gower *et al.* (1966) con la finalidad de obtener una serie de coordenadas para un conjunto de observaciones de tipo cualitativo. Como señala Everit (1978) si se utiliza para variables cuantitativas, el método es análogo al análisis multivariado de Componentes Principales.

ACP pretende representar distancias en una dimensión reducida y su criterio básico es el de maximizar la suma de cuadrados de las distancias (autovalores).

La solución propuesta por Gower (1966) para la obtención de las coordenadas principales es prácticamente idéntica al denominado “escalamiento multidimensional clásico” propuesto por Torgerson (1952, 1958), hasta el punto de que, en reconocimiento a la aportación independiente de ambos autores, a esta técnica se le conoce también como escalamiento de Torgerson y Gower (de Meulman, 1986).

VIII. RESULTADOS

VIII.1 Topología general del análisis cladístico

Se elaboró una matriz de 78 terminales (26 especies, tres individuos por cada una) por 601 caracteres. El análisis permitió obtener cuatro árboles más parsimoniosos con un índice muy bajo de consistencia (IC) de 14 que refleja una alta cantidad de homoplasia pues está lejano a 1 (libre de homoplasia), un índice de retención (IR) de 58 que muestra una cantidad mediana de homoplasia y una longitud total del árbol de 3997 que demuestra el número de pasos (cambios) para llegar al árbol óptimo.

La Figura 8 muestra uno de estos árboles, en él se aprecian cuatro clados principales. De manera independiente se efectuó el sustento de ramas Bootstrap/Jackknife, los valores en porcentaje para cada rama están representados en el consenso de mayoría.

En el primer clado A se observa en la parte basal, 12 terminales (cuatro especies/ tres individuos) donde se puede observar la monofilia de *F. mexicana* (perteneciente a la familia Fagaceae) con respecto a los encinos blancos *Q. laeta*, *Q. magnoliifolia* y *Q. rugosa* que a su vez cada especie se anida en grupos distintos. Estas 12 terminales se incluyeron como grupo externo y cuenta con un valor de sustento de ramas (Bootstrap y Jackknife) de 100/100.

El segundo clado B el porcentaje de sustento de ramas fue menor del 50% debido a los pocos caracteres informativos que sustentan toda la topología; muestra un primer subclado, formado por *Q. candicans* y *Q. crassifolia*, éstas ubicadas como especies externas lejanas a la serie *Lanceolatae* sustentadas en valores de confiabilidad de ramas de 51/53 y consideradas en el estudio morfológico bajo el criterio de grupo externo (Figura 9). Un segundo subclado lo conforman en una rama independiente *Q. mexicana*, y otra en la que se observa la parafilia en las especies *Q. acherdophylla*, *Q. crispipilis*, especies ubicadas en

series diferentes (debido posiblemente a procesos de hibridación, reticulación, flujo génico entre otros) y *Q. gentryi* (dos individuos de tres) especie sin serie, todas ellas consideradas especies externas lejanas. Estas cuatro especies coinciden parcialmente con la topología morfológica propuesta por Valencia (2005) donde se ubican agrupadas en un solo clado; en la rama terminal se anida un grupo monofilético sustentado con un valor de confiabilidad de 96/98, conformado por dos especies, *Q. depressa* considerada especie relacionada directamente con la serie *Lanceolatae* y única integrante actual de la serie *Depressae* y *Q. laurina*, especie perteneciente a la serie *Lanceolatae*. Las especies agrupadas en el clado B coincide en su topología con la filogenia morfológica propuesta por Valencia (2005) con excepción de *Q. sp2* (una especie considerada distinta a *Q. laurina* y *Q. depressa* aunque presenta morfología similar), que se agrupa en el clado D.

El clado C también se colapsó y no mostró valores mayores del 50% para sustentar la rama, de éste se derivaron dos subclados: el primer subclado, sustentado con un valor de confiabilidad de ramas de 93/94, en donde se ubica en una rama independiente la especie *Q. saltillensis*, la cual pertenece a una serie diferente y se considera como especie externa lejana en el estudio morfológico.

En un segundo subclado se encuentran agrupadas las especies *Q. viminea*, perteneciente a la serie monotípica *Vimineae* y *Q. elliptica*; estas dos terminales consideradas como especies lejanas externas, con un valor de confiabilidad de ramas de 90/91, a partir de este grupo se derivan una parafilia de las especies *Q. aristata*, *Q. sapotiifolia* (especies pertenecientes a la serie *Aristatae*, propuesta por Muller (1942) en un trabajo posterior al de Trelease (1924), *Q. eduardii* y un individuo de *Q. gentryi* ubicadas en series distintas y consideradas como grupos externos lejanos con un valor de confiabilidad de ramas de 54/53.

El clado D, colapsado en su rama principal, presenta dos subclados; el primero representado por la especie *Q. nixoniana*, la cual no está asignada a ninguna serie, con un valor de sustento de ramas de 83/90; el subclado sostiene también a un grupo monofilético formado por *Q. ocoteifolia* y *Q. acatenangensis*, siendo consideradas estas dos identidades por Valencia (2005) como una sola especie (*Q. ocoteifolia* Liebm) además de pertenecer a la serie *Lanceolatae* y ser congruente con la topología morfológica.

Un segundo subclado está formado por una rama independiente donde se ubica *Q. crispifolia*, perteneciente a una serie cercana a la serie *Lanceolatae*, con un valor de confiabilidad de ramas de 100/100, y un grupo con un valor de sustento de ramas de 98/98, conformado por *Q. acutifolia* perteneciente a la serie *Acutifoliae* y *Q. sp2* que en la topología morfológica la ubican como especie cercana a *Q. laurina*, pero que en esta filogenia se ubica como especie separada y la relaciona más cercanamente con *Q. affinis* perteneciente también a la serie *Lanceolatae*, además de presentarse en una de las ramas terminales de este subclado conformando un grupo monofilético con *Q. rubramenta* ubicada en la serie *Benthamiae* con un valor de sustento de ramas de 74/73.

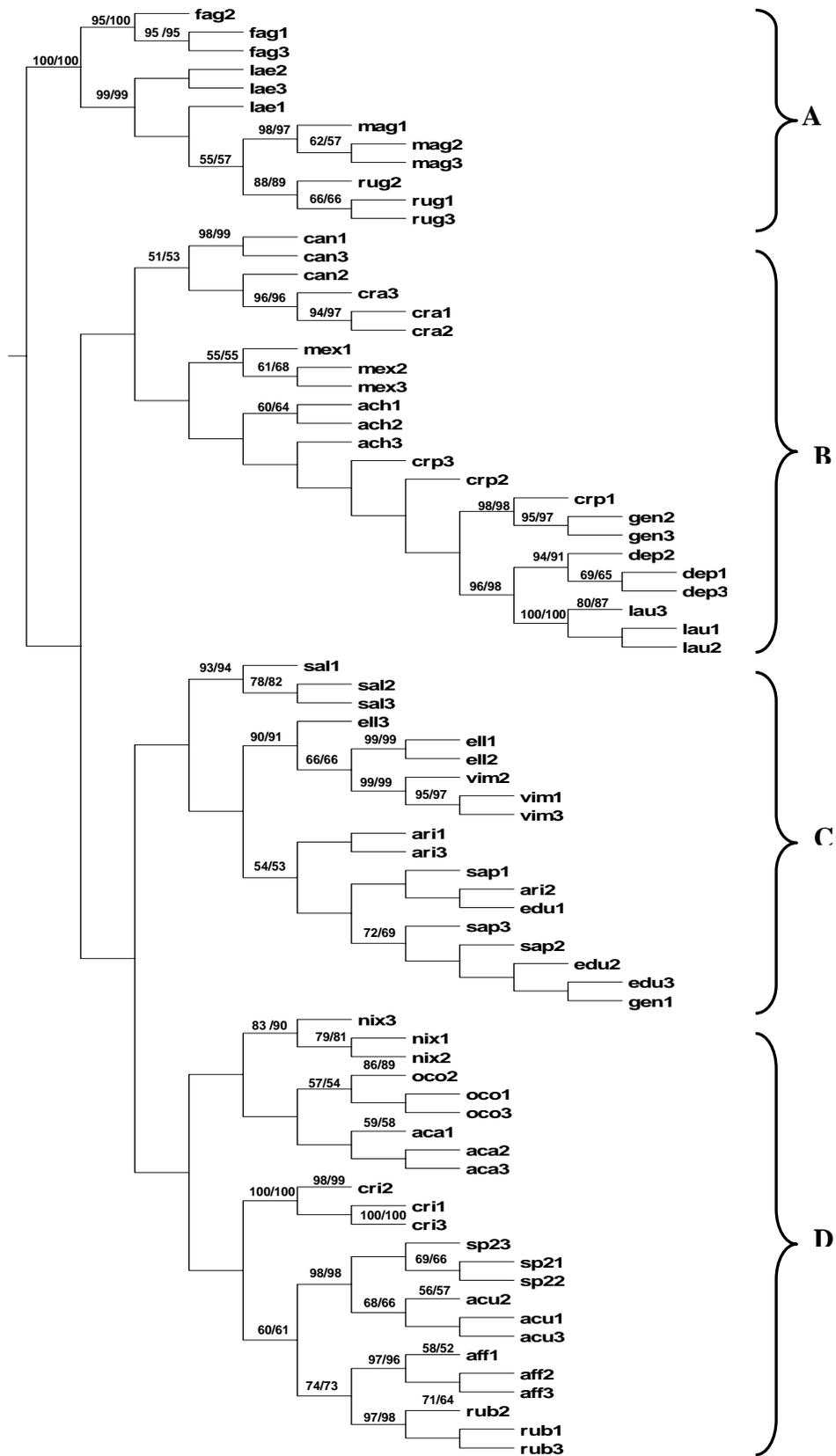


Figura 8. Árbol de consenso de 4 árboles más parsimoniosos de longitud 3997, IC 14 e IR 58. Los números asignados muestran los porcentajes de Bootstrap/Jackknife de cada uno de los clados.

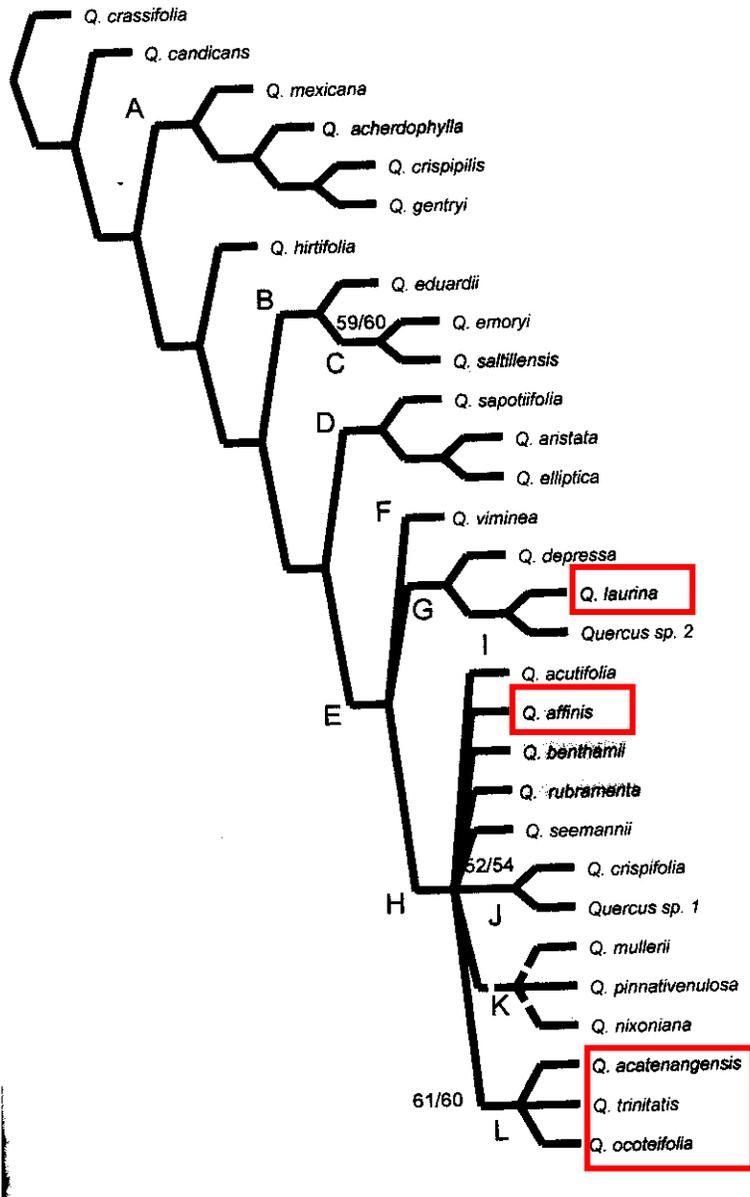


Figura 9. Árbol de consenso más parsimonioso del análisis filogenético de la serie *Lanceolatae* del género *Quercus* basado en caracteres morfológicos, propuesto por Valencia (2005).

VIII.2 Fenéticos

VIII.2.1 *Análisis de agrupamiento (UPGMA)*

En este análisis cada uno de los 78 taxa empleados fue considerado como un OTU, con la finalidad de observar como se relacionan cada uno de estos individuos, independientemente de pertenecer a una especie distinta.

De acuerdo con la topología y el desarrollo del dendrograma (Figura 10), se consideró que el agrupamiento obtenido con el coeficiente de Nei y Li con el método UPGMA, brinda la información más adecuada sobre las principales asociaciones entre las especies de estudio, como se puede apreciar en el dendrograma a un nivel de disimilitud del 63% ,se pueden distinguir tres grupos principales y uniéndose al tercero tres subgrupos, lo que permite corroborar la coincidencia con la topología filogenética agrupando con relación a su polimorfismo genético.

Los resultados obtenidos en el dendrograma, realizado por medio del análisis UPGMA, indican que la topología del árbol obtenida no varió totalmente con respecto a la mostrada con el análisis filogenético. Los grupos 1 y 2 pertenecen al grupo externo.

El grupo 1 está conformado por *Fagus mexicana* perteneciente a la familia Fagaceae, el cual muestra un nivel de disimilitud de 63% (ó 37% de similitud).

El grupo 2 está formado por los encinos blancos *Q. rugosa*, *Q. laeta* y *Q. magoliifolia*, unido a un 34% de disimilitud (ó 66% de similitud) aproximadamente.

El grupo 3 es el más grande del cual surgen 3 subgrupos (**a**, **b** y de éste último se agrupa **c**) formado por las 22 especies de encinos rojos (66 individuos), unido a un 18% de disimilitud (ó 82% de similitud).

Subgrupo a) incluye 8 especies principalmente (24 individuos); *Q. aristata*, *Q. eduardii*, *Q. sapotiifolia*, *Q. elliptica*, *Q. viminea*, *Q. gentryi*, *Q. depressae* y *Q. laurina*, unido a un 15% de disimilitud (ó 85% de similitud).

Subgrupo b) conformado por 7 especies (21 individuos): *Q. crassifolia*, *Q. candicans*, *Q. mexicana*, *Q. acherdophylla*, *Q. crispipilis*, *Q. saltillensis*, *Q. crispifolia*, unido a un 10% de disimilitud (ó 90% de similitud).

Subgrupo c) incluye las últimas 7 especies (21 individuos): *Q. sp2*, *Q. acutifolia*, *Q. affinis*, *Q. rubramenta*, *Q. nixoniana*, *Q. ocoteifolia* y *Q. acatenangensis*, unido a un 13% de disimilitud (ó 87% de similitud).

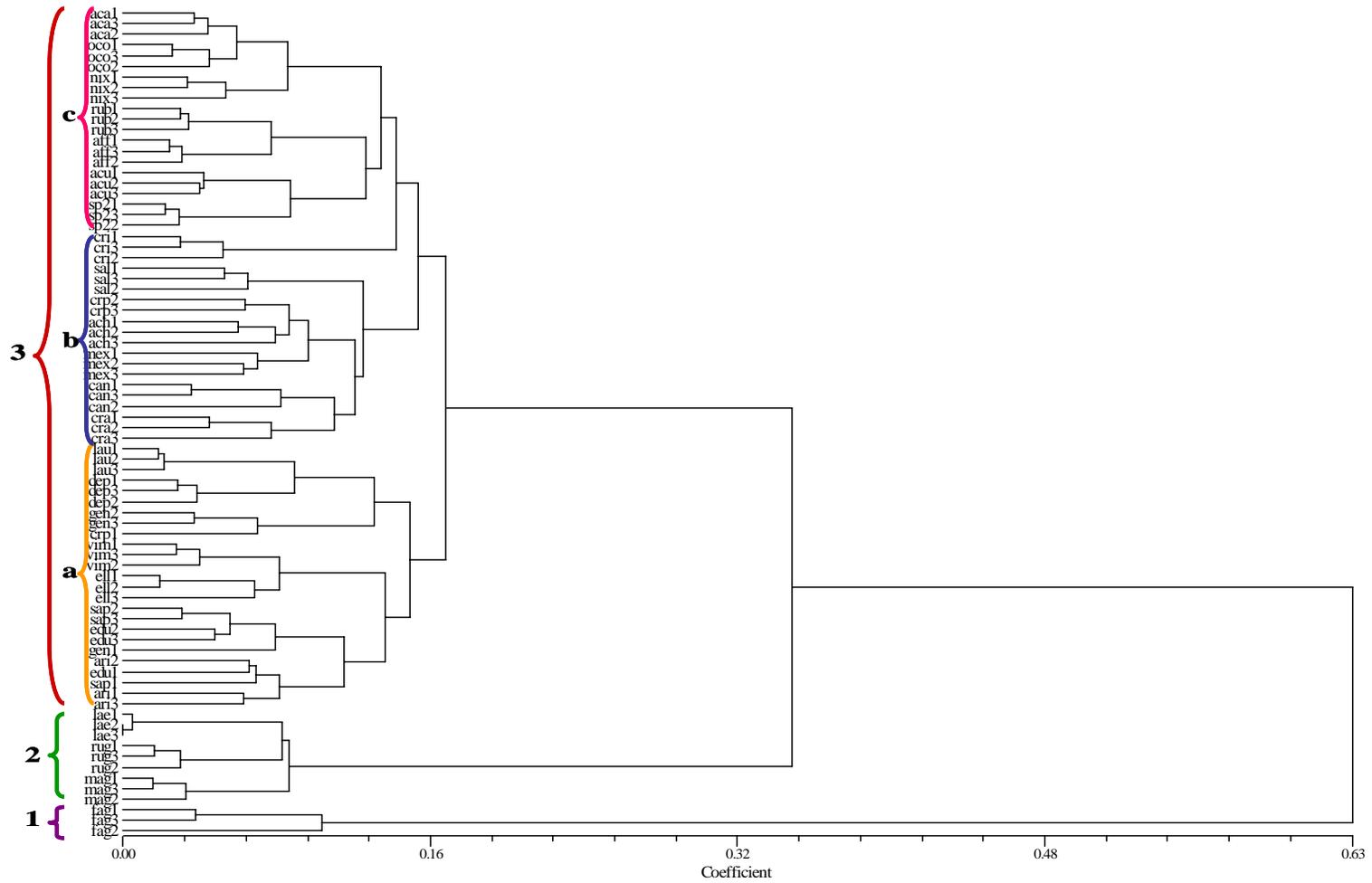


Figura 10. Dendrograma de similitud utilizando el método de UPGMA con los valores de similitud de Nei-Li producto del análisis de los datos de las tres combinaciones usadas en los AFLPs CAC/AAG, CTG/AAG, CAT/AAG, empleando todos los individuos incluidos en este estudio (26 spp/tres individuos)

VIII.2.2 Análisis de Neighbor- Joining (N-J)

En este análisis *F. mexicana*, *Q. rugosa*, *Q. magnoliifolia* y *Q. laeta* fueron las especies utilizadas para enraizar el árbol siguiendo el criterio de “grupo externo” (outgroup) (Figura 11). Es importante, mencionar que el árbol generado a través del análisis del “vecino más cercano” obtenido a partir de la matriz de similitud, revela una estructura muy similar a la obtenida usando el método de unión media aritmética no ponderada UPGMA disponible en el programa NTSYS-pc, diferenciándose solamente por las longitudes de las ramas en la topología del árbol (que representan normalmente el número de cambios que han ocurrido en esa rama).

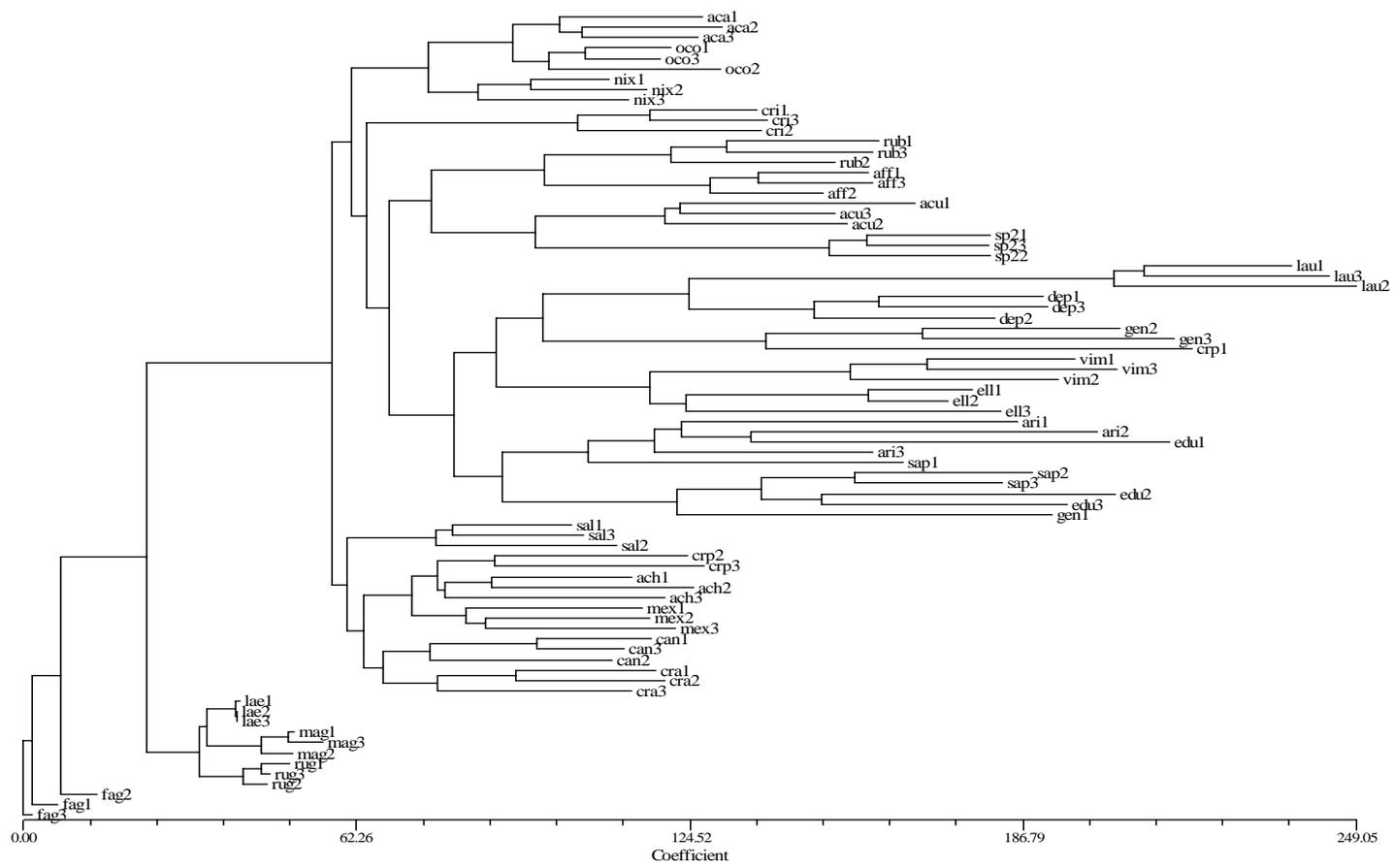


Figura 11. Dendrograma de similitud construido mediante el método de Neighbor Joining con los valores de similitud de Nei-Li disponible en GenAlEx 6.0

VIII.2.3 *Análisis de coordenadas principales (ACP)*

Se realizó un gráfico de dispersión de los 78 individuos, en dos dimensiones (coordenadas), el análisis incluyó al principio al grupo externo (*F. mexicana*, *Q. laeta*, *Q. magnoliifolia* y *Q. rugosa*) pero al final se excluyó por que al graficar no se distinguían las 22 especies de estudio agrupándolas a todas en una misma coordenada.

En el análisis fue posible encontrar un patrón entre las especies (Figura 12), que presenta la máxima dispersión de datos, es decir se grafica el eje de mayor variabilidad de los datos y se construye, pasando una recta de modo tal que se maximice la dispersión de datos en un sentido y se minimice la distancia de todos los puntos (individuos) a ésta.

El gráfico muestra que las unidades (individuos/ especies) forman grupos definidos con algunas excepciones tal es el caso de *Q. crispipilis*, *Q. gentry* y *Q. eduardii*, donde uno de sus individuos no está agrupado, lo cual se puede interpretar que dentro de estas especies, es decir entre sus individuos se presenta un gradiente de diferenciación genética mayor que las demás especies de estudio.

Se puede observar en todo el análisis, diferencias con la topología del árbol filogenético molecular y las topologías de los dendogramas de similitud (UPGMA y Neighbor Joining) con respecto a sus grupos definidos, con excepción de *Q. sp2* que se agrupa cercanamente con *Q. laurina* y *Q. depressa* como se observó en el análisis filogenético con caracteres morfológicos, estas ultimas dos especies incluyendo a *Q. gentryi* en los análisis anteriores se agrupaban con *Q. crassifolia*, *Q. candicans*, *Q. mexicana*, *Q. acherdophylla*, y *Q. crispipilis*, pero en este análisis presentan lejanía entre ellas, además de incluir a *Q. viminea* que también presenta congruencia en la topología morfológica.

Cabe señalar que las cinco especies antes mencionadas omitiendo a *Q. viminea*, presentan un patrón de cercanía mayor que todas las demás especies de estudio, traslapándose algunos individuos, pero aún así se puede observar los grupos bien definidos.

Otras especies tales como *Q. elliptica*, *Q. aristata*, *Q. sapotifolia* y *Q. eduardii*, presentan cercanía entre estas, con excepción de *Q. saltillensis*.

Finalmente, se observa también un patrón de cercanía de las especies *Q. ocoteifolia*, *Q. acatenangensis* (consideradas como una sola especie), *Q. nixoniana*, *Q. crispifolia*, *Q. acutifolia*, *Q. affinis* y *Q. rubramenta*.

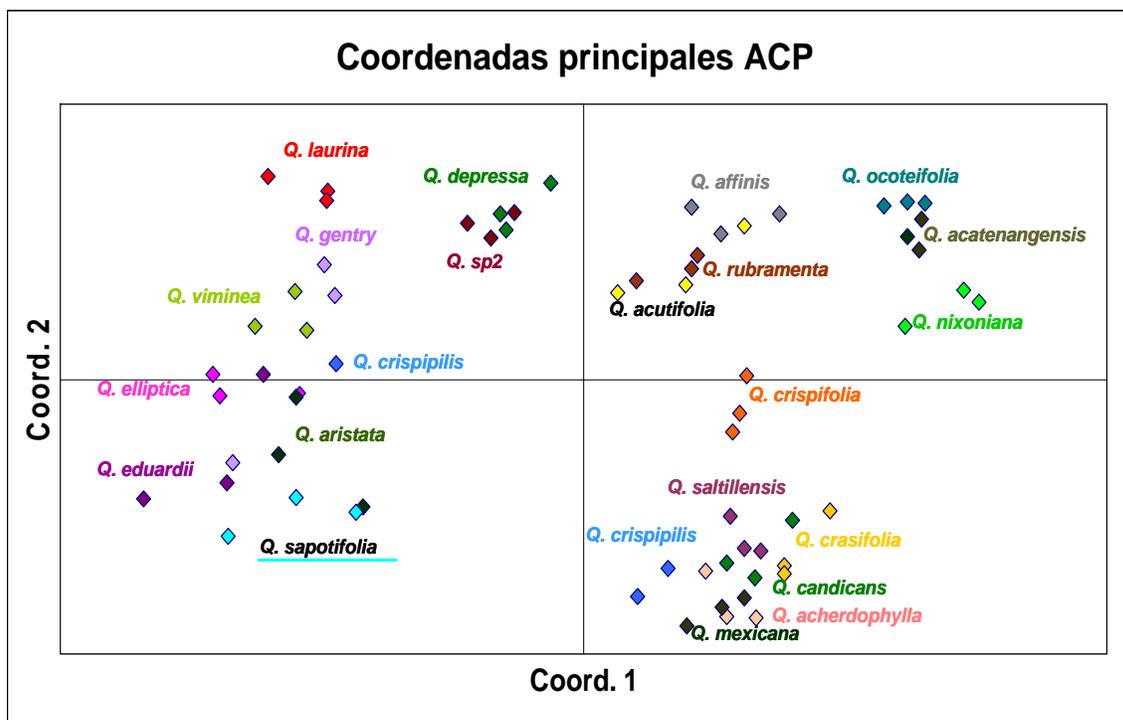


Figura 12. Gráfico de análisis de coordenadas principales de las 22 especies (66 individuos) de estudio sin grupo externo.

IX. DISCUSIÓN

Actualmente hay controversia respecto a la clasificación del género *Quercus*, a pesar de que el reconocimiento de los dos subgéneros *Cyclobalanopsis* y *Quercus*, y a secciones *Lobatae*, *Protobalanus*, *Quercus* y *Cerris* han sido totalmente aceptados. Sin embargo, hay dudas sobre la agrupación de especies del mismo género denominadas series; existen diferentes propuestas con respecto a éstas, tal es el caso de la clasificación hecha por Trelease (1924) (tomada en este estudio como referencia), en la cual parece que las series son artificiales e inexactas. Aun siendo una obra muy valiosa, necesita una revisión detallada para decidir sobre la validez, la aceptación o la sinonimia de muchos de los nombres de sus especies y así corregir errores que pueden verse reflejados en la historia del grupo y en las relaciones entre especies, obtenidas tanto morfológica como molecularmente (Valencia, 2004).

Durante mucho tiempo ha sido claro que en el género *Quercus* existen mucho mayores dificultades para delimitar a las especies utilizando como criterio el aislamiento reproductivo o genético que en la mayoría de las plantas y animales (Burger, 1975; Van Valen, 1976).

Además de ser un género de taxonomía complicada, muchas de sus especies son poco conocidas (Zavala, 1990), y los problemas taxonómicos de las series son causados por la gran variación morfológica que éstas tienen (Valencia, 2005), (lo cual podría indicar plasticidad fenotípica, hibridación e introgresión interespecífica). Como resultado, existe una variabilidad tan grande que se han descrito muchas más especies de las que realmente existen; hay demasiados nombres de especies de encinos, particularmente para las mexicanas. Muchos nombres han aumentado la lista de sinonimias y otros permanecen en

duda y deben ser evaluados para incorporarlos a la relación de especies aceptadas en la literatura taxonómica del género (Muller y McVaugh, 1972).

En México, existen pocos trabajos modernos en el género *Quercus* a nivel de subgénero y de sección realizados por Nixon (1993a) y Manos *et al.* (1999) y otros estudios basados en complejos y delimitación de grupos de especies (series), como Nixon y Muller (1992) (*Glaucoidea*), Valencia (1994) (*Lanceolatae*), Spellenberg y Bacon (1996) (*Racemiflorae*) y Romero *et al.* (2000) (*Q.acutifolia-Q.conspersa*), González *et al.* (2004) (complejo *Q. affinis -Q. laurina* de la serie *Lanceolatae*), Tovar-Sánchez *et al.* (2004) (*Q. crassifolia* y *Q. crassipes*) en México.

Son aún más escasos los estudios a nivel de relaciones filogenéticas entre especies del género *Quercus*, tal es el caso de Valencia (2005), donde tratar de establecer las relaciones filogenéticas de la serie *Lanceolatae*, tomando en cuenta 42 caracteres morfológicos (34 de estructuras vegetativas y ocho del fruto) y el trabajo de Dodd *et al.* (2003) quienes estudiaron las relaciones genéticas y diversidad entre cuatro especies de encinos rojos de California y la estructura genética de sus poblaciones con AFLPs. A pesar de que hay pocos estudios comparativos para inferir filogenias entre datos morfológicos y moleculares, los existentes han demostrado que la divergencia morfológica y la molecular son muy independientes. Hillis (1994) concluye que la combinación de datos moleculares con los morfológicos maximizará, tanto la utilización como el contenido de la información. En este estudio se usó el marcador molecular AFLPs (Vos *et al.*, 1995) que ha demostrado su eficiencia para la caracterización de germoplasma, caracterización de poblaciones genéticas, mapeo de diferentes especies de interés económico y estudios filogenéticos en diferentes organismos incluyendo plantas, bacterias y hongos (Lin y Kuo, 1996; Majer *et al.*, 1996; Becker *et al.*, 1995).

Como se observó en el análisis de AFLPs, la existencia de variación en los patrones de bandas resultantes en los electroferogramas con las diferentes combinaciones usadas en el presente estudio, permitieron seleccionar tres combinaciones de oligonucleótidos para la evaluación final CAC/AAG, CTG/AAG, CAT/AAG, mismas que permitieron la obtención de 601 caracteres, siendo un número adecuado de bandas legibles así como una buena proporción de bandas polimórficas para su análisis. El patrón de bandas que se observó en los individuos de las especies estudiadas, fue leído desde los 50, hasta los 525 pares de bases en las tres combinaciones de oligonucleótidos usados. Los ensayos preliminares mostraron que la técnica de los AFLPs detecta loci altamente polimórficos y reproducibles debido al uso de oligonucleótidos iniciadores largos permitiendo así las condiciones para el uso de amplificaciones astringentes (Simpson, 1997a) confiriendo un alto grado de confiabilidad. En este estudio se propone que aumentando el número de combinaciones de oligonucleótidos selectivos a partir de tres, los valores de polimorfismos aumentarían de un 75% hasta un 90%, los árboles de consenso que se obtuvieron sugieren que las combinaciones adicionales de los oligonucleótidos selectivos podría mejorar la resolución.

Para hacer la filogenia más completa y siguiendo la congruencia de carácter o evidencia total (Jones *et al.*, 1993) que indica que al tener varias matrices de datos independientes, lo mejor es juntarlas en una sola matriz para obtener un cladograma de éstas, los datos de los tres oligonucleótidos, se unieron en una sola matriz para obtener una filogenia más resuelta que las obtenidas con cada conjunto de caracteres por separado y la obtenida usando la congruencia taxonómica, obteniendo una matriz con un total de 601 caracteres. Un problema que surgió al estudiar de cerca las especies relacionadas (en éste caso de una misma serie) fue la existencia de polimorfismos compartidos pues si las especies son representadas por un individuo solamente, tales polimorfismos compartidos

podrían ser omitidos. Por lo tanto, se utilizó tres individuos de cada especie para explicar polimorfismos compartidos (Bensch *et al.*, 2005). Cabía la posibilidad de que aún incluyendo 3 individuos por cada especie, se pudiera encontrar que la mayoría de estos no se agruparan en un mismo clado tal era el caso del trabajo de Knijff *et al.* (2001) en el cual su agrupamiento no fue claro, además de presentar un porcentaje de variación bajo (23%), esto debido a las diferencias entre las especies, sugiriendo usar otros marcadores de mejor alcance (Campbell *et al.*, 2003), que pudieran proporcionar una resolución mejor. Para analizar la matriz de datos, se llevaron a cabo los análisis filogenéticos y fenéticos, con el fin de tener una congruencia taxonómica, es decir, que haya un consenso entre los diferentes análisis apoyados por los diferentes conjuntos de datos. Las asociaciones de marcadores moleculares por medio de los análisis filogenéticos y fenéticos, se consideran muy útiles ya que incluyen un gran número de caracteres además de ser una clasificación jerárquica que puede ser usada para decidir las relaciones filogenéticas entre especies y los niveles umbrales de similitud entre especies (Singh, 1999). Asimismo, indican la formación de clados (grupos) un poco distintas a las consideradas a partir del planteamiento clásico basado en análisis morfológico (Trelease, 1924).

Con respecto a la topología filogenética, los niveles de confianza del Bootstrap y Jackknife (1000 replicas) excluyendo las ramas principales que se colapsaron (excepto la del grupo externo), variaron con porcentajes de 50 al 100%, los valores menores implican ramas débiles y colapsadas. En contraste valores altos por arriba del 80, hasta el 100% (tal es el caso de los grupos monofiléticos: *Q. depressa* y *Q. laurina* y *Q. sp2* y *Q. acutifolia*) representan mayor afinidad entre especies, con la seguridad de que dicho clado realmente existe en el verdadero árbol filogenético. Sin embargo, en ninguno de estos casos afecto la formación de los principales clados. Comparando estos resultados con la filogenia

morfológica, sus niveles de confianza de ramas fueron bajos y solo estuvieron presentes en 3 nodos C, J y L (59/60, 52/54 y 61/60 respectivamente). Con base en los mayores valores de confianza de unión en la topología de las especies (análisis filogenéticos) y el alto nivel de similitud (análisis fenéticos), se podría considerar el hecho de que existen variaciones morfológicas entre estos taxa, con pocas diferencias significativas a nivel de genoma.

De esta manera se considera que sí existe variación entre las especies del género *Quercus* (incluso entre los individuos de una misma especie) a partir de marcadores tipo AFLP y caracteres morfológicos; ubicando a las tres especies de la serie *Lanceolatae*, como un grupo parafilético, permitiendo considerar el hecho de que es necesario un arreglo sistemático a nivel series de la sección *Lobatae*, en virtud de que la clasificación de Trelease (1924) basada en características morfológicas y anatómicas externas.

Los resultados obtenidos a partir de marcadores moleculares tipo AFLP, indican que el árbol filogenético, los dendrogramas y el análisis de agrupamiento, mostraron algunos grupos definidos, que coinciden parcialmente con la topología morfológica pero que presentan una diferencia con el diseño de las series de la sección *Lobatae* a partir de la clasificación de Trelease (1924). Sin embargo, como lo anota Koopman *et al.* (2001), al menos parte de las bandas representan marcadores dominantes que tienen dos estados de carácter 0/1, lo cual puede incluir homoplasias en el juego de datos y posiblemente dividida a un árbol con topologías erróneas en el análisis cladístico. Asimismo, dichos autores consideran que los análisis fenéticos y cladísticos, en casos de topologías idénticas, las homoplasias son menores, lo que no afecta a las conclusiones de las relaciones entre las especies; inclusive cuando las homoplasias son mayores por diferencias entre los análisis, las relaciones filogenéticas no se afectan a pesar de las objeciones teóricas.

Actualmente es difícil realizar una comparación de los resultados observados con la técnica AFLP, tanto con los cladísticos (máxima parsimonia), como con los métodos de agrupamiento (UPGMA), de distancia (Neighbor Joining) y de coordenadas (ACP), debido a que esta técnica estimó parcialmente una hipótesis filogenética, representando de manera aproximada las relaciones entre las especies. Hasta la fecha no se conocen reportes de trabajos previos al respecto con este modelo, y mucho menos en el género *Quercus*, por lo que se puede considerar útil esta primera prueba realizada. Sin embargo, existen trabajos como el de Koopman *et al.* (2001) quienes concluyen que dicha técnica molecular es adecuada para el estudio de las relaciones entre especies cercanas, siempre y cuando existan trabajos previos, que apoyen los resultados obtenidos con AFLPs, ya sean caracteres morfológicos u otro marcador molecular.

Acorde a lo reportado por Valencia (2005), la topología del árbol filogenético de las 26 especies de estudio con caracteres moleculares, comprende el 73% de las especies en total del estudio morfológico (30 especies: 25% de la sección *Lobatae*), incluyendo el 100% de las especies de la serie *Lanceolatae*. El árbol filogenético obtenido es una hipótesis filogenética parcial para el género *Quercus* sección *Lobatae*, donde no se apoya como grupo monofilético a *Quercus affinis*, *Q. laurina* y *Q. ocoteifolia*, denominado serie *Lanceolatae*.

Es necesario mucho más trabajo filogenético para resolver los límites entre las especies y sus relaciones dentro de este grupo. Se considera que dentro de este estudio se encuentran individuos variables y confusos al igual que en la filogenia morfológica. Asimismo, debería conocerse el desarrollo del principal objetivo de una investigación referente a la evolución vegetal, y que esta incluya la combinación de aspectos morfológicos y moleculares.

De manera semejante, la investigación taxonómica del género aun tiene mucho que aportar, pues se requiere llenar grandes huecos, pero éstos podrían cubrirse no solo con estudios taxonómicos regionales (González, 1993), sino también con trabajos que aborden problemas específicos, tales como el esclarecimiento de grupos por debajo del nivel de subgénero (series o secciones) o la redescrición y reubicación de especies originalmente descritas con escasos elementos y que, por tanto, han sido mal entendidas; existen muy pocas propuestas sobre la validez de especies y sinonimias de una manera condensada tal es el caso de Valencia (2005).

Hasta la fecha no se conocen reportes de trabajos previos respecto al modelo AFLPs, y mucho menos en el género *Quercus*, por lo que se puede considerar útil esta primera estimación realizada, pues el trabajo ha demostrado el potencial de este marcador para dilucidar parcialmente las relaciones filogenéticas entre las especies de la serie *Lanceolatae*.

X. CONCLUSIONES

Se trató de probar la hipótesis de reconocer a la serie *Lanceolatae*, sección *Lobatae* del género *Quercus*, como grupo monofilético por medio de caracteres moleculares (AFLPs), basándose en los criterios filogenéticos y fenéticos de las especies que la integran. Los resultados que se obtuvieron muestran que la serie *Lanceolatae* es un grupo parafilético y que la clasificación previa de Trelease (1924) para esta serie en particular es artificial.

Los resultados con esta técnica y analizados mediante los programas Winclada, NONA y un análisis de soporte de ramas (Bootstrap, Jackknife) para el análisis filogenético, además de los programas GenAlEx6, N-TSYS p, donde se realizó un análisis de coordenadas principales (ACP), uno de agrupamiento UPGMA y uno de distancias genéticas Neighbor Joining, obtuvieron un árbol filogenético como una hipótesis filogenética parcial para el género *Quercus* sección *Lobatae*, este árbol concuerda parcialmente con análisis previos morfológicos, encontrando una parcial congruencia entre ambos datos, con base en esto, se propone usar la técnica AFLPs como una herramienta útil para resolver relaciones filogenéticas, cuando no existan otros marcadores informativos y se tenga una hipótesis previa morfológica que lo sustente.

Se necesita en trabajos posteriores tratar de incluir un número mayor de caracteres morfológicos así como el uso de otros marcadores moleculares, con el fin de tratar de resolver los límites entre las especies y sus relaciones dentro de la serie *Lanceolatae*. Además se considera que dentro de éste estudio se encuentran individuos variables y confusos de algunas especies al igual que en la filogenia morfológica.

De esta forma, en este estudio se ha discutido la clasificación a nivel de serie por Trelease (1924) basada en características morfológicas y anatómicas externas para el género *Quercus*, destacando la parafilia de la serie *Lanceolatae*. Se sugiere, un arreglo sistemático a nivel series de la sección *Lobatae*, en virtud de que la clasificación de Trelease (1924) basada en características morfológicas y anatómicas externas no han podido clarificar y delimitar estos grupos.

Se propone un estudio posterior con la inclusión de todas las especies de encinos rojos de México con la finalidad de tener un punto de partida más exacto en la obtención de hipótesis filogenéticas para el género *Quercus*.

Finalmente algunos de los temas que se precisa atender acerca de los encinos de México son: a) distribución detallada (considerando hábitats y factores asociados, e.g. disturbio) al nivel genérico e infragenérico, así como por región ambientalmente delimitada, b) tendencias evolutivas relacionadas con la distribución geográfica, c) y esclarecimiento y resolución de problemas taxonómicos, mediante estudios detallados de la distribución de especies afines.

XI. REFERENCIAS

- Aggarwal R.K., Brar D.S., Nandi S., Huang N., Khus G.S. 1999. Phylogenetic relationships among *Oryza* species revealed by AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 1320-1328.
- Albertson R.C., Markert J.A., Danley P.D., Kocher T.D. 1999. Phylogeny of a rapidly evolving clade: the cichlid fishes of Lake Malawi, East Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 5107-5110.
- Anderson E. 1928. Introgressive hybridization. Wiley, New York.
- Anderson J.G., Johnson S.D., Neal P.R., Bernadello G. 2002. Reproductive biology and plant systematics: the grow of a symbiotic association. (Review) *Taxon* 51: 637-653.
- Angiolillo A., Mencuccini M., Baldon L. 1999. Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 411-421.
- Arnold M.L., Emms S.K. 1998. Paradigm lost: natural hybridization and evolutionary innovations. En: Howard D.J. y Berlocher H. (Eds). *Endless Forms*. Oxford University Press, New York. pp. 379-389.
- Avise J.C., Ball R.M. 1990. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. En Futuyama D.J. y Antonovics J. (Eds.) *Oxford Surveys in Evolutionary Biology* Oxford Univ. Press, Oxford. 7: 45-67
- Avise J.C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman and Hall, Inc. New York
- Axelrod D.L. 1983. Biogeography of oaks in the Arcto-Tertiary province. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 70: 629-657.
- Bacon J.R. 1999. La calidad genética de los encinos (*Quercus* spp.) en la Sierra Madre Occidental de México e implicaciones para su manejo forestal. *Ubamari* 15:45.

- Bacon J. R. 2001. Los conceptos de la especie, en particular, en el contexto de *Quercus*. Página Informativa del Herbario del Área de Ecología Forestal de la Universidad Juárez del Estado de Durango, Cd. Durango, Dgo.
(<http://JRBacon.homestead.com/files/CONESPICIEQUER.htm>).
- Bacon J.R., Spellenberg R. 1996. Hybridization in two distantly related Mexican black oaks, *Quercus konzattii* and *Quercus eduardii* (Fagaceae: *Quercus*: Section *Lobatae*). *Sida* 17: 17-41.
- Bai G., Ayele M., Tefera H., Nguyen H.T. 1999. Amplified fragment length polymorphism analysis of *tef* [*Eragrostis tef* (Zucc.) trotter]. *Crop Science* 39: 819-824.
- Bapteste E., Brinkmann H. J., Lee A. D., Moore V.C., Sensen W.P., Gordon L., Duruflé T., Gaasterland P., Lopez M., Philippe H. 2002. The analysis of 100 genes supports the grouping of three highly divergent amoebae: *Dictyostelium*, *Entamoeba*, and *Mastigamoeba*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 99: 1414-1419.
- Barret B.A., Kidwell K.K., Fox P.N. 1998. Comparison of AFLP and pedigree-based genetic diversity assessment methods using wheat cultivars from the pacific northwest. *Crop Science* 38: 1271-1278.
- Barrett M., Donoghue M.J., Sober E. 1991. Against consensus. *Systematic Zoology* 40: 486-493.
- Baum D.A., Shaw K.L. 1995. Genealogical perspectives on the species problem. En Hoch P.C. y Stephenson A.G. (Eds.) *Experimental and Molecular Approaches to Plant Biosystematics*. Missouri Botanical Garden, St. Louis, Missouri. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 53: 289-203.
- Baverstock P.R., Moritz C. 1996. Project design. En: Hillis D.C., Moritz C., y Mable B.K. (Eds.) *Molecular Systematics* second edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. pp. 17-27.

- Becker J., Vos P., Kuipe M., Salamini F., Heun M. 1995. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Molecular Gene Genetics* 249: 65-73.
- Beismann H., Barker J.H.A., Karp A., Speck T. 1997. AFLP analysis sheds light on distribution of two *Salix* species and their hybrid along a natural gradient. *Molecular Ecology* 6: 989-993.
- Bello M.A.G., Labat J.N. 1987. Los encinos (*Quercus*) del estado de Michoacán, México. CEMCA. *Cuadernos de estudios Michoacanos* 1: 99.
- Bentham G. 1840. *Plantae Hatwegianae* E. Societate Linneana Londinensi London. United Kingdom. pp. 393.
- Bensch S., Akesson M. 2005. Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? *Molecular Ecology* 14: 2899–2914.
- Blackith R.E., Reyment R.A. 1971. *Multivariate morphometrics*. Academic Press London.
- Bogler J.D., Simpson B.B. 1995. A chloroplast DNA study of the Agavaceae. *Systematic Botany* 20: 191-205.
- Borgardt., Pigg B.K. 1999. Anatomical and development study of petrified *Quercus* (Fagaceae) fruits from the middle miocene. Yakima Canyon, Washington, USA. *American Journal of Botany* 86: 307-325.
- Bradshaw J.E., Hackett C.A., Meyer R.C., Milbourne D., McNichol J.W., Philips M.S., Waugh R. 1998. Identification of AFLP and SSR marker associated with quantitative resistance to *Globodera pallida* (Stone) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) with a view to marker-assisted selection. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 202-210.
- Bremer K., Wanntrop H.E. 1978. Phylogenetic systematic in botany. *Taxon* 27: 317-329.
- Breyne P., Rombaut D., Van Gysel A., Van Montagu M., Gerats T. 1999. AFLP analysis of genetic diversity within and between *Arabidopsis thaliana* ecotypes. *Molecular and General Genetics* 261: 627–634.

- Bult C.J., Zimmer E.A. 1993. Nuclear ribosomal RNA sequences for inferring tribal relationships within Onagraceae. *Systematic Botanic* 18: 48-63.
- Burger W. 1975. The species-concept in *Quercus*. *Taxon* 24: 45-50.
- Bussell J.D., Waycott M., Chappill J.A. 2005. Arbitrarily amplified DNA markers as characters for phylogenetic inference. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 7: 3–26.
- Caicedo A.L., Gaitán E., Duque M.C., Toro Chica O., Debouck D.G., Tohme J. 1999. AFLP fingerprint of *Phaseolus lunatus* L. and related wild species from South America. *Crop Science* 39: 1497-1507.
- Cain A.J., Harrison G.A. 1960. Phyletic weighting Proceedings. *Zoology Society London* 135: 1-31.
- Cammareri M., Errico A., Sebastiano A. 2004. Relaciones genéticas entre especies de *Aster* análisis multivariado y AFLPs. *Hereditas* 140: 1-8.
- Campbell D., Duchesne P., Bernatchez L. 2003. AFLP utility for population assignment studies: analytical investigation and empirical comparison with microsatellites. *Molecular Ecology* 12: 1979–1991.
- Camus A. 1936-1938 ; 1938-1939 ; 1952-1954. Les chênes. Monographie de genre *Quercus*. Paul Lechevalier (Eds.) Paris, Francia.
- Cantino P.D., Wagstaff S.J. 1998. A reexamination of North American *Satureja* s.l (Lamiaceae) in light of molecular evidence. *Brittonia* 50: 63-70.
- Cervera M.T., Cabezas J.A., Sancha J.C., Martínez de Toda F., Martínez-Zapater J.M. 1998. Application of AFLP to the characterization of grapevine *Vitis vinifera* L. Genetic resources. A case study with accessions from La Rioja (Spain). *Theoretical and Applied Genetics* 97: 51-59.

- Cervera M.T., Storme V., Ivéns B., Gusmao J.B., Liu H., Hostyn V., Slycken J.V., Montagu M.V., Boerjan W. 2001. Dense genetic linkage maps of three populus species (*Populus deltoids*, *P. infgra* and *P. trichocarpa*) based on AFLP and microsatellite markers. *Genetics* 158: 787-809.
- Chase W., Soltis D.E., Olmstead R.G. Morgan D., Les H., Mishler B.D., Duval M.R., Price R.A., Hills H.G., Qiu Y-L., Kron K.A., Rettig J.H., Conti E., Palmer J.D., Manhart J.R., Sytsma K.J., Michaels H.J., Kress W.J., Karol K.G., Clark W.D., Hedrén M., Gaut B.S., Jansen R.K., Kim K-J., Wimpee C.F., Smith J.F., Furnier G.R., Strauss S.H., Xiang Q-Y., Plunkett G.M., Soltis P.S., Swewnsen S.M., Williams S.E., Gadek P.A., Quinn C.J., Eguiarte L.E., Golenberg E., Learn G.H., Graham Jr. S.W., Barret s.C.H., Dayanandan S., Albert V.A. 1993. Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene *rbcl*. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80: 528-580.
- Chernoff B., Duncan T., Elias T., Mishler M.E., Novacek E., Theriot Q.D., Wheeler., Wood D.S. 1989. Commentary on the place of systematics. *ASC Newsletter* 17 *Clarendon Press*. pp. 89-101.
- Clegg T.M., Durbin M.L. 1990. Molecular approaches to the study of plant biosystematic. *Australian Systematic Botany* 3: 1-8
- Cracraft J. 1989. Speciation and its ontology: the empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. En Otte D., y Endler J.A. (Eds.) *Speciation and its Consequences*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass. pp. 28-59.
- Crawford D.J. 1989. Enzyme electrophoresis and plant systematics. En: Soltis D.E. y Soltis P.S. (Eds.) *Isozymes in plant biology* Oregon: Dioscorides Press. pp.146-164.

- Cronquist A. 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press, New York. pp. 1262.
- Cronquist A. 1988. *The Evolution and Classification of Flowering Plants* second edition. The New York Botanical Garden, New York. pp. 555.
- Cuadras C.M. 1981. Métodos de análisis multivariante. Barcelona. Eunibar.
- Cummings M.P., Otto S.P., Makeley J. 1995. Sampling properties of DNA sequence data in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* 12: 814-822.
- Darwin C. 1859. On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life, 1era ed. John Murray, London.
- Davis J.I. 1997. Evolution, evidence, and the role of species concepts in systematics. *Systematical Botanic* 22: 373-403.
- Davis M.B. 1981. Quaternary story and the stability of forest communities. En West D.C., Shugart H.H. y Botkin D.B. (Eds.) *Forest succession: concepts and applications*. Springer-Verlag. New York. pp. 132-153.
- De Candolle A. 1864. Systematic Universalis Regni Vegetabilis. *Prodromus* 16: 1-69.
- De Luna E. 1995. Bases filosóficas de los análisis cladísticos para la investigación taxonómica. *Acta Botánica Mexicana* 33: 63-79.
- De Queiroz A., Donoghue M.J., Kim J. 1995. Separate versus combined analysis of phylogenetic evidence. *Annual Review of Ecology and Systematics* 26: 657-681.
- De Queiroz K. 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation. A conceptual unification and terminological recommendations. En Howard D.J., y Berlocher S.H. (Eds.) *Endless Forms. Species and Speciation* Oxford University Press, New York. pp. 57-75.

- Dellaporta S.J., Wood J., Hicks J. B. 1983. A plant DNA miniprep: versión II. *Plant Molecular Biology*. 1:19-21.
- Despres L., Gielly L., Redoutet B., Taberlet P. 2003. Using AFLP to resolve phylogenetic relationships in a morphologically diversified plant species complex when nuclear and chloroplast sequences fail to reveal variability. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 27: 185–196.
- DeVerno L.L., Mosseler A. 1997. Genetic variation in red pine (*Pinus resinosa*) revealed by RAPD y RAPD-RFLP analysis. *Canadian Journal of Forest Research* 27: 1336-1320.
- Dobzhansky T. 1937. Genetics and the origin of species. Primera edición. Columbia University Press, New York.
- Dodd R.S., Kashani N. 2003. Molecular differentiation and diversity among the California red oaks (Fagaceae; *Quercus* section Lobatae). *Theoretical and Applied Genetics* 107: 884-892.
- Dowling T.E., Moritz C., Palmer J.D., Rieseberg L.H. 1996. Nucleic Acids III: Analysis of fragments and restriction sites. En Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K. Eds. *Molecular Systematics* 2a Ed. Sinauer Associates Inc. Massachusetts. pp. 249-317.
- Doyle J.J. 1993. DNA, phylogeny, and the flowering of plant systematics. *BioScience* 43: 380-389.
- Edwards S.V., Beerli P. 2000. Perspective: gene divergence, population divergence, and the variance in coalescence time in phylogeographic studies. *Evolution* 54:1839-1854.
- Espinosa G.J. 1979. Fagaceae. En Rzedowski J. Rzedowski G.C. (Eds.) 2002. *Flora fanerogámica del Valle de México*. CONABIO, Instituto de Ecología. México. pp.1406.
- Everit B.S. 1978. Graphical techniques for multivariate data. New York. North Holland.
- Everit B.S. 1993. *Cluster analysis*: Arnold. London.
- Farris J.S. 1983. The logical basis of phylogenetic analysis. *Advances in Cladistics* 2: 7-35.

- Felsenstein J. 1984. The statistical approach to inferring evolutionary trees and what it tells about parsimony and compability. En Dunca T., y Stuessy T.F. (Eds.) *Cladistics: perspectives on the reconstruction of evolutionary history*. New York: Columbia University Press. pp. 169.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Felsenstein J. 2004. Inferring phylogenies. Sinauer Associates, Inc., Massachusetts. pp. 664.
- Ferraris J.D., Palumbi S.R. 1996. Molecular zoology. *Advances strategies and protocols*. Wiley-Liss, Inc., pp. 580.
- Ferrusquia-Villafranca I. 1993. Geología de México: una sinopsis. En Ramammoorthy T.P., Bye R., Lot A., y Fa I. (Eds.) *Biological diversity of Mexico origins and distribution*. Oxford University Press. pp. 447-458.
- Fowler D.P., Morris R.W. 1977. Genetic diversity in red pine: evidence for low genetic heterozygosity. *Canadian Journal of Forest Research* 7: 343-347.
- Francisco-Ortega J., Newbury H.J., Ford-Lloyd B.V. 1993. Numerical-analyses of RAPD data highlight the origin of cultivated tagasaste (*Chamaecytisus proliferus* ssp *palmensis*) in the Canary Islands. *Theoretical Applied Genetics* 87: 264-270.
- García-Arévalo A., González-Elizondo S. 1991. Flora y vegetación de la cima del Cerro del Potosí, Nuevo León, México. *Acta Botánica Mexicana* 13: 53-74.
- Giribet., Wheeler W.C. Eds. *Techniques in Molecular Systematics and Evolution* Birkhauser. pp. 4-30.
- Goloboff P.A. 1997. NONA (NO NAME) ver. 2 Published by the author, Tucumán, Argentina.
- Goloboff P.A. 1999. Analyzing large data sets in reasonable times: solutions for composite optima. *Cladistics* 15: 415-428.

- González R.R. 1993. La diversidad de encinos mexicanos. *Revista Sociedad Mexicana Historia Natural* 44: 125-142.
- González-Rodríguez A., Arias D. M., Valencia S., Oyama K. 2004. Morphological and RAPD analysis of hybridization between *Quercus affinis* and *Q. laurina* (Fagaceae), two Mexican red oaks. *American Journal of Botany* 91: 401-409.
- González-Villareal L.M. 1986. Contribución al conocimiento del género *Quercus* (Fagaceae) en el estado de Jalisco. Instituto de Botánica. *Colección Flora de Jalisco*. Universidad de Guadalajara, México. pp. 240.
- Good R. 1974. The geography of the flowering plants. Segunda edición. (Eds.) Longmans, Green and Co. London. pp. 452.
- Gottlieb L.D. 1971. Gel electrophoresis: new approach to the study of evolution. *BioScience* 21: 939-944.
- Gottlieb A.M., Giberti G.C. 2005. Análisis molecular del género *Ilex* (Aquifoliaceae) en el sureste de Sudamérica, evidencia a partir de datos de AFLPs y secuencias de ITS. *American Journal of Botany* 92:352-369.
- Govarts R., Frodin D.G. 1998. World Checklist and Bibliography of Fagales (Betulaceae, Corylaceae, Fagaceae and Ticodendraceae) *Royal Botanical Gardens Kew*.
- Gower J.L., Zubin J. 1966. On the methods and theory of clustering. *Multivariate Behavioral Research* 4: 235-250.
- Graybeal A. 1998. Is it better to add taxa or characters to a difficult phylogenetic problem? *Systematic Biology* 47: 9-17.
- Hansen M.T., Kraft M.Ch., Nilsson N.O. 1999. Evaluation of AFLP in *Beta*. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 845-852.

- Hardin J.W. 1975. Hybridization and introgression in *Quercus alba*. *Journal of the Arnold Arboretum* 56: 336-363.
- Harris S.A. 1999a. RAPDs in systematics a useful methodology? En: Hollingsworth P.M., Bateman R.M., Gornall, R.J. (Eds.) *Molecular Systematics, Plant and Evolution*. Taylor y Francis, London. pp. 221-228.
- Hedrick P.W. 2000. Genetics of populations. Segunda edición. Jones y Bartlett Publishers. USA. pp. 279-301.
- Hennig W. 1966. Phylogenetic Systematics. University of Illinois Pres, Urbana.
- Heun M., Schafer-Pregl R., Klawan D., Castagna R., Accerbi M., Borghi B., Salamini F. 1997. Site of einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. *Science* 278: 1312-1314.
- Hill J.P., Malmberg R.L. 1996. Timing of morphological and histological development in premeiotic anthers of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi (Solanaceae). *American Journal Botany* 83:285-295.
- Hill M., Witsenboer H., Zabeau M., Vos P., Kesseli R., Michelmorel R. 1996. PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca* spp. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 1202-1210.
- Hillis D.M. 1987. Molecular versus morphological approaches to systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 23-42.
- Hillis D.M., Huelsenbeck J.P., Cunningham C.W. 1994. Application and accuracy of molecular phylogenies. *Science* 264: 671-677.
- Hillis D.M. 1998. Taxonomic sampling, phylogenetic accuracy, and investigator bias. *Systematic Biology* 47: 3-8.

- Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K. 1996. *Molecular systematics*. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts. pp. 655.
- Hillis D.M., Wiens J.J. 2000. *Molecules vs Morphology* In systematics: conflicts artifacts, and misconceptions phylogenetics analysis of morphological data. Smithsonian Institution Press, Washington. pp. 1-19.
- Hillis D.M., Huelsenbeck J.P., Cunningham C.W. 1994. Application and accuracy of molecular phylogenies. *Science* 264: 671-677.
- Hillis D.M., Holder M.T. 2000. Reconstructing the tree of life. *Trends in Ecology and Evolution* (Review) pp. 47-50.
- Hongtrakul V., Huestis G.M., Knapp S.J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms as a tool for DNA fingerprinting sun-flower germplasm: genetic diversity among oilseed inbred lines. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 400-407.
- Howard D.J., Preszler, R.W. Williams J., Fenchel S., Boecklen W.J. 1997. How discrete are oak species? Insights from a hybrid zone between *Quercus grisea* and *Quercus gambelli*. *Evolution* 51: 747-755.
- Howard D. J., Berlocher S. H. 1998. *Endless Forms. Species and Speciation*. Oxford University Press, New York.
- Huang J., Sun Y.M. 1999. A modified AFLP with fluorescently-labelled primers and automated DNA sequencer detection for efficiency fingerprinting analysis in plants. *Biotechnology Techniques* 13: 277-278.
- Huelsenbeck J.P., Ronquist F. 2001. MrBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754-755.
- Humboldt A.T., Bonpland. 1809. Voyage de Humboldt et Bonpland. Sixieme Partie. Botanique. *Plantes Équinoxiales* 2: 24-58

- Huys G., Coopman R., Janssen P., Kersters K. 1996. High-resolution genotypic analysis of the genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting. *International Journal of Systematic Bacteriology* 46: 572-580.
- Jansen R.K., Wee J.L., Millie D. 1998. Comparative utility of chloroplast DNA restriction site and DNA sequence data for phylogenetic studies in plants. En Soltis D.E., Soltis P.S. y Doyle J.J. Eds. *Molecular Systematics of plants II DNA sequencing*. Kluwer Academic Publishing. New York. pp.87-100.
- Jardine N., Sibson R. 1971. *Mathematical taxonomy* London: Wiley.
- Jones J.H. 1986. Fagaceae evolution. *Annales of the Missouri Botanical Garden* 73: 246-259.
- Jones T.R., Kluge A.G., Wolf A.J. 1993. When theories and methodologies clash: A phylogenetic reanalysis of the North ambystomatid salamanders (Caudata Ambystomatidae) *Systematic Biology* 42: 92-102.
- Judd W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P.F. 1999. *Plant Systematics a phylogenetic approach*: Sunderland. Sinauer. Massachusetts.
- Kardolus J.P., Van Eck H.J., Van den Berg R.G. 1998. The potential of AFLPs in biosystematics: a first application in *Solanum* taxonomy (Solanaceae). *Plant Systematic Evolution* 210: 87–103.
- Karp A., Kresovich S., Bhat K.V., Ayand W.G., Hodgkin T. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI Technical Bulletin No. 2. *International Plant Genetic Resources Institute*. Rome, Italy. Available at <http://198.93.227.125/publicat/techbull/TB2.pdf>.
- Kaul R.B. 1985. Reproductive morphology of *Quercus* (Fagaceae). *American Journal of Botany* 72: 1962-1977.

- Keim P., Kalif A., Schupp J., Hill K., Travis S.E., Richmond K., Adair D.M., Hugh-Jones M., Kuske C.R., Jackson P. 1997. Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers. *Journal of Bacteriology* 179: 818-824.
- Kitching I.J., Forey P.L., Humpries C.J., Williams D.M. 1998. *Cladistics*. The theory and practice of parsimony analysis. The Systematics Association Publication No. 11. Oxford University Press, Oxford. pp. 228.
- Kluge A.G. 1999. The science of phylogenetic systematics: explanation, prediction, and test. *Cladistics* 15: 429-436.
- Knijff P., Denkers F., Van Swelm N.D., Kuiper M. 2001. Genetic affinities within the herring gull *Larus argentatus* assemblage revealed by AFLP genotyping. *Journal of Molecular Evolution* 52: 85-93.
- Koopman W.J., Zevenbergen M., Van denBerg R.G. 2001. Species relationships in *Lactuca* s.l. (Lactuceae, Asteraceae) inferred from AFLP fingerprints. *American Journal of Botany* 88: 1881-1887.
- Krauss S.L., Peakall R. 1998. An evaluation of the AFLP fingerprinting technique for the analysis of paternity in natural populations of *Persoonia mollis* (Proteaceae) Australian. *Journal of Botany* 46: 533-546.
- Lanyon S.M. 1985. Detecting internal inconsistencies in distance data. Nueva York. *Systematic Zoology* 34: 397-403.
- Lara-Cabrera S.I., Spooner D.M. 2004. Taxonomy of North and Central American diploid wild potato (*Solanum* sect. *Petota*) species: AFLP data. *Plant systematics and Evolution* 248: 129-142.

- Lefort F., Douglas G.C. 1999. An efficient micro-method of DNA isolation from mature leaves of four hardwood species *Acer*, *Fraxinus*, *Prunus* and *Quercus*. *Annals of Forest Sciences* 56: 259-263.
- Li, Wen-Hsiung (1997) *Molecular Evolution*. Sinauer Associates, USA.
- Liebers D., Knijff P., Helbig A.J. 2004. The herring gull complex is not a ring species. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences* 271: 893–901.
- Liebman F.M. 1869. *Chenes Amre. Trop. Iconographie des especes nouvelles ou peu connues*. En Oersted, A.S. (Eds.) París. pp. 87.
- Lin J.J.M., Kuo J. 1996. AFLP: a novel PCR-based technique for plant and bacterial DNA fingerprinting. *Focus* 18: 4-8.
- Lin J.J.M., Kuo J. 1996. AFLP: a novel PCR-based technique for plant and bacterial DNA fingerprinting. *Focus* 18: 4-8.
- Lin J.J.M., Ambrose J., Kuo J. 1997. Chemiluminescent detection of AFLP fingerprints. *Focus* 19: 36-38.
- Linneo C. 1753. *Species Plantarum* primera edición. Stockholm.
- Little E.L. 1979. *The Audubon Society Field Guide to Northern American trees, eastern region*. Alfred A. Knoff. New York. pp.714.
- Llorente B.J. 1995. La búsqueda del método natural. *Colección Ciencias México: Facultad de Ciencias, UNAM*. No 3.
- Loh J.P., Kiev R., Hay A., Kee A., Gan L.H., Gan Y.K. 2000a. Intergeneric and interespecific relationships in Araceae tribe Caladieae and development of molecular markers using Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP). *Annals of Botany* 85: 371-378.

- Loh J.P., Kiew R., Set O., Gan L.H., Gan Y.K. 2000b. A study of genetic variation and relationships within the Bamboo subtribe Bambusinae using Amplified Fragment Length Polymorphism. *Annals of Botany* 85: 607-612.
- Lombard V., Baril C.P., Dubreuil P., Blouet F., Zhang D. 2000. Genetic relationships and fingerprinting of rapeseed cultivars by AFLP consequences for varietal registration. *Crop Science* 40: 1417-1425.
- Mabee P.M. 1989. Assumptions underlying the use of ontogenetic sequences for determining character state order. *Transactions of the American Fisheries Society* 118: 151-158.
- Mace E.S., Gebhardt C.G., Lester R.N. 1999a. AFLP analysis of genetic relationships in the tribe Datureae (Solanaceae). *Theoretical and Applied Genetics* 99: 634-641.
- Mace E.S., Lester R.N., Gebhardt C.G. 1999b. AFLP analysis of genetic relationships among the cultivated eggplant, *Solanum melongena* L., and wild relatives (Solanaceae). *Theoretical and Applied Genetics* 99: 626-633.
- Majer D.R., Mithen B.G., Lewis P., Vos R.P., Oliver R.P. 1996. The use of AFLP fingerprinting for detection of genetic variation in fungi. *Mycology Resource* 100: 1107-1111.
- Mallet J. 2001. Concepts of species. Preimpresión de un artículo En: S.A. Levin Eds. *Enciclopedia of Biodiversity* Vol. V, Academic Press, New York. pp. 427-440.
- Manly F.J.B. 1986. *Multivariate statistical methods a primer*. Chapman and Hall. London
- Manos P.S., Doyle J.J., Nixon K. 1999. Phylogeny, biogeography, and process of molecular differentiation in *Quercus* subgenus *Quercus* (Fagaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12: 333-349.
- Market C.L., Moller F. 1959. Multiple forms of enzymes : tissue ontogenetics and species specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 47: 753-763.

- Martens M., Galeotti H. 1843. Enumeratio synoptica plantarum phanerogamicarum ab Hernico Galeotti in regionibus mexicans collectarum. *Bulletium de L'Académie Royale des Sciences et Belles-Lettres de Bruxelles* 10: 212-217.
- Martínez M. 1981. Los encinos de México. *Annales del Instituto de Biología*. Comisión Forestal. Serie Técnica Manejo. Época 2ª No 8, Michoacán, México. pp. 358.
- Martínez M. 1997. Sistemática Molecular: Comparación entre diferentes métodos y sus aplicaciones. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60: 123-136.
- Massa A.N., Larson S.R., Jensen K.B., Hole D.J. 2001. AFLP variation in *Bromus* section *Ceratochloa* germplasm of Patagonia. *Crop Science* 41: 1609-1616.
- Matthes M.C., Daly A., Edwards K.J. 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP). En: Karp A., Isaac P.G., Ingram D.S. (Eds.) *Molecular Tools for Screening Biodiversity*. Chapman and Hall, London. pp. 183-190.
- Mayr E. 1966. The proper spelling of taxonomy. *Systematic Zoology* 15:88
- Mayr E. 1970. Populations, species and evolution. Harvard University Press, Cambridge, Mass.
- Mayr E. 1974. Cladistics analysis or cladistic classification?. *Zoology Systematic Evolution* 12: 94-128.
- Mayr E. 1981. Biological classification: towards a synthesis of opposing methodologies. *Science* 214: 94-128.
- Mayr E. 1982. The growth of biological thought. Diversity, Evolution and Inheritance. Belknap, Cambridge, Mass.
- McGregor C.E., Van Treuren R., Hoekstra R., Van Hintum T.J.L. 2002. Analysis of the wild potato germplasm of the series *Acaulia* with AFLPs: implications for ex situ conservation. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 146-156.

- McVaugh R. 1974. Flora novo-galiciana (*Quercus*). Contributions from the University of Michigan Herbarium, *Annual Arboreus Michigan* 12: 1-93.
- Meulman J. 1986. A distance approach to nonlinear multivariate analysis. *Leiden* DSWO press.
- Michaux A. 1801. *Histoire des chênes de l'Amérique* Paris: Crapelet.
- Michener C.D., Sokal R.R. 1957. A quantitative approach to a problem in classification. *Evolution* 11: 130-162.
- Miyamoto M.M., Fitch W.M. 1995. Testing species phylogenies and phylogenetic methods with congruence. *Systematic Biology* pp. 44.
- Miyashita N.T., Kawabe A., Innan H. 1999. DNA variation in the wild plant *Arabidopsis thaliana* revealed by amplified fragment length polymorphism analysis. *Genetics* 152: 1723-1731.
- Mohler C.L. 1990. Co-occurrence of oak subgenera: implications for niche differentiation. *Bulletin of the Torrey Botanical Club* 117: 247-255.
- Montoya M.J.M. 1966. Notas fitogeográficas sobre *Quercus oleoides* Cham et Schlecht. *Turrialba* 16: 57-66.
- Morgante M., Pfeiffer A., Jurman I., Paglia G., Olivieri A.M. 1998. Isolation of microsatellite markers in plants. En: Karp A., Isaac P.G., Ingram D.S. (Eds.) *Molecular Tools for Screening Biodiversity* Chapman and Hall, London. pp. 288-296.
- Moritz C., Hillis D.D. 1996. Molecular systematics: context and controversies. En: Hillis D. M., Moritz C., Mable B.K. (Eds.) *Molecular Systematics* Sinauer Associates Inc. Massachussets. pp.1-12.
- Morrone J.J. 2000. El lenguaje de la cladística. Dirección General de Publicaciones y Fomento Editorial. UNAM. México.
- Mueller G.U., Wolfenbarger L.L.R. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Tree* 10: 389-394.

- Muller C.H. 1942. The central american species of *Quercus*. U. S. Department of Agriculture. Miscellaneous Publications. pp. 477.
- Muller C.H. 1942a. Notes on the American flora, chiefly Mexican. *American Midland Naturalist* 27: 470-490.
- Muller C.H., Mc Vaugh R. 1972. The oaks (*Quercus*) described by Née (1801) and by Humboldt & Bonpland (1809), with comments on related species. *Contributions from the University of Michigan Herbarium* 9: 507-522.
- Müller-Using B. 1994. Contribuciones al conocimiento de los bosques de encino y pino-encino en el Noroeste de México. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Autónoma de Nuevo León. Linares, Nuevo León. pp. 194.
- Muluvi G.M., Sprent J.I., Soranzo N., Provan J., Odee D., Folkard G., McNicol J.W., Powell W. 1999. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of genetic variation in *Moringa oleifera* Lam. *Molecular Ecology* 8: 463-470.
- Née L. 1801. Descripciones de varias especies nuevas de encinos (*Quercus* de Linneo). *Annales de Ciencias Naturales* 3: 260-276.
- Negi M.S., Singh A., Lakshmikumaran M. 2000. Variación genética y relaciones filogenéticas entre y dentro de especies de *Withania* reveladas por AFLP's. *Genome* 43: 975-80.
- Nei M. 1972. Genetic distances between populations. *American Naturalist* 106: 283-292.
- Nei M. 1987. *Molecular evolutionary genetics* Columbia University Press. New York
- Nei M., Kumar S.R. 2000. Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press. Cap. 8 Maximum Likelihood. pp. 147-165.
- Nei-Li. 1979. Mathematical model for studing genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings Natural Academic Science USA*. 76: 5269-5273.

- Nelson G. 1973. Classification as an expression of phylogenetic relationships. *Systematic Zoology* 22: 344-359.
- Nichols R. 2001. Gene trees and species trees are not the same. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 358–364.
- Nixon K.C. 1989. Origins of Fagaceae. En Crane P.R y Blackmore S. (Eds.) *Evolution Systematics and Fossil History of the Hamamelidae Vol. 2 “Higher” Hamamelidae*, Clarendon, Oxford. pp. 23-44.
- Nixon K.C., Muller C.H. 1992. The taxonomic resurrection of *Quercus laceyi* Small (Fagaceae). *Sida* 15: 57-69
- Nixon K.C. 1993. The genus *Quercus* in Mexico. En: Ramamoorthy T.P., Bye R., Lot A. y Fa J. (Eds.) *Biological diversity of Mexico: origins and distribution*. Oxford University Press. New York. pp. 447-458.
- Nixon K.C. 1993a. Infrageneric classification of *Quercus* (Fagaceae) and typification of sectional names. *Annales des Sciences forestieres* 50: 25-34.
- Nixon K.C. 1999a. Winclada, program and documentation. Published by the autor, Ithaca, New York.
- Nixon K.C. 1999b. The parsimony ratchet, a new method for rapid parsimony analysis. *Cladistics* 15: 407-414.
- Osgood Ch.E., Suci J., Tannembaum P.H. 1957. *The measurement of meaning*. Illinois. University of Illinois press.
- Page R.D.M., Holmes E.C. 1998. *Molecular evolution. A phylogenetic approach*. Blackwell Science Oxford. pp. 346.
- Palmer J.D. 1986. Isolation and structural analysis of chloroplast DNA. *Methods in Enzimology* 118: 167-186.

- Palmer J.D. 1987. Chloroplast DNA evolution and biosystematics uses of chloroplast DNA variation. *American Naturalist* 130: 6-29.
- Palmer J.D., Jansen R.K., Michaels H.J., Chase M.W., Manhart J.R. 1988. Chloroplast DNA variation and plant phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75: 1180-1206.
- Parsons Y.M., Shaw K.L. 2001. Species boundaries and genetic diversity among Hawaiian crickets of the genus *Laupala* identified using amplified fragment length polymorphism. *Molecular Ecology* 10:1765–1772.
- Peakall R., Smouse P.E. 2006. GenAlEx V6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Australian National University, Canberra, Australia. <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>
- Peinado M.C., Bartolomé C., Delgadillo J., Aguado I. 1994. Pisos de vegetación de la Sierra de San Pedro Mártir, Baja California, México. *Acta Botánica Mexicana* 29: 1-30. phylogenetic studies. *Evolution* 54: 1839–1854.
- Posada D., Crandall K.A. 2001. Selecting the best-fit model of nucleotide substitution. *Systematic Biology* 50: 580-601.
- Poulton E.B. 1904. What is a species? Proceedings. Entomology Society of London.1903, lxxvii–cxvi.
- Powell W., Morgante M., Andre C., Hanafey M., Vogel J., Tingey S., Rafalski A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germoplasm analysis. *Molecular Breeding* 2: 225-238.
- Prendini L. 2001. Species or supraspecific taxa as terminals in cladistic analysis? groundplans versus exemplar revisited. *Systematic Biology* 50: 290-300.
- Reineke A., Karlovsky P. 2000. Simplified AFLP protocol: Replacement of primer labeling by the incorporation of a-labeled nucleotides during PCR. *Biotechniques* 28: 622-623.

- Rieseberg L.H., Kim M.J., Seiler G.J. 1999. Introgression between the cultivated sunflower and a sympatric wild relative, *Helianthus petiolaris* (Asteraceae). *International Journal of Plant Science* 160: 102-108.
- Roa A.C., Maya M.M., Duque M.C., Tohme J., Allem A.C., Bonierbale M.W. 1997. AFLP analysis of relationships among cassava and other *Manihot* species. *Theoretical Application Genetic* 95: 741-750.
- Robson G.C. 1928. The species problem. An introduction to the study of evolutionary divergence in natural populations. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Roderic D.M., Holmes E.P. 1998. Molecular evolution a phylogenetic approach. *Blackwell Science* United Kingdom.
- Rogers D.J. 1963. Taxometrics, new name, old concept. *Brittonia* 15: 285-290.
- Rohlf F. 1998. NTSYS, PC. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Versión 2.02. Exeter Publ., Setauket, TY.
- Roldán-Ruiz I., Dendauw J., Van Bockstaele E., Depicker A., De Loose M. 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* sp.). *Molecular Breeding* 6: 125-134.
- Romero S., Lira R., Dávila P. 2000. A phenetic study of the taxonomic delimitation of *Quercus acutifolia* and *Q. conspersa* (Fagaceae), *Brittonia* 52: 177-187.
- Russell J.R., Fuller J.D., Macaulay M., Hatz B.G., Jahoor A., Powell W., Waugh R. 1997. Direct comparison of level of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs SSRs and RAPDs. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 714-722.
- Russell J.R., Weber J.C., Booth A., Powell W., Sotelo-Montes C., Dawson I.K. 1999. Genetic variation of *Calycophyllum spruceanum* in the Peruvian Amazon Basin, revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis. *Molecular Ecology* 8: 199-204.
- Rzedowski J. 1978. Vegetación de México. Limusa. México, D.F. pp. 432.

- Rzedowski J. 1991a. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta Botánica Mexicana* 14: 3-21.
- Rzedowski J. 1991b. El endemismo en la flora fanerogámica mexicana: una apreciación analítica preliminar. *Acta Botánica Mexicana* 15: 47-64.
- Saitou N., Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolution* 14: 406-425.
- Sattath S., Tversky A. 1977. Additive Similarity Trees, *Psychometrika* 42: 319-45.
- Sauer J.D. 1988. Plant migration (the dynamics of geographic patterning in seed plant species). University of California Press. pp. 282.
- Saunders J. A., Pedroni M. J., Penrose L. D. J., Fist A.J. 2001. AFLP analysis of *Opium poppy*. *Crop Science* 41: 1596-1601.
- Schaal B.A., Olsen K.M. 2000. Gene genealogies and population variation in plants. *Proceedings National Academic of Science* 97: 7024-7029.
- Schlechtendal D.F.L., Chamizo A. 1830. *Plantarum mexicanarum Linneana* 5: 78-80.
- Scotland R.W. 1992 Cladistics theory. En: Forey P.L., Humpries C.J., Kitching I.L., Scotland R.W., Sieberg D.J., William D.M. (Eds.) *Cladistics a practical course in systematics* Oxford: Clarendon Press. pp. 3-13.
- Skroch P., Tivang J., Nienhuis J. 1992. Analysis of genetic relationships using RAPD marker data. En *Join Plant Breeding Symposia* Minneapolis: Crop Science Society of America-American Society for Horticultural Science-American Genetic Association.
- Segura S., Coppens d' Eeckenbrugge G., Bohorquez A. 2002. Estudio de la diversidad del género *Passiflora* enfocandose sobre el subgénero *Tacsonia* con AFLP. *Genetic Resources and Crop evolution* 00: 1-13.

- Selander R.K., Gaugant D.A., Ochman H., Musser J.M., Gilmour M.N., Whittam T.S. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Applied and Environmental Microbiology* 51:873-884.
- Sharma S.K., Knox M.R., Ellis T.H.N. 1996. AFLP analysis of the diversity and phylogeny of Lens and its comparison with RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 751-758.
- Shaun M., Henning J.A., Moore D.L. 2000. AFLP analysis of DNA from dried hop cones. *Crop Sciences* 40: 1383-1386.
- Siddall M.E. 1995. Another monophyly index: Revisiting the Jackknife. Londres. *Cladistics* 11: 33-56.
- Singh G. 1999. *Plant Systematic* Enfield, NH: Science Publisher Inc.
- Simon J.P., Bergeran Y., Gagnon D. 1986. Isozyme uniformity in populations of red pine (*Pinus resinosa*) in the Abitibi Region, Quebec. *Canadian Journal of Forest Research* 16: 1133-1135.
- Simpson G.L. 1951. The species concept. *Evolution* 5:285-298.
- Simpson J. 1997a. Amplified fragment length polymorphisms (AFLPs). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60: 119-122.
- Simpson J. 1997b. Molecular markers. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60: 73-76.
- Simpson J., Martínez O., Mendoza-Herrera A., Sánchez M., Hernández F., Hernández-Delgado S. 1999. AFLP analysis of plant genomic DNA. *En: 4º Internacional Course on Analysis and manipulation of plant genome*. Irapuato CINVESTAV. pp 85-97.
- Smith D.W. 1993. Oak regeneration: the scope of the problem. En Loftis D., McGee C.E. (Eds.) *Oak regeneration: serious problems, practical recommendations*. *Genetic Technique Report*

SE-84. Southeastern Forest Experiment Station. Forest Service, U. S. Department of Agriculture. Asheville, NC., USA. pp. 40-52.

Sneath P.H.A. 1957. The application of computers to taxonomy. *Journal of Genetics and Microbiology* 7: 201-226.

Sneath P.H.A., Sokal R.R. 1973. *Numerical taxonomy* W.H. Freeman and Company. San Francisco

Sober E. 1988. *Reconstructing the past: Parsimony, evolution and inference*. MIT Press, Cambridge. pp.265.

Sokal R. R., Crovello T.J. 1970. The biological species concept: a critical evaluation. *American Naturalist* 104: 127-153.

Sokal R.R., Michener C.D. 1958. A statical method for evaluating systematic relationship. *University of Kansas Science Bulletin* 44: 467-507.

Sokal R.R., Sneath P.H.A. 1963. *Principies of numerical taxonomy* W.H. Freeman and Company. San Francisco

Soltis D.E., Soltis P.S. 1998. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. En Soltis D.E. y Soltis P.S. (Eds.) *Molecular systematics of plants II*. DNA sequencing. Kluwer Academic Publishers. pp.1-42.

Soltis P., Soltis D. 1996. Phylogenetic analysis of large molecular data sets. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 59: 99-113.

Spellenberg R., Bacon J.R. 1996. Taxonomy and distribution of a natural group of black oaks of Mexico (*Quercus*, section *Lobatae*, subsection, *Racemiflorae*). *Systematic Botany* 21: 85-99.

- Stuessy T. 1990. *Plant Taxonomy: The Systematic Evaluation of Comparative Data*. Columbia University Press, New York.
- Sullivan J.P., Lavoue S., Arnegard M.E., Hopkins C.D. 2004. AFLPs resolve phylogeny and reveal mitochondrial introgression within a species flock of African electric fish (Mormyroidea: Teleostei). *Evolution* 58: 825–841.
- Swofford D.L., Olsen G.J. 1990. Phylogeny reconstruction. En: Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K. Eds. *Molecular Systematic* Sinauer Associates. Massachusetts.
- Swofford D.L., Olsen G.J., Waddell P.A., Hillis D.M. 1996. Phylogenetic inference. En: Hillis D.M., Moritz C., Mable B.K. (Eds.) *Molecular Systematics* Sinauer Associates Inc. Massachusetts.
- Swofford D.L. 2002. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods) ver. 4. Sinauer Associates, Sunderland Massachusetts.
- Takhtajan A. 1997. *Diversity and classification of flowering plants* Columbia university Press. New York.
- Templeton A.R. 1998. Species and speciation. Geography, population structure, ecology, and gene trees. En: Howard D.J. y Berlocher S.H. (Eds.) *Endless Forms. Species and Speciation* Oxford Univ. Press, New York. pp. 32-43.
- Tohme J., González O.D., Beebe S., Duque M.C. 1996. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. *Crop Science* 36: 1375-1384.
- Torgerson W.S. 1952. Multidimensional scaling: I theory and methods. *Psychometrika* 17: 401-419.
- Torgerson W.S. 1958. *Theory and methods of scaling*. New York. John Wiley.

- Tous J.M., Sánchez P. 1984. Aplicación del análisis de coordenadas principales a los datos obtenidos mediante la técnica del diferencial semántico. *Universitas Tarraconenses* 6: 151-159.
- Tovar-Sanchez, E., Oyama, K. 2004. Natural hybridization and hybrid zones between *Quercus crassifolia* and *Quercus crassipes* (Fagaceae) in Mexico: morphological and molecular evidence. *American Journal of Botany* 91: 1352-1363.
- Trelease W. 1924. The American oaks. *Memoirs of the national academy of sciences* 20: 1-255, 420.
- Tucker J.M. 1974. Patterns of parallel evolution of leaf form in New World oaks. *Taxon* 23: 129-154.
- Vaillancourt R.E., Weeden N.F., Garvin D.F. 1999. Increasing the efficiency and economy of the chemiluminiscent detection of DNA. *Biotechniques* 13: 339-340.
- Valencia A.S. 1994. Contribución a la delimitación taxonómica de tres especies del género *Quercus* subgénero *Erythrobalanus*. Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Valencia A.S. 1995. Contribución al conocimiento del género *Quercus* (Fagaceae) en el estado de Guerrero, México. *Contribuciones del Herbario de la Facultad de Ciencias UNAM*. 1:154.
- Valencia A.S. 2004. Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 75: 33-53.
- Valencia A.S. 2005. Análisis Filogenético de la serie *Lanceolatae* Trel. del género *Quercus*, Fagaceae. Tesis de Doctorado, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Van den Berg R.G., Bryan G.J., Del Rio A., Spooner D.M. 2002. Reduction of species in the wild potato *Solanum* section *Petota* series *Longipedicellata*: AFLP, RAPD and chloroplast SSR data. *Theoretical and Applied Genetics* 105: 1109–1114.

- Van Huylbroeck J.M., De Riek J., De Loose M. 2000. Genetic relationships among *Hibiscus syriacus*, *Hibiscus sinosyriacus* and *Hibiscus paramutalis* revealed by AFLP, morphology and ploidy analysis. *Genetics Resources and Crop Evolution* 47: 335-343.
- Van Valen L. 1976. Ecological species, multippecies, and oaks. *Taxon* 25: 233-239.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprint. *Nucleic Acids Resource* 23: 4407-4414.
- Vos R.A. 2003. Accelerated likelihood surface exploration: the likelihood ratchet. *Systematic Biology* 52: 368-373.
- Wallace A.R. 1865. On the phenomena of variation and geographical distribution as illustrated by the Papilionidae of the Malayan region. Transactions of the Linnean Society of London. 25:1-71.
- Weir B.S. 1996. *Genetic data analysis II Sunderland* Sinauer Associates, Inc. Publishers. Massachusstes.
- Wenzel J.W. 2002. Phylogenetic analysis: The basic method. En DeSalle R., Giribet G., y Wheeler W.C. (Eds.) *Techniques in Molecular Systematics and Evolution* Birkhauser. pp. 4-30.
- Whittemore A. T., Schaal B.A. 1991. Interspecific gene flow in sympatric oaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 88: 2240–2544.
- Wiley E.O. 1981. *Phylogenetics: The theory and practice of phylogenetic systematics* New York: John Wiley and Sons.
- Winfield M.O., Arnold G.M., Cooper F., Le Ray M., White J., Karp A., Edwards K.J. 1998. A study of genetic diversity in *Populus nigra* subsp. *betulifolia* in the Upper Severn area of the UK using AFLP markers. *Molecular Ecology* 7: 3-10.

- Williams D.M. 1992. DNA analysis: theory. En: Forey P.L., Humphries C.J., Winfield I.L. Arnold M.O., Cooper G.M., Le Ray F., White M., Karp J., Edwards A. 1998. A study of genetic diversity in *Populus nigra* subsp. *betulifolia* in the Upper Severn area of the UK using AFLP markers. *Molecular Ecology* 7: 3-10.
- Wolfe A.D., Liston A. 1998. Contributions of PCR-Based methods to plant systematics and evolutionary biology 43-86. En Soltis D.E., Soltis P.M., Doyle J.J. (Eds.) *Molecular systematics of plants II DNA sequencing*. New Cork. Kluwer Academia Publishers.l
- Xu M.L., Melchinger A.E., Xia X.C., Lübberstedt T. 1999. High-resolution mapping of loci conferring resistance to sugarcane mosaic virus in maize using RFLP, SSR and AFLP markers. *Molecular and General Genetics* 261: 574-581.
- Xu R.Q., Tommoka N., Vaughan D.A. 2000. AFLP markers for characterizing the azuki bean complex. *Crop Science* 40: 808-815.
- Yee E., Kidwell K.K., Sills S.G., Lumpkin T.A. 1999. Diversity among selected *Vigna angularis* (Azuki) accessions on the basis of RAPD and AFLP markers. *Crop Science* 39: 268-275.
- Zavala Ch.F. 1990. Los encinos mexicanos: un recurso desaprovechado. *Ciencia y Desarrollo XVI. Encinos hidalguenses* 95: 43-51.
- Zavala Ch. F. 1992. Manual para la identificación de especies de encinos de la región de Linares, Nuevo León y áreas cercanas. *Departamento de Ecología y silvicultura, División de Ciencias Forestales*. Universidad Autónoma de Chapingo. México. pp. 1-33
- Zavala Ch.F., García E. 1996. Frutos y semillas de encinos. Universidad Autónoma Chapingo. México. pp. 51.
- Zavala Ch.F. 1998. Observaciones sobre la distribución de encinos en México. *Polibotánica* 8: 47-64.

Zhu J., Gale M.D., Quarrie S., Jackson M.T., Bryan G.J. 1998. AFLP markers for the study of rice biodiversity. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 602-611.

XII. GLOSARIO

Algoritmo: Es una serie de pasos organizados que describe el proceso que se debe seguir, para dar solución a un problema específico, un algoritmo genético es un método de búsqueda dirigida basada en probabilidad.

Autopomorfía: Es un estado apomórfico presente en un único taxón.

Característica de herencia: cuantitativa: variable independiente bien definida que en un OTU puede presentar 2 o mas estados mutuamente excluyentes; estados de carácter generalmente continuos

Especiación simpátrida: se da cuando se origina una especie a partir de una o más especies ancestrales en ausencia de disyunción geográfica.

Clado: Es una de las ramas del árbol filogenético propuesto para agrupar a las especies. Por consiguiente, un clado se interpreta como un conjunto de especies emparentadas (con un antepasado común).

Dendrograma: es un término genérico para la representación diagramática de un árbol filogenético.

Estado apomórfico: Es aquel que surge a partir del estado plesiomorfo, es decir que resulta de una transformación del carácter dentro del grupo en estudio.

Estado plesiomórfico: Es aquel que surge primero en el tiempo, ya que se halla o se infiere que se hallaba en el antecesor del grupo en estudio.

Distancia genética: se basa en las diferentes frecuencias de alelos en los individuos ó poblaciones; es una función de las frecuencias génicas en cada individuo (métodos basados en matrices de distancias: NJ, UPGMA, ACP)

Fenética: también conocida como taxonomía numérica, es una técnica cuya finalidad es la clasificación de los organismos basándose en su similitud, generalmente en su morfología, o en cualidades observables, sin tomar en cuenta su filogenia o relación evolutiva.

Fenotipo: Es cualquier característica detectable de un organismo (estructural, bioquímico, fisiológico o conductual) determinado por una interacción entre su genotipo y su medio.

Análisis filogenético: Es la disciplina encargada de estimar la reconstrucción evolutiva de los organismos, representada en forma de árbol filogenético.

Filogenia: (del griego: *phylon* = tribu, raza y *genetikos* = relativo al nacimiento, de *génesis* = nacimiento) es la historia evolutiva de los taxones, es decir, los grupos de la clasificación de los seres vivos

Gene concatenado: regiones unidas unas con otras.

Genotipo: Es el contenido genético (el genoma específico) de un individuo, en forma de ADN.

Homología: Es la expresión de una misma combinación genética y que se supone tienen el mismo origen evolutivo (ancestro común)

Homoplasia: Es el cambio evolutivo paralelo que hace que dos organismos presenten un mismo carácter adquirido independientemente, en términos genéticos, se llama alelos homoplásicos a fragmentos que tienen el mismo tamaño cuando en realidad sólo tienen en común la longitud en pares de bases.

Monofilético: También conocido como clado o grupo natural. Es aquel que incluye todos los descendientes de un ancestro común, es decir, que realmente existen como resultado de la evolución. Pueden ser reconocidos por compartir una o más sinapomorfias o por poseer una combinación particular de caracteres.

Nodos internos o componentes: Son los puntos de ramificación del cladograma, es decir que están conectados con dos o más nodos o taxones terminales.

Ramas internas o internodos: Son los segmentos que unen nodos internos.

Ramas terminales: Son los segmentos que unen nodos internos y taxones terminales.

Taxones terminales: Son las unidades en estudio, es decir los taxones que se hallan situados en los extremos de las ramas terminales y están conectados con un solo nodo interno o con la raíz.

Parafilético: también conocido como grado. Es aquel que excluye algunos de los descendientes del ancestro común y están basados en simplesiomorfías.

Población panmíctica: Es una población que se reproduce al azar.

Polifilético: Es aquel que incluye descendientes de ancestros distintos y se forman con base en paralelismos o convergencias.

Politépico: De muchos tipos

Raíz o nodo basal: Es la base o punto de partida del cladograma.

Sistemática: Es el estudio de la clasificación de las especies con arreglo a su historia evolutiva o filogenia

Similitud: taxa que comparten una característica

Simplesiomorfía: Es un estado plesiomórfico presente en dos o más taxones.

Sinapomorfia: es un estado apomórfico compartido por dos o más taxones.

Taxón: Es un grupo de organismos emparentados, que en una clasificación dada han sido agrupados, asignándole al grupo un nombre en latín, una descripción, y un "tipo", que si el taxón es una especie es un espécimen o ejemplar concreto

Taxa: En latín el plural de taxón es taxa, y es como suele usarse en inglés, pero en español el plural adecuado es taxones

Taxonomía: Es el estudio de la clasificación de los organismos, tiene por objeto agrupar a los seres vivos que presenten semejanzas entre sí y que muestren diferencias con otros seres.

Variabilidad genética interespecífica: Se refiere a la variación en el material genético entre especies, sujetas a cambios evolutivos en los que subyacen cambios genéticos, los que a su vez están influenciadas por factores como: selección natural y deriva génica que actúan principalmente disminuyendo la variabilidad de éstas o migración y mutación que actúan aumentándola.

Variabilidad genética intraespecífica: Se refiere a la variación en el material genético dentro de las especies.

OTU: unidad taxonómica operacional, los objetos de estudio (los taxones terminales) pueden ser especies, géneros o cualquier otra categoría taxonómica.

XIII. ABREVIATURAS USADAS

ACP análisis de coordenadas principales

ADN Ácido Desoxirribonucleico

AFLP Polimorfismo de los fragmentos de restricción amplificados de ADN

ARN Ácido Ribonucleico

CTAB Tris-HCl 1M, H₂O destilada, CTAB 1%, NaCl 5M, EDTA 0.5M, PVP-40, ácido ascórbico, DIECA (ácido diethyldithiocarbámico sal de sódio, 2- mercaptoetanol)

D.O. Densidad Óptica

DAF huella digital obtenida por amplificación de secuencias al azar del ADN

EC electroforesis capilar

EDTA ácido etilendiaminotetracético

G+C guanina + citosina

h hora

IC Índice de Consistencia

IR Índice de Retención

ITS secuencias de transcripción interna

JOE fluoróforo 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'- dimetoxifluoresceína

m metro

M molaridad

m.m marcador molecular

mg miligramos

min minutos

ml/g mililitros por gramo

MLEE electroforesis de isoenzimas

mm milímetros

mM milimolar

msnm metros sobre el nivel del mar

N₂ nitrógeno molecular

ng/ul nanogramos por microlitros

N-J vecino más próximo

nm nanomolar

°C grados centígrados

OTU unidad taxonómica operacional

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

QTL loci de rasgos cuantitativos o cuantificables

RAPD Amplificación aleatoria de fragmentos polimórficos de ADN

RFLP Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción

rpm revoluciones por minuto

SDS sulfato dodecasil (detergente)

SSR microsatélites

TE Tris-EDTA

TBE Tris-Borate-EDTA

Trel. Trelease

U Unidades enzimáticas

ul microlitros

UPGMA Método del grupo sin peso con una medida aritmética (análisis de agrupamiento)

urf unidades relativas de fluorescencia

V voltios

V/cm voltios por centímetro

ug microgramos

ug/ ul microgramos por microlitros

uM micromolar

XIV. APENDICE I

A continuación se presentan las principales características de las 4 especies pertenecientes al grupo externo, las 22 especies restantes del estudio se reportan en el trabajo de Valencia (2005).

1.- *Quercus laeta* Trel. Mem. Nat. Acad. Sci. 20: 70. pl. 86, 87. 1924.

Árbol pequeño de 5-8 (-12) m de alto. **Ramillas** de 1.5-2.5 mm de diámetro, glabrescentes, lenticelas pálidas y conspicuas. **Yemas** 2-3.5 mm de largo, ovoides, obtusas. **Hojas** con **pecíolo** de 2-5 (-10) mm, pubescente; **láminas** angostamente elípticas, oblongas, lanceoladas, oblanceoladas u obovadas, de (3-) 6-10 (-17) cm de largo, por (1-) 2-6 (-9) cm de ancho; **base** abruptamente redondeada a cordada, rara vez aguda; **margen** engrosado y resoluto; **ápice** obtuso angostamente elíptico o agudo; **haz** endurecido, lustroso, pubescente cerca de la hoja; **envés** uniformemente o poco pubescente, con tricomas pálidos muy ramificados, sésiles retorcidos y enredados o con algunos mechones de pelos glandulares rojizos. **Frutos** de maduración anual, solitario o en grupos de dos ó tres. **Cúpula** hemisférica de 10-20 mm de diámetro. **Bellota** ovoide, a veces largamente ovoide, de (0.5-) 7-12 (-20) mm de diámetro.

2.- *Quercus magnoliifolia* Trel. Mem. Nat. Acad. Sci. 20: 65-66. pl. 72. 1924.

Árbol de 5-10 m de alto. **Ramillas** de 2-5 mm de diámetro, estriadas longitudinalmente pero no muy marcadas, glabrescentes. **Yemas** 2-4 mm de largo, ovoide-elipsoidales, obtusas, casi glabras. **Hojas** con **pecíolo** de 5-15 mm, glabrescentes; **láminas** amplias y un tanto estrechamente obovadas, rara vez elípticas, de (5-) 15-25 cm de largo, por (4-) 7-12 (-25) cm de ancho; **base** cuneada, aguda, redondeada o auriculada; **margen** engrosado y finamente revoluto; **ápice** callosos o cortamente mucronados; **haz** duro, lustroso, casi

glabro con frecuencia pubescente en la base de la nervadura central; **envés** pálido, con tricomas sésiles sobrepuestos. **Frutos** de maduración anual, solitario o en grupos de dos ó tres. **Cúpula** hemisférica de 15-25 mm de diámetro. **Bellota** ovoide, de 20-30 (-40) mm de largo, de 10-25mm de diámetro.

3.- *Quercus rugosa* Trel. Mem. Nat. Acad. Sci. 20: 75-76. pl. 101, 102. 1924.

Árbol de 10-20 (-30) m de alto. **Ramillas** de 2-5 mm de diámetro, un tanto corpulentas. **Yemas** 2-5 mm de largo, ovoides, obtusas, inconspicuas. **Hojas** con **pecíolo** de 5-10 mm, pubescente; **láminas** muy rugosas, obovadas, elíptico-obovadas o casi suborbiculares, de (4-) 8-15 (-20) cm de largo, por (2-) 5-8 (-13) cm de ancho; **base** cordada; **margen** engrosado, revolutos y a veces plegados; **ápice** obtuso y redondeado; **haz** duro, un tanto lustroso, esencialmente glabro excepto la base de la nervadura principal; **envés** denso y finamente piloso, los tricomas con frecuencia enmarañados, copiosamente glandular-puberolento, con pelos simples vermiformes. **Frutos** de maduración anual, solitario o en grupos de dos ó tres. **Cúpula** hemisférica (2-) de 8-15 mm de diámetro, de 5-12mm de alto. **Bellota** ovoide, de (8-) 15-25 (-30) mm de largo, de (5-) 8-12 (-15) mm de diámetro.

4.- *Fagus grandifolia* Ehrl. subs. *mexicana*

Árbol caducifolio que crece hasta 20-35 m, con **corteza** gris plateada. **Hojas** con **pecíolo** corto, color verde oscuro; **margen** entero y serrado, de 6-12 cm (raramente 15 cm). **Yemas** que se observan en invierno son muy características entre los árboles de Norteamérica, pues son largas y estrechas (15-20 mm por 2-3 mm) con dos filas de **escamas** superpuestas en las yemas. **Fruto** es una nuez aguda, contenida junto con otra dentro de una cápsula tetralobulada de espinas no muy agudas.