



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

“Variabilidad genética de *Quercus  
grisea* en la Sierra Fría de  
Aguascalientes.”

# T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)

P R E S E N T A

JOSÉ CARLOS ROSAS OSORIO

DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS

MÉXICO, D.F.

DICIEMBRE 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 28 de octubre de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA AMBIENTAL) del (la) alumno (a) ROSAS OSORIO JOSÉ CARLOS con número de cuenta 093013848 con la tesis titulada "Variabilidad genética de *Quercus grisea* en la Sierra Fría de Aguascalientes", realizada bajo la dirección del (la) DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS:

Presidente: DRA. ANA ELENA MENDOZA OCHOA  
Vocal: DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU  
Secretario: DR. JORGE EDUARDO CAMPOS CONTRERAS  
Suplente: DRA. CECILIA LIANA ALFONSO CORRADO  
Suplente: DRA. SILVIA ROMERO RANGEL

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 08 de diciembre de 2009.

  
Dr. Juan Muñoz Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

## AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM. A su planta docente, por compartir en las aulas sus conocimientos y experiencias en la resolución de problemas asociados a la investigación y al mismo tiempo enriquecer mi formación profesional y a su área administrativa por permitir integrarme a su programa y tener siempre la disponibilidad y compromiso para realizar todo lo necesario para lograr mi grado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado a través de su programas de becas para estudio de maestría.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado por el apoyo económico y administrativo en su programa de apoyo a titulación.

A los proyectos PAPIIT IN220709 y PAPCA 2008-2009 por el financiamiento otorgado para la elaboración de la tesis.

Al mí comité tutorial, por su compromiso y valiosas contribuciones durante el desarrollo del proyecto de tesis. El cual está integrado por:

Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras.

Dra. Ana Elena Mendoza Ochoa.

Dra. Silvia Romero Rangel.

## AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL.

Al Dr. Jorge Eduardo Campos Contreras por el apoyo y la confianza al dirigir este trabajo. Por haberme aceptado como estudiante, compartir sus conocimientos, motivarme a ser mejor estudiante y promover no solo mi formación académica sino personal. Por invertir mucho más que un simple asesor y sobretodo, gracias por su amistad doctor.

A la Dra. Ana Mendoza Ochoa y la Dra. Silvia Romero Rangel, por formar parte de mi comité tutorial, por haber invertido su compromiso y sentido crítico durante la elaboración del proyecto y por sus valiosas aportaciones durante las sesiones de comité y la elaboración del escrito. Quiero agradecer que hayan cambiado la visión que tenía sobre mi proyecto e invertir sus ideas en temas, que sin su dirección, no me hubiera sido posible comprender y plasmar. También quiero agradecer sobretodo que compartan su motivación y conocimiento para proyectos personales que quiero realizar posteriormente plasmado en muy amenas pláticas. Muchas gracias por tanta motivación.

A la Dra. Cecilia Alfonso Corrado por compartir su proyecto, metodologías y el apoyo prestado en campo. Por ser parte de mi jurado, la revisión del escrito y compartir sus ideas para la elaboración de este trabajo. Sin tu colaboración nada de esto hubiera sido posible, pero sobretodo, gracias por tu amistad.

Al Dr. Daniel Piñero Dalmau, por aceptar ser parte de mi jurado y por sus valiosas contribuciones durante la revisión del escrito.

Al Dr. Ricardo Clark Tapia, por todo el apoyo prestado en campo, las largas pláticas y compartir su pasión por los encinos. Gracias por tu amistad.

Al Dr. Oswaldo Téllez Valdés, por ayudarme otorgarme todas las facilidades para la elaboración del mapa de distribución potencial y por todo el interés vertido en mi trabajo.

Al M. en C. Alejandro Monsalvo Reyes, por realizar la lectura de las reacciones PCR, pero sobretodo gracias por los buenos consejos, la forma en que me has ayudado a ser mejor persona y todas las enseñanzas que predicas a través del ejemplo.

A la Dra. Sofía Solórzano, por las facilidades técnicas otorgadas en el laboratorio y su ayuda en la aclaración de conceptos genéticos.

A Francisco y Norberto, por compartir muchos buenos momentos durante la toda la maestría, por dejarme ser la mala influencia y por hacer de la amistad un arte.

A la Veronica García, por soportarme tanto y compartir tantas y buenas platicas.

A Adriana Espinoza, gracias por apoyarme tanto, no solo de manera administrativa sino personal, bendigo el momento en que me aceptaste como amigo, te quiero mucho y espero seguir teniendo tu amistad durante mucho tiempo.

A Aurora y Martha, por estar siempre a mi lado, por ser como mi conciencia y por soportarme durante tanto tiempo. Gracias las quiero mucho.

A Aline y Carolina, por toda su dedicación en el lab, por preguntarme tanto y exigirme cada vez más a cada día, porque a través de sus preguntas me involucré más con los encinos, pero sobretodo, muchas gracias por todas esas pláticas y por su amistad, las quiero mucho.

A Salomón, Iván, Arturo y Héctor. Gracias por todas las ñoñeadas y risas en el lab, por dejarme estar en su vida y estar siempre cuando los necesito.

A Helena, Jazmín, Luis Carlos, Laura, Diana y Marisol, porque a pesar de tener poco tiempo de conocernos, se han ganado mi cariño y confianza y han hecho del laboratorio un verdadero segundo hogar.

A Joyce, Amanda y Daniela por las buenas charlas y su calidez humana, gracias por soportarme.

A mis amigos Irma, Paty, Lety, Lalo, Martha, Ricardo, Ramón y Amelia, quienes han sido parte muy importante en mi vida y les sigo queriendo con todo el corazón.

A toda la banda de la FES Iztacala, Ana Paula, Ana, Pablo, Oswaldo, Lilibeth, Leo, Brenda, Ariel, Claudia, Karina, Kenia, Victor, Liliana y Maribel. Por toda la diversión y por hacerme sentir parte de esta gran facultad.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias y Posgrado, Ricardo, Jorge, Anahí, Arturo, Elisa, Iván, Tania y Cristina, Gracias por seguir manteniendo nuestra amistad y estar ahí cada vez que los necesito.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por todo lo que me ha dado.

## DEDICATORIA

*A mi padre por todos los buenos momentos que dejó en mi vida y sus enseñanzas. Por sembrar en mí la semilla, para que todos esos momentos sigan floreciendo en la vida diaria a través del recuerdo. Te amo papá (q.e.p.d).*

*A mi madre, por toda la dedicación, amor y esfuerzo que ha puesto en mí, por ser mi cómplice y principal razón de existir. Te quiero mamá.*

*A mis hermanos, por todos los buenos y malos momentos compartidos juntos, por estar siempre conmigo y por crecer juntos para ser mejores personas.*

*A mis sobrinos, por los abrazos, las risas diarias, las travesuras y por dejarme compartir con ustedes la maravillosa dicha de verlos crecer.*

*A mis tíos, quienes han estado siempre conmigo y se preocupan por mí en todo momento.*

## ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION.....	3
<i>Los encinos</i> .....	3
<i>Variabilidad genética, flujo génico y estructura genética poblacional</i> .....	5
<i>Caracteres reproductivos en el género Quercus y su relación con la variabilidad genética y estructura genética poblacional</i> .....	8
<i>El análisis geográfico de la variación genética</i> .....	13
<i>Genética de poblaciones y conservación</i> .....	15
<i>Problemática ambiental en la Sierra Fría de Aguascalientes</i> .....	17
<i>Marcadores moleculares</i> .....	20
<i>Justificación</i> .....	22
<i>Hipótesis</i> .....	23
OBJETIVOS.....	24
MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
RESULTADOS.....	39
DISCUSIÓN.....	53
CONCLUSIONES.....	66
BIBLIOGRAFIA.....	67
ANEXO 1.....	81

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

### CUADROS

Cuadro 1. Variabilidad genética para el género <i>Quercus</i> .....	12
Cuadro 2. Descripción de sitios de colecta.....	28
Cuadro 3. Amplificación de productos para microsatélites.....	30
Cuadro 4. Relación de fragmentos para la serie <i>quru</i> GA en la especie <i>Q. grisea</i> .....	39
Cuadro 5. Cantidad de alelos exclusivos y observados para cada locus por sitio.....	40
Cuadro 6. Cantidad de alelos compartidos entre subgrupos de sitios de muestreo.....	41
Cuadro 7. Heterocigocis esperada y observada por alelo y sitio de muestreo para <i>Q. grisea</i> . ....	43
Cuadro 8. Coeficiente de ancestría ( $\Theta_{st}$ ) pareado para los sitios de muestreo de <i>Q. grisea</i> .....	44
Cuadro 9. Análisis molecular de varianza. ....	45
Cuadro 10. Distancias genéticas entre datos pareados para <i>Q. grisea</i> .....	46
Cuadro 11. Flujo génico ( <i>Nem</i> ) para sitios pareados de la especie <i>Q. grisea</i> .....	46
Cuadro 12. Cuadro comparativo de distancias geográficas entre sitios de muestreo. ....	47
Cuadro 13. Índice de variación topográfica media (IVTM) entre sitios de muestreo.....	47
Cuadro 14. Cuadro resumen comparativo de las relaciones entre sitios pareados.....	51
Cuadro 15. Cuadro de correlación por sitio de muestreo entre la distancia genética y el logaritmo natural de la distancia geográfica.....	52

### FIGURAS

Figura 1. Ilustración e imagen de <i>Quercus grisea</i> .....	27
Figura 2. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo.....	28
Figura 3. Bandas de ADN en gel de agarosa.....	39
Figura 4. Amplificación tipo microsatélite para el sitio CP con el primer <i>quru</i> AG OC11.....	40
Figura 5. Cantidad de alelos compartidos entre subgrupos de sitios de muestreo.....	42
Figura 6. Estabilidad genética de los sitios de muestreo en tiempos generacionales.....	47
Figura 7. Perfil topográfico entre sitios pareados de <i>Q. grisea</i> .....	48
Figura 8. Topografía y distribución de los sitios de muestreo de <i>Q. grisea</i> .....	49
Figura 9. Distribución potencial de <i>Q. grisea</i> en la Sierra Fría de Aguascalientes.....	50

## RESUMEN

### Variabilidad genética de *Quercus grisea* en la Sierra Fría de Aguascalientes.

*Quercus grisea* es un encino abundante en la Sierra Fría de Aguascalientes y está asociado a bosque de encino y pastizales, éste bosque es el principal proveedor de servicios ambientales para el estado y ha sido ampliamente deforestado en los últimos años. Proponer estudios de genética de poblaciones puede ayudar a entender patrones reproductivos y de dispersión de esta especie y a tomar decisiones en materia de conservación. Los objetivos de este trabajo son identificar el nivel de variabilidad genética en la especie *Quercus grisea*, comparar los niveles de flujo génico entre los sitios para inferir patrones asociados con su polinización y dispersión e identificar los sitios prioritarios de conservación. Se utilizaron tres marcadores tipo microsatélite de la serie *quruGAQR*, para cuatro sitios de muestreo de al menos 20 individuos cada uno. Se encontraron 63 alelos distintos para los primers analizados, es cual es un valor alto de diversidad genética. La heterocigosis observada fue de 0.6781 el cual también es un valor alto y corresponde a especies con polinización obligadamente cruzada. La  $\Theta_{st}$  calculada es de 0.0265 y no hay un fenómeno de estructura genética asociado. El flujo génico entre los sitios es diferencial y se observa que existe aislamiento por distancia para uno de los sitios (MT) y los tres restantes (EC, ES y CP) forman un grupo reproductivo cercanamente relacionado en términos de distancia genética y flujo génico. Estos resultados nos permiten categorizar los sitios muestreados en base a prioridades de conservación, siendo el sitio ES el más importante para la conservación en términos de diversidad y flujo génico.

## ABSTRACT

### Genetic variability of *Quercus grisea* in Sierra Fria of Aguascalientes

The oak *Quercus grisea* is one of the most abundant species in Sierra Fría of Aguascalientes where is associated to grasslands and pine-oak forests areas, this forest is a principal provider of environmental services at the state, and has been much harvested on recent years. Propose population genetics studies could contribute to identify dispersal and reproductive patterns intrinsic to this species and take issues at conservation field. Objectives for this work are: identify the level of genetic variability in *Quercus grisea* species, compare gene flow between sites to deduce patters related to pollination and dispersal and, to identify conservational priorities sites. Where used three microsatellite nuclear markers from *quruGAQR* series, was included four sampled sites with at least 20 individuals each one. We find 63 alleles for 3 tested primers, this represent a high genetic diversity value. Observed heterocigocity was 0.6781 a high value too and belongs to strict crossover pollination species. Calculated  $\Theta_{st}$  are 0.0265, not represent an associated genetic structure pattern. Gene flow between sites is differential and denotes distance isolation pattern at one site (MT), at three remaining sites (EC, ES and CP) constitutes a closely related group linked by genetic distance and gene flow. Results allow us categorize sites by conservation priority being ES the most important site for conservation issues in terms of diversity and gene flow.

## INTRODUCCION

### *Los encinos.*

*Quercus* L. (encinos, robles) es el género más grande de la familia Fagaceae con aproximadamente 500 especies (Rogers & Jonhson, 1998), distribuidas principalmente en regiones templadas y subtropicales del hemisferio norte (Nixon, 1998). A nivel mundial, el género *Quercus* se divide en dos subgéneros (*Cyclobalanopsis* y *Quercus*). El subgénero *Cyclobalanopsis*, esta restringido exclusivamente a Asia y Malasia, mientras que el subgénero *Quercus* presenta una distribución amplia en América, Europa y Asia. Este subgénero esta dividido en cinco secciones de las cuales tres: *Quercus* (encinos blancos), *Lobatae* (encinos rojos) y *Protobalanus* (encinos intermedios), están presentes en México (Nixon, 1993).

Los encinos dominan los bosques templados de América y Europa y el centro de diversidad en el Nuevo Mundo se encuentra en los bosques montañosos de México como dominantes exclusivos o formando asociaciones con pinos. De la misma forma numerosas especies arbustivas del género *Quercus* se encuentran como dominantes en los chaparrales de México (Nixon, 2002). México es considerado centro de diversificación del género con alrededor de 150-200 especies (Rzendowski, 1981; Nixon, 1998), de las cuales aproximadamente 115 son endémicas (González-Rivera, 1993).

Los encinos no solo son elementos importantes en la composición de los bosques templados sino que, además, son especies sumamente utilizadas. Muchas de las especies del género *Quercus* tienen valor comercial por la alta calidad de la madera y por la serie de productos que se obtienen de ellos como son carbón, corcho, taninos, colorantes, ornamentales, para usarse como árboles de sombra, alimento para humanos y ganado (Nixon, 1998). Además, son importantes en la formación y consolidación de suelos, así como también en la captación de agua y preservación de mantos acuíferos *in situ* y a distancia (Reyes y Gamma-Castro, 1995).

A pesar de su importancia ecológica, diversos autores han sugerido que factores antropogénicos tales como los asentamientos humanos, la ganadería y la explotación forestal son responsables del disturbio en los sitios de distribución de especies del género *Quercus* (Rzendowski, 1981; Bonfil, 1998; Challenger, 1998; Alfonso-Corrado *et al.*, 2007).

La investigación del género *Quercus* en México ha sido dirigida principalmente a aspectos taxonómicos muy relevantes (Villareal, 1986; Valencia-Avalos, 1989; Zavala Chávez 1990; Vázquez-Villagrán, 1992; González Rivera, 1993; De la Cerda, 1999). Sin embargo, los estudios relacionados con aspectos sobre ecología, manejo y conservación son escasos (Bonfil, 1998; Alfonso Corrado *et al.*, 2007) por lo que existe en general poca información relacionada al género en México.

Siendo México un centro de diversidad para el género, resulta importante medir la magnitud de la diversidad al interior de las especies y particularmente los fenómenos evolutivos que ocurren al interior de las poblaciones, en términos de diversidad genética y dinámica genética poblacional. A través del estudio de ambas características de las poblaciones, se pueden identificar localmente aquellas con alta diversidad genética, además de patrones asociados al aislamiento reproductivo, lo cual tiene múltiples aplicaciones, no solo en el campo taxonómico (Widmer *et al.*, 2009), sino también en el evolutivo y de la conservación (Frankham, 1995; Oostermeijer *et al.*, 2003; Toro y Caballero, 2005).

Es importante mencionar que existen algunos trabajos pioneros realizados en nuestro país que están relacionados con la variabilidad genética del grupo, su estructura poblacional y la identificación de híbridos entre especies, destacando los de Alfonso-Corrado *et al.*, 2004, Tovar-Sánchez y Oyama, 2004, González-Rodríguez *et al.*, 2005, González-Rodríguez *et al.*, 2006.

### *Variabilidad genética, flujo génico y estructura genética poblacional.*

La variabilidad genética ha sido definida como la variedad de alelos y genotipos presentes en una población (Toro y Caballero, 2005); es la materia prima de la cual dependen la adaptación y la evolución. A los altos niveles de variabilidad se les atribuyen elementos benéficos para las especies y poblaciones, confiriendo la capacidad de responder a amenazas tales como, enfermedades, parásitos, depredadores y cambios ambientales. Inversamente, niveles bajos de variabilidad son vistos como limitrofes de la capacidad de las especies para responder a tales amenazas a corto y largo plazo (Amos y Harwood, 1998). Por lo tanto, no es para sorprenderse que exista una amplia preocupación en lo que concierne a la fragmentación del hábitat. La fragmentación, casi siempre conducirá a una reducción en el tamaño de las poblaciones y a un aumento consiguiente en el ritmo en el cual la variabilidad se pierde a través de deriva génica. En casos extremos, la población puede ser reducida a números muy bajos y tener pérdidas exageradas, un acontecimiento que se refiere a menudo como cuello de botella génico (Amos y Harwood, 1998).

La variabilidad puede ser incrementada por mutación en la población o flujo génico con una población vecina. La pérdida de la diversidad ocurre pasivamente a través de deriva génica y activamente a través de la selección natural. Como el reabastecimiento de la diversidad puede ser lento (mutaciones de *novo*), o infrecuente (afluencia de una especie o población vecina), la mayoría de los cambios rápidos o grandes en la diversidad pueden ser atribuibles a la pérdida, más que al aumento (Amos y Harwood, 1998).

La cantidad de caracteres neutros depende directamente de la tasa de mutación ( $\mu$ ) y su permanencia, del tamaño efectivo de la población ( $N_e$ ). Mientras una población se mantenga a través de las generaciones, por mutación acumulará progresivamente caracteres nuevos, la pérdida de los caracteres *de novo* será determinado por la deriva génica y su efecto será inversamente proporcional al tamaño efectivo de la población. Así entonces, poblaciones ancestrales con tamaños efectivos de población altos, acumularán una mayor ganancia de caracteres, que las poblaciones pequeñas en las cuales se prevé una alta pérdida por deriva genética (Nei, 1966; Charlesworth, 1997).

El tamaño poblacional es una de las principales determinantes, tanto en la diversidad genética, como la estructura genética. Si existe reducción en el tamaño poblacional, las poblaciones se hacen más susceptibles al efecto de la deriva genética y por lo tanto, se

generan patrones de pérdida alélica y diferenciación genética entre las poblaciones (Loveless y Hamrick, 1994).

La estructura genética es la distribución no aleatoria de alelos o genotipos en el tiempo y espacio (Loveless y Hamrick, 1984). La estructura genética está moldeada por la interacción entre fuerzas evolutivas de selección, flujo génico, mutación y deriva génica. La variación en los efectos de estas fuerzas evolutivas en el rango de distribución de las especies, resulta en patrones espaciales característicos en la estructura genética de las poblaciones (Jarvis *et al.*, 2005).

El flujo génico redistribuye alelos entre poblaciones. Éste puede darse ya sea por el movimiento físico y la reproducción de los individuos o por la dispersión de las semillas y el polen. A pesar de que el grado de desplazamiento de los alelos puede estar afectado principalmente por la distancia geográfica, otros factores pueden modificar la manera en que el flujo génico redistribuye los alelos entre las poblaciones, entre los que se incluyen las barreras o restricciones a la migración, diferencias regionales en la fenología y temporadas de polinización y mecanismos de dispersión del polen y semillas (Arnaud, 2003; Galen *et al.*, 1997; Ennos, 1994).

El mantenimiento de la diversidad genética, se debe principalmente a los mecanismos de reproducción, entrecruzamiento y dispersión presentes en una población o linaje evolutivo. La reproducción es el proceso que traslada el arreglo genotípico actual a las siguientes generaciones, mientras que la dispersión determina los patrones post-reproductivos de la distribución de los genes dentro y entre las poblaciones (Loveless y Hamrick, 1984).

El sistema de entrecruzamiento es el factor que más puede influenciar la estructura genética. La endogamia incrementa las correlaciones entre los gametos, reduce la recombinación y mantiene el desequilibrio gamético. Como resultado se homogenizan los genotipos producidos dentro de los linajes y se incrementa el potencial para la diferenciación genética (Loveless y Hamrick, 1984; Charlesworth y Wright, 2001). Otros factores como la limitada dispersión de las semillas, producen la agregación de prole relacionada y la endogamia puede generar subdivisión genética intrapoblacional. El entrecruzamiento generalmente disminuye las correlaciones entre alelos unitarios, aumenta el tamaño efectivo de la población y reduce la subdivisión entre las poblaciones. Estudios teóricos han demostrado que solo una pequeña cantidad

de flujo génico a larga distancia, basta para prevenir la diferenciación entre poblaciones para alelos neutros (Loveless y Hamrick, 1984).

Un método muy recurrido en el estudio de la estructura genética es el de aislamiento por distancia, que sugiere que las poblaciones geográficamente más distantes tenderán a ser más distintas genéticamente (Wright, 1943). Las áreas de distribución de las especies que están fragmentadas o no están conectadas por flujo génico, tienden a evolucionar en distintos patrones genéticos por la acumulación gradual de diferencias genéticas por deriva y mutación. El intercambio de alelos por flujo génico tiende a contrarrestar tal diferenciación (Jarvis *et al.*, 2005).

*Caracteres reproductivos en el género Quercus y su relación con la variabilidad genética y estructura genética poblacional.*

Los caracteres morfológicos reproductivos, la dispersión y el ciclo de vida de las especies, entre otras características, determinan en gran medida la variabilidad y estructura genética que existe al interior de las especies (Loveless y Hamrick, 1984).

Biología floral. Las inflorescencias masculinas y femeninas crecen en ramas separadas, las femeninas como espigas y las masculinas como amentos, ambas se desarrollan en meristemas solitarios de crecimiento nuevo, con tallos cortos, que emergen de yemas del tejido previo (Kaul, 1985). Para un árbol en particular, el amento se desarrolla durante dos semanas después del desarrollo de la yema y la liberación del polen ocurre durante 2 a 4 días. El desarrollo de la espiga es posterior al desarrollo de los amentos y la receptividad del estigma puede variar de 6 a 14 días en una flor individual, para un árbol en particular, se ha identificado que la receptividad es de alrededor de 15 días (Ducousso *et al.*, 1993). El hecho de que la receptividad del estigma sea mayor al de la liberación del grano de polen, promueve que se incremente el número de individuos que polinizan a un árbol en particular (Lumaret *et al.*, 1991). De la misma forma, se favorece la polinización cruzada a grandes distancias (García-Mozo *et al.*, 2007). La polinización cruzada generalmente, disminuye las correlaciones entre alelos unitarios, aumenta el tamaño efectivo de la población, previene la estructura genética poblacional y promueve heterocigosis en las poblaciones (Loveless y Hamrick, 1984).

Ciclo de vida. Los encinos son policárpicos con ciclos de vida largos (Kaul, 1985). Muchas de las especies se reproducen por semilla y algunas presentan reproducción clonal facultativa a partir de tallos jóvenes, tocones y rizomas. La capacidad de reproducirse por tallos, disminuye mientras se producen semillas o aumenta la edad del tronco. La edad a la que se producen las primeras semillas es variable entre las especies y depende de la densidad poblacional, las condiciones ambientales del sitio y el tamaño de los árboles. La producción de semillas puede disminuir a medida que aumenta el diámetro del tronco (Ducousso, 1993). En las especies policárpicas, los individuos adultos, incorporan sus alelos durante varios periodos de floración, lo que previene la estructura genética y mantiene la diversidad genética (Loveless y Hamrick, 1984). La clonalidad no juega un papel importante en la estructura genética de los encinos, pero sí en la diversidad de genética, de sus poblaciones, en diversos estudios se ha identificado,

que existen valores menores de heterocigosis en especies de reproducción clonal con respecto a las de reproducción sexual (Ainsworth, 2003; Soto *et al.*, 2007).

Producción de bellotas. La producción de bellotas varía entre los árboles y entre los años, depende directamente de la producción de flores femeninas y de la cantidad que se fertilizan por año. Factores como la edad del árbol, la autoincompatibilidad, la disponibilidad de recursos y la presencia de parásitos, pueden limitar la producción de bellotas (Ducouso, 1993). La cantidad de bellotas que germinan cada año contribuye a la diversidad genética, porque aumenta el tamaño efectivo de la población y con esto se mantiene directamente la diversidad alélica.

Auto-incompatibilidad. Por pruebas directas de autopolinización, cruza entre individuos cercanamente emparentados (Yacine y Bouras, 1997) y estimaciones indirectas de entrecruzamiento por marcadores moleculares (Williams *et al.*, 2001), se ha detectado que las especies de encino son altamente incompatibles entre individuos cercanamente emparentados. Se ha propuesto que la incompatibilidad se debe a un control gametofítico del crecimiento del tubo polínico a través del estilo (Yacine y Bouras, 1997). Las cruza interespecíficas (Yacine y Bouras, 1997) y múltiples estudios moleculares (Whittemore y Schaal, 1991; Bruschi *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 2001; Aldrich *et al.*, 2003b; Tovar Sánchez y Oyama, 2004; Valbuena-Carabaña *et al.*, 2005; Curtu *et al.*, 2007), han demostrado que en los encinos la hibridación es muy frecuente. La autoincompatibilidad en los encinos, promueve la diversidad genética y la baja estructura genética entre las poblaciones (Ducouso, 1993).

Fenología. Las especies de encinos de manera general, florecen durante la primavera en regiones templadas y durante la temporada seca en áreas paleotropicales, aunque algunas especies, presentan dos periodos de floración anuales. (Kaul, 1985; Ducouso *et al.*, 1993). Los estudios sobre la temporalidad en la floración han demostrado que entre las distintas poblaciones, no existe una sincronía perfecta en la floración, al menos el 30% de los individuos en un sitio, pueden retrasar su periodo de floración (Lumaret *et al.*, 1991). Lo anterior promueve la polinización a largas distancias y aumenta el tamaño efectivo de la población, con lo que se establece una alta diversidad alélica y baja estructura poblacional (Varela *et al.*, 2008).

Dispersión del polen. La dispersión del grano de polen está asociada al viento como vector de dispersión (Kaul, 1985). La velocidad y la distancia a la que viajan los granos

de polen, dependen de su tamaño, el diámetro y su peso, además de la altura a la que son liberados. En el género *Quercus*, los granos de polen suelen ser pequeños y de bajo peso, lo que promueve que los granos viajen a grandes distancias. Muchos factores pueden restringir la dispersión del polen como pueden ser, la densidad de la vegetación, la densidad foliar del árbol y la reducción en la intensidad del viento (Ducousso *et al.*, 2003). Se ha propuesto que la dispersión del polen es leptocúrtica, es decir, es mayor la cantidad de polen que se dispersa a menores distancias y menor la cantidad a grandes distancias, lo que genera patrones de similitud genética entre poblaciones cercanas entre sí (Streiff *et al.*, 1999; Dutech *et al.*, 2005), la dispersión es también anisotrópica, lo que crea patrones asimétricos de similitud genética, los cuales están asociados a la dirección del viento (Dutech *et al.*, 2005; Austerlitz *et al.*, 2007).

Dispersión de la semilla. Las semillas en el género *Quercus* presentan un carácter similar a un involucro llamado cúpula, el cual es un meristemo circular constituido de pequeñas ramas estériles que puede contener, generalmente, a una sola flor femenina. Las semillas, son llamadas bellotas y se forman por un tejido duro, seco de fruto unilocular, derivado de un ovario ínfero. Se considera que el crecimiento de la cúpula ayuda a la maduración del fruto y combinado con la esclerificación y la acumulación de taninos y cristales, proveen de protección ante eventos de herbivoría e infecciones por patógenos. Se considera que la maduración del fruto puede ser anual o bianual (Kaul, 1985). Se propone que la dispersión de las semillas es principalmente por gravedad (Dow *et al.*, 1996; Grivet *et al.*, 2005; Valbuena *et al.*, 2005; Guguerly *et al.*, 2007; Grivet *et al.*, 2008) y en menor proporción, por animales que dispersan las semillas a cortas distancias, como roedores que alcanzan rangos de dispersión de hasta 30 m (Sork, 1984; Jensen y Nielsen, 1986; Ducousso, 1993;) o ardillas con rangos de dispersión de entre 40 y 150 m (Ducousso, 1993; Sork, 1984) y aquellos animales que las transportan a larga distancia, como los azulejos, que pueden dispersarlas desde pocos metros y hasta 8 km (Bossema, 1979; Ducousso, 1993, Petit *et al.*, 2002; Gómez, 2003; Dutech *et al.*, 2005, Grivet *et al.*, 2008) y los pájaros carpinteros, con un rango de hasta 1.5 km (Grivet *et al.*, 2005).

Mediante estudios genéticos se ha comprobado que la dispersión por gravedad es mucho más frecuente que la mediada por vectores animales, con lo que se promueve la formación de grupos familiares en distancias cortas de hasta 70 metros (Dow *et al.*, 1995; Streiff *et al.*, 1999; Soto *et al.*, 2007). Sin embargo, en últimos años, se ha dado

una mayor importancia al papel que juegan las aves como dispersores de los encinos (Dutech *et al.*, 2005; Grivet *et al.*, 2005; Austerlitz *et al.*, 2008). Estudios de paternidad en plántulas, han demostrado que en un área determinada, se puede asociar solamente el 70% de los genotipos, a individuos probables de ser parentales que provienen de la misma población, el resto puede ser atribuible a la dispersión a larga distancia (Dow *et al.*, 1995), lo que promueve la baja diferenciación genética entre los sitios y la alta diversidad genética y contribuye a reivindicar el papel que juegan los dispersores entre las especies de encinos.

Se han generado diversos estudios que están relacionados con la variabilidad genética y la estructura genética poblacional, que comprenden temas taxonómicos (Manos *et al.*, 1999; Williams *et al.*, 2001; Aldrich *et al.*, 2003b; Bruschi *et al.* 2003; Bellarosa *et al.*, 2005 entre otros), identificación de refugios pleistocénicos (Finkeldey y Mátýàs, 2003; González-Rodríguez *et al.*, 2004; Grivet *et al.*; 2006; Gugerly *et al.*; 2007; Muir *et al.*, 2004; Marsico *et al.*, 2009, entre otros), análisis de paternidad (Dow *et al.*, 1996; Streiff *et al.*, 1999; Smouse y Robledo-Arnuncio, 2005; Soto *et al.*, 2007, entre otros) y diversos análisis espaciales de dispersión.

De manera general, en estudios realizados con microsatélites, se ha identificado que los encinos en términos genéticos, son muy diversos y presentan baja estructura genética poblacional (Cuadro 1). El mecanismo de dispersión por viento, el ciclo de vida largo y la autoincompatibilidad, pueden generar patrones de alta diversidad genética en poblaciones no estructuradas genéticamente. Sin embargo, es la variación local en las fuerzas evolutivas, mediadas por las determinantes ecológicas, lo que establece los patrones de variabilidad y estructura genética específicos para cada una de las poblaciones de las especies. El identificar tanto, la diversidad genética, como la estructura genética poblacional, permite reconocer cuál es la forma en la que se comparten los alelos entre las poblaciones y caracterizar cuáles son las zonas, que en términos de interacción y diversidad genética son las más importantes y con esto plantear estrategias adecuadas para la conservación ecológica.

**Cuadro 1.** Variabilidad genética para el género *Quercus*.  $H_o$ . Heterocigosis observada,  $H_e$  Heterocigosis esperada,  $F_{ST}$ . Coeficiente de coancestría.

<b>Especie</b>	$H_o$	$H_e$	$F_{ST}$	<b>Referencia.</b>
<i>Q. germinata</i>	0.170	0.310	0.540	Ainsworth <i>et al.</i> , 2003.
<i>Q. rubra</i>	0.759	0.796	0.047	Aldrich <i>et al.</i> , 2005.
<i>Q. pirenaica</i>	-	0.822	0.001	Valbuena <i>et al.</i> , 2005.
<i>Q. petraea</i>	-	0.817	0.048	Bruschi <i>et al.</i> , 2000.
<i>Q. pubescens</i>	-	0.820	-	”
<i>Q. petraea</i>	-	0.750	0.180	Bruschi <i>et al.</i> , 2003.
<i>Q. suber</i>	-	0.565	0.061	Hornero <i>et al.</i> , 2001.
<i>Q. robur</i>	0.810	0.870	0.057	Cottrell <i>et al.</i> , 2003.
<i>Q. petraea</i>	0.870	0.890	0.007	”
<i>Q. robur</i>	-	0.750	0.032	Curtu <i>et al.</i> , 2007.
<i>Q. pubescens</i>	-	0.891	0.001	”
<i>Q. petraea</i>	-	0.871	0.031	”
<i>Q. frainetto</i>	-	0.816	0.022	”
<i>Q. cerris</i>	-	0.507	0.016	”
<i>Q. lobata</i>	0.750	0.740	0.020	”
<i>Q. semiserrata</i>	-	-	0.080	Pakkad <i>et al.</i> , 2007.
<i>Q. ilex</i>	0.725	0.765	0.056	Soto <i>et al.</i> , 2007.
<i>Q. suber</i>	0.518	0.551	0.062	”

### *El análisis geográfico de la variación genética.*

Dada la limitada movilidad de las plantas, la estructura genética implica también estructura espacial (Loveless y Hamrick, 1984). Los sistemas de información geográfica pueden funcionar como una herramienta para investigar los procesos que moldean los genomas y de esa manera conservar la diversidad genética tan efectiva y eficientemente como sea posible (Jarvis *et al.*, 2005). Un sistema de información geográfica, puede ser definido como un sistema de manejo de bases de datos que puede utilizar simultáneamente datos espaciales y datos de atributos no espaciales (Guarino *et al.*, 2002). Los factores ambientales como el clima, la topografía, los suelos y factores antropogénicos como puede ser la destrucción del hábitat, dan forma a la estructura genética de las poblaciones en especies cultivadas y silvestres. La diversidad genética no esta distribuida aleatoriamente en la superficie terrestre y conocer dónde se encuentra mejor representada, es un factor clave cuando se considera en los objetivos para esfuerzos de conservación. Sin embargo la diversidad genética es difícil de mapear y analizar (Jarvis *et al.*, 2005).

Identificar el rango geográfico preciso de la distribución de las especies, es también fundamental para localizar y conservar la diversidad genética. Se han dirigido muchos esfuerzos para la predicción de la distribución geográfica de las especies. Típicamente, los métodos utilizan los datos climáticos de los puntos dónde se localizan físicamente las especies, con el objetivo de construir un modelo estadístico de correspondencia entre la distribución climática y la similitud con las condiciones de los sitios. El modelo estadístico, es entonces aplicado a una región más grande para localizar áreas dónde las condiciones ambientales son potencialmente adecuadas para las especies en cuestión. Éstos métodos tienden a minimizar el riesgo de sobreestimar o subestimar el rango de distribución de las especies (Franklin, 1995). Un ejemplo de aplicación para ésta metodología, es el propuesto para la especie *Q. emory* en México (Torres-Meza *et al.*, 2009), dónde se identifica por medio de sistemas de información geográfica y fotointerpretación, que la distribución potencial está asociada a la precipitación y temperatura, de los meses más fríos en la zona central de México.

A pesar de que solo han sido aplicados al nivel de especie, los sistemas de información geográfica, pueden ser adaptados para trabajar a nivel genético, esto es, porque las características ambientales no se distribuyen de forma aleatoria y puede ser posible su asociación con características genéticas (Jarvis *et al.*, 2005). Muchos de estos rangos de

distribución, asumen que las variables climáticas son las principales mediadoras de la distribución geográfica y de la misma forma, se han integrado otro tipo de factores como el tipo de suelo, la topografía y condiciones de hábitat específicas (Franklin, 1995; Guisan y Zimmerman, 2000; Walker y Cocks, 1991). Esto puede ser muy útil para detectar barreras de restricción al flujo genético, patrones de migración y establecimiento de refugios plesistocénicos, entre otras aplicaciones (Jarvis *et al.*, 2005).

Para el género *Quercus*, se han realizado diversos estudios donde se asocia la variabilidad genética y patrones de estructura genética poblacional integrados con atributos espaciales, para identificar refugios ancestrales (Dodd *et al.*, 2006; Austerlitz *et al.*, 2007; Okaura *et al.*, 2007; Marsico *et al.*, 2009), formación de grupos familiares (Streiff *et al.*, 1999; Soto *et al.*, 2007) y modelaje de variación en el flujo génico (Austerlitz y Garnier-Gèrè, 2008), entre otros.

### *Genética de poblaciones y conservación.*

El objetivo central de la conservación es preservar la variación genética y sus procesos evolutivos, localizados en poblaciones viables, de especies ecológicamente importantes, con fines de prevenir su extinción (Soulé y Simberloff, 1986). La fragmentación provoca que una población continua se divida en subunidades pequeñas y aisladas, esto cambia el balance entre deriva génica y flujo génico. Las subunidades pequeñas y aisladas, quedan más sujetas a los efectos de pérdida de alelos por endogamia y deriva génica, comparadas con las subunidades de tamaño poblacional más grande. La pérdida en la diversidad genética representa potencialmente, una reducción en la habilidad de las especies para responder a cambios ambientales a corto y largo plazo (Milligan *et al.*, 1994). Por esto, se considera que el mantenimiento de la diversidad genética es primordial para el mantenimiento a largo plazo de las especies (Frankel y Soulé, 1981).

La fragmentación de los bosques, afecta no solo a los árboles, sino también a los organismos que dependen del bosque para su desarrollo. Por esta razón, su conservación es prioritaria cuando se promueven programas para el mantenimiento de la biodiversidad (Vakkari *et al.*, 2006). Se han generado estudios en donde se evalúan los efectos de la fragmentación en especies arbóreas. En algunas especies, la fragmentación no ha tenido efectos significativos en la pérdida de la diversidad genética, como es el caso de *Caryocar brasiliense* (Collevatti *et al.*, 2001). Sin embargo, en especies como *Pinus strobus*, se encontró, que por cada reducción en 75% del tamaño poblacional, se pierde 26% de la riqueza alélica y entre el 72 y 96 % de los alelos exclusivos de las poblaciones (Rajora *et al.*, 2000). En especies como *Q. robur* en Finlandia, se ha propuesto que una parte de la reducción en la diversidad alélica, es debido a la deforestación tradicional de los bosques desde hace 300 años (Vakkari *et al.*, 2006).

Utilizar la información genética de forma adecuada para definir prioridades de conservación, es uno de los objetivos de la genética de la conservación. Los criterios genéticos pueden ser muy valiosos para determinar la capacidad de respuesta de las poblaciones, para responder adaptativamente ante cambios ambientales y asegurar su mantenimiento durante alto número de generaciones (Petit *et al.*, 1998).

La diversidad alélica es una medida directa de la diversidad genética y está relacionada con el tamaño poblacional. Valores altos de diversidad alélica, implican mayor tamaño efectivo de población, el conteo directo de alelos, representa en sí mismo, el potencial

adaptativo de una población, por esto, es el indicador que puede describir de mejor manera la capacidad de responder ante cambios ambientales (Nei *et al.*, 1975; Petit *et al.*, 1998).

La heterocigosis esperada ( $H_e$ ) y observada ( $H_o$ ) (Nei, 1978), son medidas indirectas de la cantidad de alelos distintos que se pueden encontrar en una población. Con ambas estimaciones, se pueden identificar de manera rápida y efectiva, fenómenos de selección natural sobre genotipos homocigos o heterocigos y patrones reproductivos en las poblaciones como la endogamia o la panmixia (Toro y Caballero, 2005). Mientras mayor sea  $H_o$ , mayor será la diversidad genética, si  $H_e$  y  $H_o$ , son similares entre sí, se asegura que la reproducción entre los individuos es panmíctica, lo cual promueve el mantenimiento genético de la especie a través de las generaciones (Toro y Caballero, 2005).

Cada método para obtener la distancia genética, tiene sus propias virtudes estadísticas, no obstante, lo que se busca identificar con la distancia genética, es el grado de divergencia entre las poblaciones (Toro y Caballero, 2005). Característicamente, se ha observado que el grado de divergencia generacional es proporcional a la distancia genética, sin embargo, ésta correlación solo es proporcional cuando existe un bajo número de generaciones intermedias acumuladas a partir de la divergencia (Kalinowski, 2002). El efecto fundador y la tasa de mutación, pueden modificar la distribución de alelos entre un par de poblaciones, que surgen a partir de una misma población ancestral, por lo que, la distancia genética no es un buen estimador de ancestría entre un grupo de poblaciones (Hedrick, 1999). En términos de conservación, se puede utilizar la distancia genética como un buen estimador para la acumulación de diferencias genéticas producto de adaptaciones locales (Hedrick, 1999).

El coeficiente de ancestría ( $\Theta_{st}$ ) (Weir y Cockherman, 1984) es un buen estimador para medir relaciones de divergencia entre poblaciones. La acumulación de diferencias, es proporcional a la fijación alélica, debida al efecto combinado de la endogamia y deriva génica (Jin y Chakraborty, 1995). Usualmente, se considera priorizar los esfuerzos de conservación, hacia poblaciones con baja estructura genética poblacional, porque de ésta manera se asegura que existan representadas aquellas con el menor aislamiento reproductivo y el mayor equilibrio entre homocigos y heterocigos (Hedrick, 1999).

Otro factor determinante para el establecimiento de prioridades de conservación, es la evaluación del flujo génico, que es la medida indirecta de la cantidad de migrantes que contribuyen al tamaño efectivo de una población. Aquellas poblaciones que guarden mayor flujo génico con el resto de las poblaciones serán las prioritarias a conservarse (Wang, 2005).

Una forma para estimar la relevancia de las poblaciones por su contribución a la diversidad genética, es removiendo del análisis estadístico cada una de ellas y estimar nuevamente, tanto la diversidad como la distribución de los alelos, esta es una poderosa herramienta, ya que mediante éste modelo teórico se pueden establecer las prioridades para la conservación (Petit *et al.*, 1998).

Los criterios para el establecimiento de prioridades de conservación, utilizando caracteres genéticos, son muy valiosos y están provistos de un fuerte fundamento estadístico, sin embargo, solo son uno más de los criterios a considerar en el gran campo de la conservación. De forma alternativa se pueden identificar a las poblaciones que se mantengan a largo plazo y conserven su potencial evolutivo mediante un modelo teórico que combine datos genéticos y demográficos (Lande, 1988; Eding *et al.* 2002).

### *Problemática ambiental en la Sierra Fría de Aguascalientes.*

La Sierra Fría de Aguascalientes, se encuentra formada por un macizo de bosque de encino-pino rodeado de pastizales naturales y está considerada como el principal proveedor de servicios ambientales para el noroeste del estado de Aguascalientes, la zona fue declarada en 1995 como zona sujeta a conservación ecológica (ZSCE) y está denominada por la CONABIO como una de las 153 regiones terrestres prioritarias (RTP). Tiene una extensión territorial de 112 090 ha, de las cuales de manera aproximada, el 64% es propiedad privada, 23% ejidal y 13% comunal (SEDESOS, 1993). Desde su declaración hasta el momento, se ha perdido alrededor del 37% de la cobertura de la vegetación original (Arriaga *et al.*, 2000).

Estos bosques desempeñan múltiples funciones en el estado, ya que por ejemplo sostienen el mayor reservorio de flora y fauna de la entidad y favorecen además, la captación de agua, con lo que se previene la desecación de pozos y presas (SEDESOS, 1993).

En Sierra Fría, Aguascalientes los encinos estuvieron sujetos a intensas explotaciones forestales hasta las décadas de 1920 a 1950 y a la ganadería extensiva durante la segunda mitad del siglo XX (SEDESOS 1993; Minnich *et al.*, 1994). Existen diversas áreas en Sierra Fría con graves problemas de erosión, en donde los bosques presentan severos disturbios. Fotografías aéreas tomadas en 1942 muestran grandes claros en los bosques de encinos producto de la explotación forestal. Sin embargo, fotografías tomadas en décadas posteriores mostraron una regeneración de los bosques de encinos en Sierra Fría, que sugiere una aparente recuperación, al menos parcial de los bosques (Minnich *et al.*, 1994; Chapa-Bezanilla *et al.*, 2008), estos datos concuerdan con lo obtenido por Alfonso-Corrado y colaboradores (2007), quienes sugieren que las poblaciones de dos especies encinos (*Quercus eduardii* y *Q. potosina*) se encuentran demográficamente estables.

En los últimos años se ha observado una alta mortalidad de árboles de encino. Estos daños están asociados a diversos patógenos como son hongos, nemátodos e insectos siendo las especies más afectadas *Quercus rugosa* y *Q. potosina*, la especie *Q. grisea* es la que presenta menor magnitud en daño (Romo-Díaz *et al.*, 2007).

Las especies *Q. eduardii*, *Q. potosina*, *Q. grisea*, *Q. resinosa* y *Q. sideroxylla* juegan un papel ecológico regional relevante en el estado de Aguascalientes, debido a que estas

especies, representan el 90% de los bosques templados del estado (SEDES0, 1993; De la Cerda, 1999). En la actualidad, estas especies son utilizadas por la poblaci3n local, para obtener leña y carb3n, adem1s de ser utilizadas para la construcci3n de postes y como uso ornamental. Sin embargo, la falta de estudios ecol3gicos formales que evalúen el efecto de los disturbios antropogénicos en poblaciones de encinos, limita nuestra compresi3n del comportamiento biol3gico de estas especies e impide establecer las estrategias de conservaci3n, restauraci3n y/o manejo adecuadas en los bosques de encinos.

Actualmente las principales actividades antropogénicas que se llevan a cabo en la Sierra Fría, son la ganadería extensiva y la agricultura de temporal y en los últimos años se ha desarrollado el campismo, ecoturismo y turismo cinegético, para lo que se ha recurrido a la delimitaci3n de áreas por cercas de alambre para llevar a cabo actividades de propagaci3n de guajolote silvestre (*Meleagris gallopavo mexicana*) y venado cola blanca (*Odocoileus virginianus*), se permite la cacería de jabalí de collar (*Tayassu tajacu*), de coyote (*Canis latrans*), conejo (*Sylvilagus floridanus*), paloma (*Zenaida asiatica*) y codorníz (*Cyrtonyx montezumae*). Adem1s se ha propiciado la introducci3n de especies ex3ticas como el ciervo rojo (*Cervus elaphus*), faisán de collar (*Phasianus colchicus*) y la perdiz chukar (*Alectoris chukar*) (Márquez-Olivas *et al.*, 2007).

En el municipio de San José de Gracia, aunque existen pequeñas zonas conservadas de terrenos particulares en condiciones excelentes, la mayor parte del bosque representa áreas desmontadas ocupadas por pastizales o con grandes problemas de erosi3n y aunado a esto, la p3rdida de árboles por la presencia de plagas en encinos y pinos (De la Cerda, 1999).

En la Sierra Fría de Aguascalientes, *Quercus grisea* se distribuye principalmente en mesetas, cuyas superficies son utilizadas para la ganadería intensiva, en dónde se realiza el desmonte como práctica común para la generaci3n de zonas de pastoreo, se ha detectado que éstas áreas son las más susceptibles al cambio de uso de suelo (Chapa-Bezanilla *et al.*, 2008). Esto puede resultar en patrones diferenciales de estructura genética poblacional debido a la p3rdida de individuos dentro de las poblaciones. El estudio genético de *Q. grisea*, puede contribuir a entender los patrones de dispersi3n que ocurren en la zona y de la misma forma se podría contribuir a identificar zonas de conservaci3n para su rango de distribuci3n en la Sierra Fría de Aguascalientes.

### *Marcadores moleculares.*

La variabilidad genética es evaluada mediante el uso de marcadores moleculares. Para que un marcador molecular sea efectivo se debe considerar lo siguiente: (1) los marcadores utilizados no deben estar ligados es decir, que se hereden de forma independiente; (2) cada marcador debe ser específico para un solo locus, de preferencia uno que esté caracterizado en el cromosoma; (3) el marcador debe detectar un número alto de alelos de manera constante y (4) se deben crear patrones de bandeo en geles que sean fácilmente interpretables (Eguiarte *et al.*, 2007). Los marcadores más utilizados son los microsatélites, que son una serie de repeticiones de un solo arreglo compuesto de 1 a 6 bases (Hancock, 1998), son marcadores en los que se pueden observar alelos biparentales (codominantes), altamente polimórficos, densamente distribuidos en el genoma de los organismos eucariontes (Kashi y Soller, 1998), generan alta información y son lo suficientemente específicos para diferenciar individuos dentro de una población. Recientemente se han encontrado microsatélites en algunos organelos citoplasmáticos, como el cloroplasto y la mitocondria lo que ha enriquecido diversos estudios evolutivos, ya que estos organelos son heredados uniparentalmente y no están sujetos a recombinación, por lo que los cambios acumulados que observamos en las poblaciones se deben sólo a los procesos de mutación (Hancock, 1998).

Los microsatélites nucleares han tomado ventaja sobre otros marcadores genéticos como los Fragmentos Amplificados de Polimorfismos Largos, Amplificaciones Aleatorias de Polimorfismos de ADN, Fragmentos de Restricción de Polimorfismos Largos (de sus siglas en inglés AFLP's, RAPDs, RFLPs, respectivamente), debido a que: i) tienen alto grado de polimorfismo; ii) son codominantes; iii) la presencia de un solo locus genético por microsatélite hace que la lectura de las bandas sea clara y fácil de interpretar y iv) son selectivamente neutros (Hancock, 1998).

Los microsatélites o también llamados secuencias sencillas repetidas (SSRs) representan un tipo único de secuencias alineadas en tándem muy abundantes dentro del genoma y que pueden identificar altos niveles de variabilidad de polimorfismos. Esta característica provee el fundamento para su aplicación en campos como la medicina y la biología, que incluye la genética de poblaciones y de la conservación. Los microsatélites son considerados marcadores neutros, aunque también pueden estar presentes en características funcionales. Se les han atribuido funciones tales como estabilidad de ADN, recombinación de ADN y dinámica del ciclo celular (Chistiakov *et al.*, 2006).

El factor clave para su uso como marcadores moleculares es su alta tasa de mutación y por lo tanto, su hipervariabilidad entre especies, poblaciones e individuos. El rango de mutación está estimado entre  $10^{-2} - 10^{-6}$  por locus por generación (Ellegren, 2000), que es varias veces más alta que una secuencia de ADN no repetitiva (Li, 1997). Por este motivo han sido ampliamente utilizados para resolver situaciones de parentesco, flujo génico, variabilidad genética, filogeografía y genética de conservación (Chistiakov *et al.*, 2006).

Dados los procesos históricos de reducción de los bosques en la Sierra Fría de Aguascalientes, que pueden promover pérdida de diversidad genética y aislamiento reproductivo entre las poblaciones de encinos y siendo *Q. grisea* una de las especies más representativas en la zona. Es primordial reconocer en términos genéticos, el estado de conservación en el que se encuentran sus poblaciones, mediante la evaluación de la variabilidad genética, las distancias genéticas y el flujo génico, para identificar aquellas que por sus características, son prioritarias para la conservación ecológica. El entender los patrones de variabilidad y distribución alélica, permitirá de la misma forma, reconocer características de la especie como el tipo de reproducción y la capacidad de dispersión de *Q. grisea* en la Sierra Fría de Aguascalientes.

### *Hipótesis*

Por ser los encinos plantas polinizadas por viento, con ciclos de vida largos y siendo *Q. grisea* una especie abundante en la zona, se espera encontrar un nivel alto de diversidad genética en términos de riqueza alélica, se espera también encontrar niveles altos de flujo génico entre los sitios de muestreo cercanos entre sí, sin patrones de estructura genética poblacional asociados.

## OBJETIVOS

### Objetivo general

Determinar el nivel de variabilidad genética de la especie *Quercus grisea* en la Sierra Fría de Aguascalientes.

### Objetivos particulares

Estimar el nivel de variabilidad genética a lo largo de la distribución de *Q. grisea* en la Sierra Fría de Aguascalientes, mediante el uso de marcadores genéticos nucleares tipo microsatélites.

Identificar el patrón de flujo génico de *Q. grisea* en la Sierra Fría de Aguascalientes.

Identificar si existe un patrón de estructura genética poblacional a lo largo de la distribución de *Q. grisea* en la Sierra Fría de Aguascalientes.

Identificar si existe un patrón de asociación entre las diferencias genéticas y la distribución geográfica de las poblaciones de *Q. grisea* en la Sierra Fría de Aguascalientes.

Identificar en términos genéticos, cuáles son los sitios más importantes para la conservación ecológica.

## MATERIAL Y MÉTODOS.

### *Descripción del sitio de estudio.*

La Sierra Fría se localiza al noroeste del estado de Aguascalientes, entre los 21° 52' 50'' y 22° 19' 46'' N y 102° 22' 50'' y 102° 51' 26'' O. La zona está compuesta por dos tipos de vegetación principales, el bosque de encino-pino y el pastizal, el bosque de encino-pino cubre alrededor del 64% de la cobertura vegetal del área (Márquez-Olivas *et al.*, 2002). Tiene una extensión territorial de 112 090 ha (SEDESOS, 1993). La Sierra Fría de Aguascalientes forma parte de la Sierra Madre Occidental; sin embargo, se encuentra aislada de esta cordillera por una región seca que caracteriza la zona de transición entre las provincias fisiográficas de la Mesa Central y del Norte (INEGI, 1981). La fisiografía es escarpada. Los climas semiseco semicálido, semiseco-templado y templado-subhúmedo, predominan en la región. La temperatura media anual es de 17°C y la precipitación promedio de 600 mm; enero es el mes más frío y julio el más cálido, mientras que marzo es más seco y julio el más húmedo. La mayor parte de los suelos son someros y con afloramiento rocoso, de color gris rojizo y gris oscuro, con texturas franco arcillosas. (SEDESOS, 1993).

Como parte de la biota de la Sierra Fría de Aguascalientes se han identificado 591 especies vegetales terrestres y 37 acuáticas o subacuáticas, además de 95 especies de hongos. Se cuenta con un registro de 228 especies de vertebrados de las cuales el 47.8% son aves, 38.1% son mamíferos y 14% de reptiles y anfibios, se han identificado 13 ordenes de insectos representados en 65 familias (SEDESOS, 1993).

Las especies más abundantes son *Quercus resinosa* Liebm., *Q. potosina* Trel., *Q. eduardii* Trel., *Q. laeta*, *Q. grisea* Liebm., *Q. sideroxyla* Humb. et Bonpl. y *Q. rugosa* Nee., y las menos conspicuas *Q. chihuahuensis* Trel., *Q. aristata* Hook. et Arn., *Q. coccolobifolia* Trel., *Q. microphylla* Nee., *Q. uxoris* McVaugh, *Q. gentryi* C.H. Muller y *Q. laurina* Humb. et Bonpl. Los pinares ocupan menos del 1% de los bosques templados de la región y por lo general se encuentran en algunas cañadas y en las partes altas de la Sierra; las especies más comunes son *Pinus lumholtzii* Rob. et Fern., *P. leiophylla* [Schl. et Cham.] var. *chihuahuana* Shaw. y *P. teocote* Schl. et Cham., y las menos frecuentes *P. michoacana* var. *cornuta* Mtz., *P. durangensis* Mtz. y *P. cembroides* Zucc. (SEDESOS, 1993). Otros árboles y arbustos comunes en Sierra Fría

son el táscate (*Juniperus deppeana* Steud.) y la manzanita (*Arctostaphylos pungens* HBK.) (Márquez- Olivas *et al.*, 2007).

*Descripción de la especie.*

*Quercus grisea* Liebm. (Figura 1), pertenece al género *Quercus*, subgénero *Quercus* sección *Quercus* (encinos blancos) (Valencia-Ávalos, 2004).

*Quercus grisea*. Liebm. Overs. Dansk Vidensk, Selks. Forhandl 1854. Mc Vaugh, R. Flora of Novo Galicia. Contr. Univ. Mich. Herb. 12: 1, 3 p 48 1974. Árbol bajo de 4 a 7 m de alto con un tronco corto de 10 a 30 cm de diámetro, corteza gris claro y follaje verde grisáceo tomentoso; ramillas de 1 a 2 mm de grueso persistiendo el tomento de 2 a 3 años, la corteza de las ramillas áspera café oscuro a negro con lenticelas poco notables, yemas redondeado-ovoides de 2 mm de longitud, café, las escamas ciliadas, estípulas subuladas de 3 a 6 mm de longitud pilosas deciduas; hojas generalmente deciduas, algunas persistentes hasta la siguiente estación gruesas de 2 a 8 cm de largo y de 1.5 a 4.5 cm de ancho, oblongo-elípticas a ovadas y agudas a cortamente mucronadas, obtusas o redondeadas en el ápice, redondeadas a subcordadas en la base casi planas, el margen no o escasamente revoluto, poco engrosado entero, rara vez presentan algunos dientes cortos arriba en la mitad de la hoja; venas 6 a 10 de cada lado muy ramificadas; superficie superior de la hoja algunas veces lustrosa pero generalmente cubierta por abundantes pelos estrellados con ramas sobrepuestas, las venas poco impresas, las venillas poco macadas, superficie inferior permanente y cerradamente tomentosas cubriendo totalmente la superficie con pelos estrellados sésiles de diferentes tamaños, peciolo 2-10 mm de longitud y de 1mm de grueso o menos, tomentoso; amentos estaminados 2-7 cm de longitud con pocas flores, pilosos, las anteras glabras de 1 a 1.2 mm de longitud; flores pistiladas 1 a 8 dispuestas a lo largo de un pedúnculo tomentoso; fruto anual solitario o en pares desarrollándose muy en la base del pedúnculo; copa de 8 a 15 mm de ancho y 4 a 10 mm de alto hemisférica redondeada en la base, las escamas inferiores engrosadas en sus bases, pálido tomentosas, las puntas delgadas café rojizas y esparcidamente pubescentes, las escamas superiores elongadas obtusas y ciliado algodonosas; bellota ovoide o elipsoide de 12 a 18 mm de longitud, 8 a 12 mm de grueso, café claro, incluida en la copa.

Se distribuye en Estados Unidos desde Texas, Nuevo México y Arizona (De la Cerda, 1999) y en México en los estados de Aguascalientes, Chihuahua, Coahuila, Durango,

Guanajuato, Jalisco, Nuevo León, San Luis Potosí, Sonora, Veracruz y Zacatecas en altitudes desde los 1500 hasta los 2200 m s.n.m. (Valencia-Ávalos, 2004).

Particularmente en el Estado de Aguascalientes se distribuye en los municipios de Calvillo y San José de Gracia (De la Cerda, 1999), siendo éste último parte de la Sierra Fría de Aguascalientes. Este encino se encuentra formando grupos de árboles aislados, con pastizales mezclados con *Juniperus deppeana* en el municipio de San José de Gracia dónde se encuentra en mayor abundancia (De la Cerda, 1999).

En la Sierra Fría de Aguascalientes, *Q. grisea* tiene bastante semejanza con algunos individuos de *Q. chihuahuensis* los cuales, presentan las hojas con bordes enteros, por lo que se sugiere que posiblemente hay una hibridación entre *Q. grisea* y *Q. chihuahuensis* (De la Cerda, 1999).

Se han realizado estudios en Nuevo México y Arizona que involucran la capacidad de hibridación entre los encinos blancos *Q. grisea* y *Q. gambelli* y se ha propuesto que tanto la variación en los caracteres genéticos (tipo RAPD), como en morfológicos, corresponden a una hibridación (Boecklen y Howard, 1997).

**Figura 1.** Ilustración\* e imagen de *Quercus grisea*.



\* Ilustración realizada por Adriana Bernal y Enrique Gil.

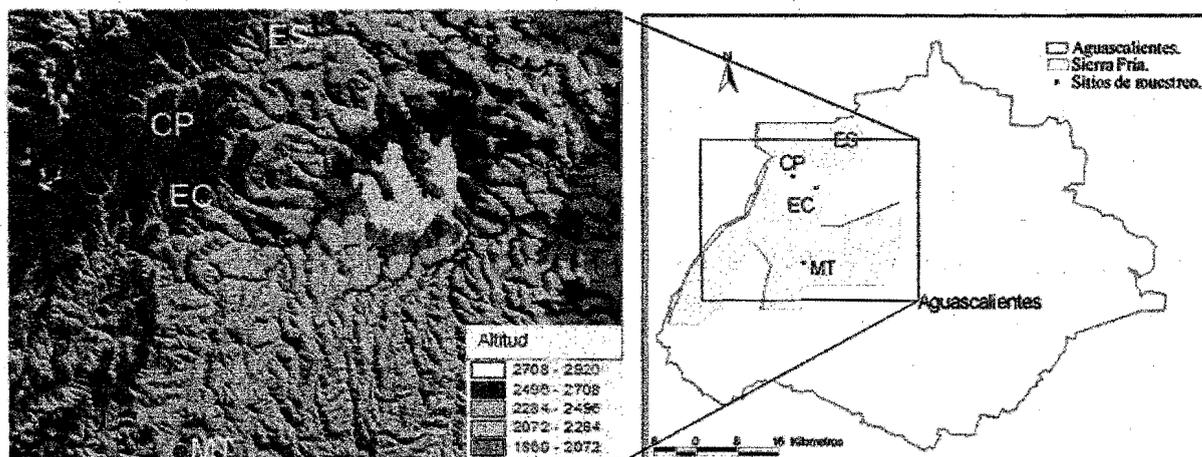
### Colecta.

Durante el periodo de mayo a junio del 2007 fueron colectadas hojas frescas de 84 individuos de *Q. grisea* de cuatro sitios de la Sierra Fría de Aguascalientes denominados “Rancho el Cepo” (CP), “Entrada a la Congoja” (EC), “Mesa el Sapo” (ES) y “Mesa Montoro” (MT), se colectaron al menos 20 individuos por sitio. La descripción de los sitios y los individuos incluidos se muestran en la cuadro 2. La localización geográfica de los sitios se muestra en la figura 2.

**Cuadro 2.** Descripción de sitios de colecta.

Sitio	Clave	Latitud N	Longitud O	Altura	Especie asociada	Descripción	No ind
El Cepo	CP	22° 11' 06.9"	102° 35' 46.9"	2568	<i>Q. eduardii</i> y <i>Q. potosina.</i>	Bosque de encino poco perturbado dentro de rancho cinegético.	23
Entrada a Congoja	EC	22° 9' 39.4"	102° 32' 58.2"	2501	<i>Juniperus deppeana</i>	Potrero en planicie	20
Mesa el Sapo	ES	22° 14' 44.2"	102° 29' 31.4"	2446	<i>Q. potosina.</i>	Encinar con planicies, perturbado por ganadería.	21
Mesa Montoro	MT	22° 00' 26.1"	102° 34' 25.6"	2344	<i>Q. potosina</i> y <i>Q. eduardii</i>	Planicie con poco nivel. Sitio dedicado a la ganadería.	20

**Figura 2.** Ubicación geográfica de los sitios de muestreo.



Los sitios fueron referenciados por un sistema GPS Etrex con el Datum NAD 27 y proyectados en el Programa Arc View GIS v. 3.1 (ESRI, 1992-1998) de esta forma se calcularon las distancias geográficas pareadas entre los sitios.

#### *Análisis genético.*

Extracción de ácidos nucleicos.

El ADN fue extraído de 84 individuos mediante el protocolo DNeasy Plant Kit de QUIAGEN. El protocolo de extracción se muestra en el apéndice I. Se realizó la electroforesis en geles de agarosa en medio TBE 0.5 X + BrET (0.005mg/ml) durante 40 min a 110 V. Los geles fueron visualizados mediante luz UV en un equipo Alpha Imager con la aplicación Alpha EASE v 6.0.0 (Alpha Innotech Corporation, 1993-2006).

#### *Estandarización de amplificación de fragmentos tipo microsatélites.*

Fue seleccionado un individuo de cada sitio de muestreo para un total de 4 individuos como controles de estandarización y ubicado un control positivo de *Q. sideroxylla*.

Para la serie de primers *quru* GA (Aldrich *et al.*, 2002) se utilizaron alícuotas marcadas con el fluoroforo HEX para los primers *quru* GA OC19, *quru* GA 1F02, *quru* GA OC11, *quru* GA OE09 y *quru* GA 2M04. Con este tipo de iniciadores (cebadores, primers) se pueden analizar los fragmentos en sistema de secuenciación sin la necesidad de realizar geles de acrilamida. Las temperaturas de alineamiento (T<sup>o</sup>m) utilizadas corresponden a la referencia original de Aldrich y colaboradores (2002).

Las reacciones se llevaron a un volumen de 25 µl, 1X taq Buffer, 4 mmol dNTPs, 4 mMol MgCl<sub>2</sub>, 0.0001ug/L de BSA, aproximadamente 10 ng de ADN, 1 ul de Taq polimerasa y 0.72 nm de cada primer en dirección del sentido (F) y antisentido (R). La amplificación se llevó a cabo en un Termociclador Gene Amp PCR System 9700 programado a 94°C 3 min, 94°C 10 seg (desnaturalización), T<sub>m</sub>° C 10 seg (alineación), 72° C 10 seg (extensión) X 30 ciclos y 72° C 3 min (amplificación complementaria). Los productos se analizaron en geles de agarosa al 1.2 % a 80 V corridos durante 40 min y visualizados con bromuro de etidio (BrET) expuesto a luz UV, utilizando como referencia el marcador 100 pb de Invitrogen. Los resultados de las amplificaciones preliminares se muestran en el cuadro 3.

**Cuadro 3.** Amplificación de productos para microsatélites para la serie *quru* GA. T<sub>m</sub> temperatura de alineamiento, + amplificación positiva, - sin amplificación.

<i>quru</i> GA	Secuencia 5'-3'	T <sub>m</sub>	QGCP01	QGEC01	QGES01	QGMT02
OC19	F: TTAGCTTTTACGCAGTGTCG R: CGGCTTCGGTTTCGTC	50	+	+	+	+
1F02	F: CCAATCCACCCTTCCAAGTTCC R: TGGTTGTTTTGCTTTATTTCAGCC	50	+	+	+	+
OC11	F: ATACCCAGCTCCCATGACCA R: TCCCCAAATTCAGGTAGTGT	53	+	+	+	+
OE09	F: TGCCATCCCTATACACAACCA R: CCTCCATCACAAAGTTGCC	53	-	-	-	-
2MO4	F: GGAGAGGACGGGATGCC R: TACTATGTCAGCCGGATG	56	-	+	-	-

Por su reproducibilidad, la factibilidad para amplificar los fragmentos y la identificación de polimorfismos, fueron seleccionados para el estudio los primers 1F02, OC19 y OC11 de la serie *quru* AG (Aldrich *et al.*, 2002). La amplificación se llevó a cabo de acuerdo a las condiciones de reacción ya mencionadas.

Los productos de amplificación de la especie *Q. grisea* fueron diluidos en relación 1/40 w/w, se agregó a la mezcla 1 µl de la dilución del producto amplificado, 9.75 µl de HiDi Formamide y 0.25 µl de ROX-500 o Rox400, la mezcla fue analizada en un equipo ABI Prism 3700 de Applied Biosystems por el método de análisis de fragmentos. Una vez obtenidos los electroferogramas, se identificó el tamaño de cada uno de los fragmentos mediante el programa Gene Scan Analyzer de Applied Biosystems. Posteriormente, se procedió a genotipificar cada uno de los individuos y los genotipos fueron integrados en una matriz básica de datos de tipo codominante para su análisis genético.

#### *Número de alelos.*

Se identificaron la cantidad de alelos exclusivos (E) y la cantidad de alelos observados (O) por sitio de muestreo, así como la cantidad de alelos totales por locus, esto fue realizado mediante la aplicación “exact test” del programa TFGA (Miller, 1997) con 10,000 permutaciones. Con el fin de identificar asociaciones cualitativas de alelos compartidos entre los sitios de muestreo y establecer criterios de referencia para el movimiento genético, fueron determinados agrupamientos de 2, 3 y 4 sitios de muestreo.

### *Diversidad genética.*

Se calculó la diversidad genética (Nei, 1978) para cada uno de los loci que es equivalente a la heterocigosis esperada ( $H_e$ ) y se define como la probabilidad de encontrar en un par de alelos tomados al azar, dos genes no idénticos. Mientras mayor sea el índice, indica un mayor número de alelos en frecuencias más similares.

mediante la fórmula:

$$\hat{H} = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2\right)$$

donde:

$\hat{H}$  = Índice de diversidad genética.

$n$  = número de individuos.

$p_i$  = la frecuencia del alelo  $i$  para cada uno de los locus.

$k$  = número de locus analizados.

La estimación de la heterocigosis observada ( $H_o$ ), se realizó mediante la cuenta directa de los individuos heterocigos dividida por el total de individuos analizados y se calculó por locus, sitio de muestreo y por todos los sitios. La heterocigosis esperada ( $H_e$ ) se estima a partir de la sumatoria de las frecuencias obtenidas para cada uno de los alelos bajo la suposición de estar en equilibrio Hardy-Weimberg en una población o especie. Si  $H_o$  es mayor que  $H_e$ , existe exceso de heterocigos y existe un fenómeno de selección direccional a favor de los mismos, si  $H_e$  es mayor que  $H_o$  hay deficiencia de heterocigos y está asociado a fenómenos de endogamia. Si son similares entre sí, las poblaciones están en equilibrio. Ambos índices fueron estimados por el programa TFPGA (Miller, 1997) y ARLEQUIN (Excoffier *et al.*, 2005), con ambos programas se obtuvieron resultados idénticos para ambos parámetros.

Para identificar si la proporción de heterocigotos se encuentra en equilibrio Hardy-Weimberg se realizó una prueba de Chi cuadrada ( $X^2$ ) con los valores de  $H_o$  y  $H_e$  por sitio de muestreo, si el valor crítico es mayor que el observado se acepta la hipótesis nula, que en éste caso es el equilibrio Hardy-Weimberg.

El valor observado  $(X)^2$  se obtuvo de la forma:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c \frac{(A_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}}$$

donde:

$\chi^2$  = Valor observado.

$A_{ij}$  = frecuencia real en la i-ésima fila, j-ésima columna

$E_{ij}$  = frecuencia esperada en la i-ésima fila, j-ésima columna

r = número de filas

c = número de columnas

Para obtener el valor crítico se consultaron tablas de distribución Chi cuadrada con 3 grados de libertad y p de 0.05, para el cual se identificó un valor de 7.815.

#### *Estructura genética poblacional.*

Para estimar la estructura genética poblacional, fueron estimados los coeficientes de fijación F ( $F_{ST}$ ,  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$ ) propuestos por Wright (1943) y modificados por Nei (1978).

El coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) es una medida de la desviación de las frecuencias genotípicas de las esperadas por panmixia en términos de deficiencia o exceso de heterocigos.  $F_{IS}$  puede tener valores negativos y varía en un rango entre -1 y 1. Valores cercanos a -1 indican que todos los individuos son heterocigos, valores cercanos a 1 indican que todos los individuos son homocigos y valores cercanos a 0 indican que las poblaciones están en equilibrio Hardy-Weimberg (Wright, 1943).

El coeficiente de coancestría ( $F_{ST}$ ) es una medida del efecto de la subdivisión de las poblaciones, representa reducción en la heterocigosis debido a la deriva genética. Se define como la probabilidad de asociación de gametos idénticos dentro de las subpoblaciones con respecto al sorteo aleatorio de gametos de toda la población (Wright, 1943). Es el estimador más ampliamente utilizado para definir la estructura genética de las poblaciones ya que mide el grado de divergencia entre las subpoblaciones.  $F_{ST}$  solo tiene valores positivos, valores cercanos a 0 indican identidad

genética entre las subpoblaciones, valores cercanos a 1 indican completa diferenciación entre las subpoblaciones.

El coeficiente de endogamia total ( $F_{IT}$ ). Representa la reducción promedio en la heterocigosis provocada por un individuo relativo al total de la población (Wright, 1945). También puede interpretarse como la contribución en la heterocigosis promedio de cada uno de los individuos al interior de las poblaciones.

Para calcular los porcentajes de variación debido a la fuente de variación entre las poblaciones (extensión de  $F_{ST}$ ), entre los individuos dentro de las poblaciones (extensión de  $F_{IS}$ ) y entre los individuos (extensión de  $F_{IT}$ ) fue generado un análisis molecular de varianzas (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992). Cada una de las fuentes de variación representa la contribución en la variación, relacionada con el nivel de jerarquía en términos de varianzas. Valores altos en el porcentaje de variación entre las poblaciones indican alto grado de diferenciación en la especie, valores altos entre los individuos dentro de las poblaciones indican la diferenciación promedio de cada uno de los subgrupos y valores altos dentro de los individuos indican bajo grado de diferenciación.

Los cálculos de  $F_{ST}$ ,  $F_{IS}$ ,  $F_{IT}$  y AMOVA fueron generados mediante aplicaciones del programa ARLEQUIN ver 3.1 (Excoffier *et al.*, 2005).

Para estimar la estructura genética poblacional se utilizó estimador el de ancestría ( $\Theta_{st}$ ) (Weir y Cockherman, 1982) en donde valores cercanos a cero reflejan similitud entre las poblaciones y valores cercanos a uno implican completa diferenciación y procesos de estructura genética poblacional. Para estimar la diferenciación entre las poblaciones se utilizó la  $\Theta_{st}$  pareada entre los sitios de muestreo. Ambos parámetros se estimaron con aplicaciones del programa TFPGA (Miller, 1997).

#### *Distancia genética.*

Para calcular la distancia genética pareada entre sitios de muestreo fue utilizado el algoritmo propuesto por Nei en 1978, el cual utiliza una matriz numérica para calcular la similitud entre las poblaciones, valores cercanos a 1 indican completa disimilitud entre las poblaciones, valores cercanos a 0 indican alta similitud.

De manera alternativa se calculó la distancia genética propuesta por Cavalli-Sforza y Edwards (1967). Este método estima las diferencias entre los sitios de muestreo de forma geométrica a partir de las frecuencias alélicas compartidas en datos pareados. Es

una estimación de la divergencia en la distribución de las frecuencias alélicas individuales. Valores cercanos a 1 reflejan divergencia entre las poblaciones y valores cercanos a 0 expresan identidad. Este parámetro fue calculado mediante una aplicación del programa GENETIX (Belkhir *et al.*, 1996-2002).

#### *Flujo génico.*

Para estimar el flujo génico ( $Nem$ ) se utilizó el valor de ancestría ( $\Theta_{st}$ ) pareado entre los sitios de muestreo mediante la fórmula.

$$Nem = \left( \frac{1}{4a} \right) \left( \frac{1}{\Theta_{st}} - 1 \right)$$

dónde:

$Nem$ : número de migrantes por generación.

$a = \left( \frac{n}{n-1} \right)$  para 3 ó más poblaciones ( $a=1$  para dos poblaciones)  $n$ = número de poblaciones.

#### *Modelaje de estabilidad genética.*

A partir de los datos de la heterocigocis observada ( $H_o$ ) para cada uno de los sitios de muestreo, a manera de propuesta, fue generado un modelo de estabilidad genética para determinar el número teórico de generaciones al que se mantienen los sitios con la presencia tanto de homócigos como de heterócigos. El valor del número de generaciones fue calculado mediante la aplicación “population structure” del programa POPULUS ver 5.3. (Alstad, 2001). Este programa supone que los alelos se heredan de forma mendeliana, existe reproducción panmíctica, con generaciones discretas, en equilibrio Hardy-Weimberg, el tamaño efectivo de la población es constante y el sorteo aleatorio de alelos es una función de la frecuencia inicial de un alelo en un sistema de un locus dos alelos. Así entonces la frecuencia inicial de un alelo  $p$ , tendrá para la siguiente generación una frecuencia  $p + \frac{1}{2} pq$ . Si la frecuencia inicial de  $p$  está en equilibrio Hardy-Weimberg entonces el alelo se mantendrá de manera constante a través de las generaciones con la misma frecuencia inicial. Si la frecuencia inicial no está en equilibrio, entonces el alelo tenderá a fijarse a través de las generaciones o a perderse

por deriva genética. El programa también contempla que entre las poblaciones puede haber migración, así entonces la frecuencia inicial del alelo  $p$  será variable por el aporte en  $p$  de otras poblaciones, con frecuencias iniciales diferenciales del mismo alelo, mediadas por la magnitud de la tasa de migración.

El sistema utilizado para microsatélites es un sistema multilocus, esto dificulta el ingreso de datos a la aplicación “population structure”, por lo que se propone la integración del complemento de la heterocigosis observada ( $H_o$ ) de la forma “ $1-H_o$ ” como un análogo a la frecuencia inicial de  $p$ . La interpretación de los datos será entonces redireccionada ya que la desviación hacia el valor nulo implicará la pérdida total de individuos homocigotos y con esto, la desviación hacia la presencia solamente de individuos heterocigotos en cada sitio. Inversamente, si la desviación es hacia el valor 1, entonces en los sitios se encontrarán solamente individuos homocigotos. Si bien las poblaciones pueden desviarse a la fijación completa o a la pérdida de heterocigos, el modelo representa la estabilidad generacional a partir de datos genéticos.

Los datos de ingreso ( $1-H_o$ ) para la aplicación “population structure” del programa POPULUS ver 5.1 (Alstad, 2001), fueron para: CP 0.2029, EC 0.3579, ES 0.3333 y MT 0.2926. Se generaron 10 permutaciones en cada generación para obtener el promedio del sorteo aleatorio por generación. No fue contemplado el flujo génico entre los sitios de muestreo para identificar el comportamiento de la estabilidad genética de los sitios de forma independiente.

#### *Análisis espacial.*

Los datos de los sitios georreferenciados fueron integrados al programa ARC View ver 3.1 (ESRI, 1992-1998), donde se calculó la distancia geográfica en kilómetros y se generó una matriz de distancias para sitios pareados.

Se obtuvieron modelos digitales de elevación de INEGI escala 1:50,000 con resolución en cuadrícula de 50 x 50 m para las hojas F13B77, F13B78, F13B87, F13B88, F13D17 y F13D18 que comprenden toda el área de la Sierra Fría de Aguascalientes. Los modelos fueron integrados al programa Arc View 3.1 (ESRI, 1992-1998) donde se fusionaron las hojas y convirtieron a código ASCII para su uso posterior en ANUCLIM (Houlder *et al.*, 2003).

Del modelo digital de elevación se elaboró un perfil topográfico entre los sitios pareados registrando la altitud cada 500 m, en una línea recta de un sitio de muestreo (A) a otro (B), partiendo en dirección Oeste a Este. A partir de este perfil fue calculado, a manera de propuesta un índice de variación topográfica media (IVTM).

$$IVTM_{AB} = \ln \sqrt{\sum_{i=1}^k (DGM_{AB} - A_i)^2}$$

Dónde:

$IVTM_{AB}$  = índice de variación topográfica media entre los puntos A y B.

$DGM_{AB}$  = (altura del punto A + altura del punto B)/2

$A_i$  = Altura del punto  $i$  en el perfil topográfico.

$k$  = número de puntos en perfil topográfico.

Con este índice se pretende integrar a un modelo geográfico, la variación topográfica que existe entre dos puntos geográficos, a mayor irregularidad en el terreno habrá un índice mayor de variación. El IVTM tiene una asociación indirecta con la distancia geográfica, ya que a mayor cantidad de puntos, habrá una acumulación mayor de variaciones para terrenos irregulares. El fin de generar el presente índice, es establecer una correlación entre la acumulación de accidentes topográficos y la distancia genética para un par de sitios.

#### *Correlación de distancia genética*

Para identificar la correlación entre la distancia genética (Nei, 1978) y las estimaciones de distancia geográfica e IVTM, fueron realizadas pruebas de Mantel (1967). En la prueba de Mantel se identifica la correlación que existe entre dos matrices simétricas y devuelve el valor del coeficiente de correlación de Pearson, en donde valores cercanos a 1 reflejan completa dependencia, valores cercanos a 0 son independientes y valores cercanos a -1 indican dependencia inversamente poblacional. El valor de significancia ( $\alpha$ ) es el error estadístico, el p-valor es la probabilidad de equivocarse al rechazar la hipótesis nula. Si p-valor es mayor a  $\alpha$ , entonces se acepta la hipótesis nula, que para este caso, es la independencia entre variables.

### *Análisis de correlación por sitio de estudio*

Para identificar patrones de asociación entre la distancia genética (Nei 78) con los parámetros IVTM o distancia geográfica, para cada uno de los sitios de muestreo, se incluyeron solamente los datos pareados que establece de forma exclusiva un sitio con respecto a los tres restantes, para los tres parámetros. Para realizar una asociación más precisa, se calculó el logaritmo natural de la distancia geográfica entre los sitios, como lo proponen Guillemín y su grupo de colaboradores (2008). La correlación entre los datos obtenidos para la distancia genética (Nei 78) y los datos de distancia geográfica e IVTM fue calculada mediante el coeficiente de correlación lineal de Pearson, donde valores cercanos a 1 reflejan dependencia positiva y completamente proporcional entre variables (incremento proporcional), valores cercanos a 0 implican independencia entre variables y valores cercanos a -1 implican dependencia negativa e inversamente proporcional (decremento inverso proporcional).

### *Distribución potencial.*

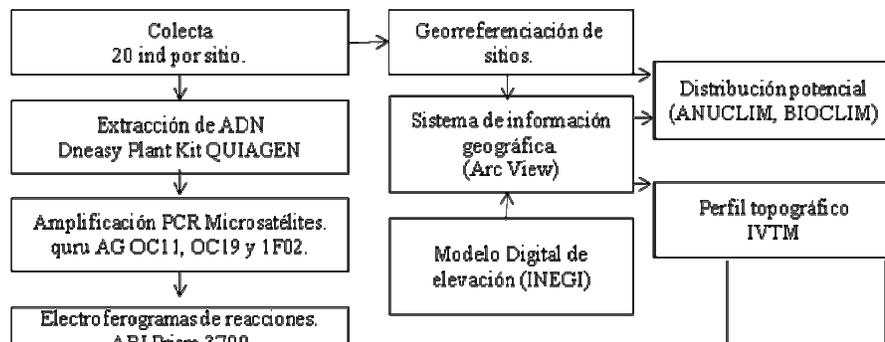
Con el fin de establecer correspondencias climáticas entre los sitios de distribución de la especie *Q. grisea* en la Sierra Fría de Aguascalientes, que pudieran ayudar a identificar restricciones en la distribución de la especie, se generó un modelo de distribución potencial. Mediante la aplicación del programa ANUCLIM v 5.1 (Houlder, 2000) se generó un perfil de distribución climática utilizando un modelo digital de elevación (INEGI) de cuadrícula 50 x 50 m. Los datos climáticos de entrada provienen del modelo de distribución climática propuesto para México (Téllez *et al.*, *en prensa*), en donde se calcula la distribución climática de acuerdo a un modelo de regresión lineal, con respecto a la altitud y se contemplan datos climáticos provenientes de más de 7400 estaciones meteorológicas del territorio nacional en periodos de al menos 10 años consecutivos de registro. Se contemplan: temperatura media anual, rango diurno medio (periodo máximo y mínimo), isothermalidad, temperatura estacional, temperatura máxima del periodo más caliente, temperatura mínima del periodo más frío, rango anual de temperatura, promedio de la temperatura de los tres meses más húmedos, promedio de la temperatura de los tres meses más secos, promedio de la temperatura de los tres meses más calientes, promedio de la temperatura de los tres meses más fríos, precipitación anual, precipitación del período más húmedo, precipitación del período más seco, precipitación de temporal, precipitación de los tres meses más húmedos,

precipitación de los tres meses más secos, precipitación de los tres meses más calientes y precipitación de los tres meses más fríos.

Con la aplicación del programa BIOMAP en ANUCLIM (Houlder, 2000) se realizaron correlaciones de tipo percentil entre el perfil climático obtenido por ANUCLIM y la correspondencia climática para cada uno de los cuatro puntos de muestreo, para generar un modelo de distribución potencial de la especie *Q. grisea* en la Sierra Fría de Aguascalientes. Se calcularon 5 percentiles para cada uno de los parámetros climáticos, esto se logra dividiendo en cinco partes el rango obtenido de la diferencia entre el valor máximo y el valor mínimo de cada variable climática. La asignación de una cuadrícula a un percentil se obtiene cuando cada cuadrícula alcanza el valor mínimo del rango en el percentil para todas las variables, así entonces los valores mínimos de las variables climáticas se encuentran en el percentil 1 y los valores máximos en el percentil 5.

La distribución potencial fue realizada con ayuda del Dr. Oswaldo Téllez Valdés en el Laboratorio de Recursos naturales de la Unidad de Biología, Tecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

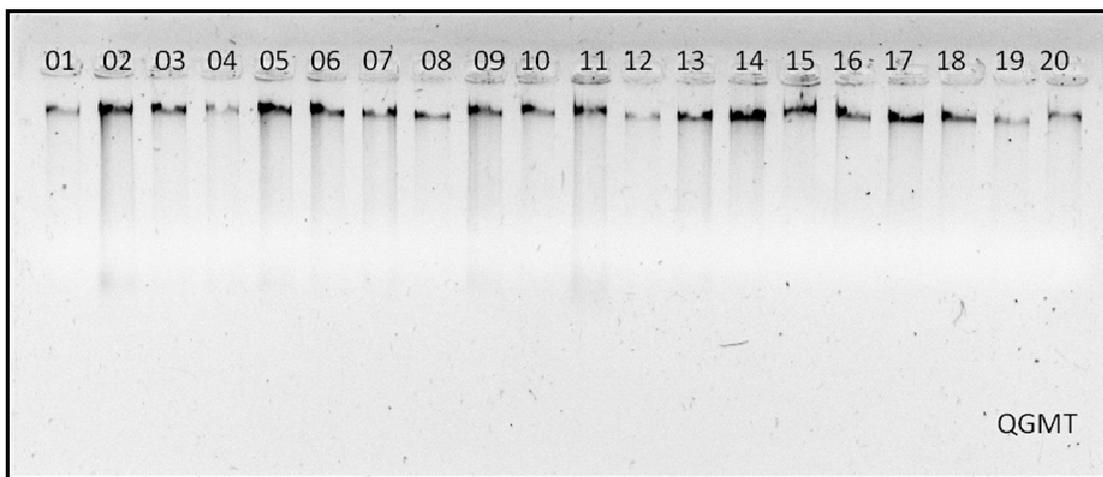
#### *Resumen de metodología empleada.*



## RESULTADOS

### *Extracción de ADN.*

Fue obtenido ADN de alto peso molecular y baja cantidad de productos de degradación, para los 84 individuos de *Q. grisea*, un ejemplo se muestra en la Figura 3.



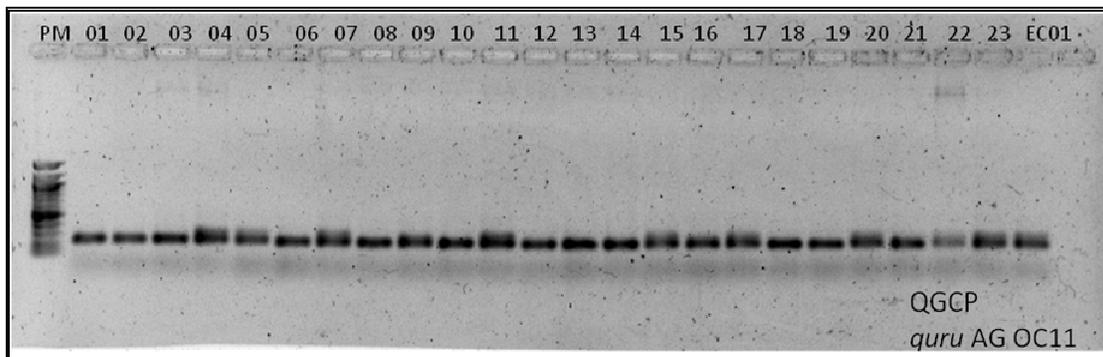
**Figura 3.** Bandas de ADN en gel de agarosa al 0.8% de los individuos del sitio MT.

### *Amplificación de microsatélites.*

Los locus OC19, 1F02 y OC11 resultaron polimórficos para la especie *Q. grisea* con tamaños variables (198-382, 140-242 y 190-224, respectivamente), el número de alelos detectados varía entre 15 (OC11) y 31 (OC19). Los valores se muestran en el cuadro 4. Durante la genotipificación, no se obtuvieron individuos genéticamente idénticos. Un ejemplo de la amplificación tipo microsatélite se muestra en la figura 4.

**Cuadro 4.** Relación de fragmentos para la serie *quru* GA en la especie *Q. grisea*.

<i>quru</i> GA	OC19	1F02	OC11
No de individuos	84	83	82
No de alelos.	31	17	15
Rango en tamaño.	198-382	140-242	190-224



**Figura 4.** Amplificación tipo microsatélite para el sitio CP con el primer *quru* AG OC11.

*Número de alelos.*

La cantidad de alelos presentes en cada sitio por locus y la cantidad de alelos exclusivos por sitio, fue variable, siendo “El Sapo” (ES) la que registró la mayor cantidad de alelos observados (39), la menor cantidad (33), fue la observada en “El Cepo” (CP). La mayor cantidad de alelos exclusivos se encontró en ES (9) y la menor en CP (3). La cantidad de alelos observados y exclusivos de cada sitio se resumen en el cuadro 5.

**Cuadro 5.** Cantidad de alelos exclusivos (E) y observados (O) para cada locus por sitio.

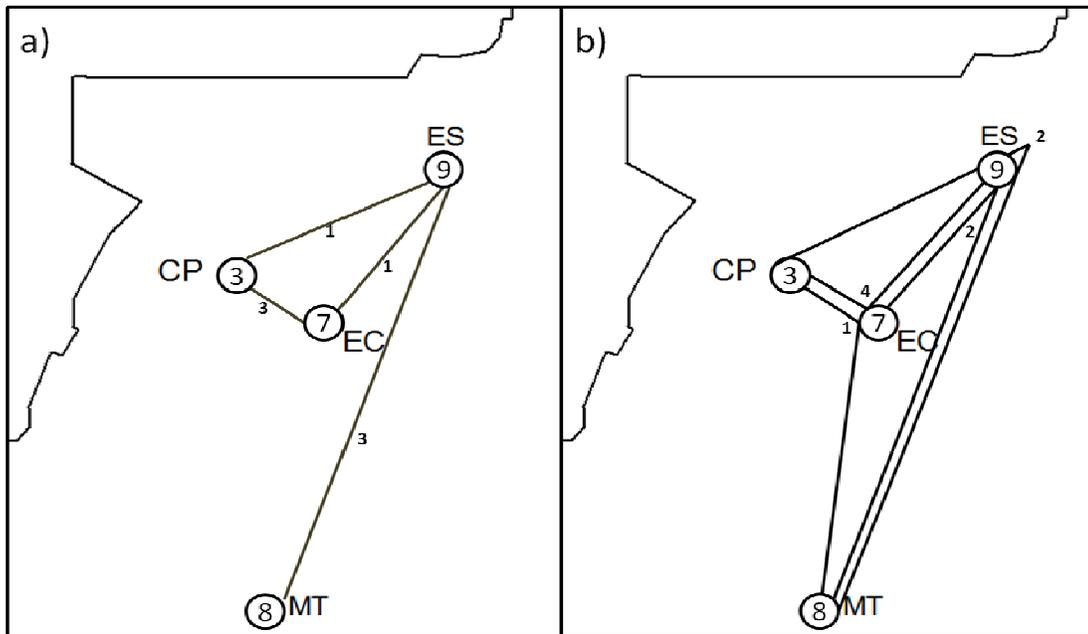
Sitio	OC19		1F02		OC11		Total	
	E	O	E	O	E	O	E	O
CP	1	12	0	11	2	10	3	33
EC	6	17	0	10	1	10	7	37
ES	6	15	2	13	1	11	9	39
MT	6	12	1	12	1	10	8	34

En los subgrupos integrados por dos sitios de muestreo (Cuadro 6), los sitios que comparten el mayor número de alelos compartidos de forma exclusiva son “CP y EC” además de “ES y MT” con tres alelos compartidos entre sí. Los grupos “CP y ES” y “EC y ES” comparten solo un alelo en común, mientras que “CP y MT” y “EC y MT” no comparten alelos de manera exclusiva. Para los grupos integrados por triadas, el que comparte más alelos en común es “CP, EC y ES” con cuatro, le siguen “CP, ES y MT” y “EC, ES y MT” con dos alelos compartidos y el grupo con menor cantidad de caracteres compartidos es el de “CP, EC y MT” con un solo alelo. Todos los sitios de muestreo comparten 19 alelos en común.

**Cuadro 6.** Cantidad de alelos compartidos entre subgrupos de sitios de muestreo.

Subgrupos	Alelos compartidos
CP y EC	3
CP y ES	1
CP y MT	0
EC y ES	1
EC y MT	0
ES y MT	3
CP, EC y ES	4
CP, EC y MT	1
CP, ES y MT	2
EC, ES y MT	2
CP, EC, ES y MT	19

Los alelos compartidos entre los subgrupos, fueron proyectados sobre los puntos georreferenciados (Figura 5). Los alelos compartidos para grupos pareados (Figura 5a) demuestran que existen alelos compartidos en común entre los sitios CP, EC y ES, mientras que MT solo comparte alelos con ES. Para las triadas de grupos (Figura 5b) se puede observar que entre los sitios CP, EC y ES se comparten cuatro alelos y el subgrupo integrado por CP, EC y MT solo comparte un alelo en común de forma exclusiva.



**Figura 5.** Cantidad de alelos compartidos entre subgrupos de sitios de muestreo.

a) pares de sitios y b) triadas. En círculos, caracteres exclusivos por sitio de muestreo. Numerales sobre líneas y nodos indican la cantidad de alelos compartidos por subgrupo.

### Estimación de $H_e$ y $H_o$

La heterocigocis observada para todas las poblaciones tiene un valor alto (0.6781) de diversidad genética. Para los locus OC19 y 1F02 se encontró que hay deficiencia de heterócigos, mientras que, para OC11 se puede observar que hay una ligera deficiencia de homócigos (Cuadro 7). Mediante la prueba de Chi cuadrada se calculó que el valor observado es de 0.029 y el valor crítico es de 7.815 (3 grados de libertad,  $p$  0.05), como el valor crítico es mayor al observado, se puede aceptar la hipótesis nula y se deduce que en conjunto todos los sitios se encuentran en equilibrio Hardy-Weimberg. Al nivel de sitios, el análisis es diferente, todos los sitios presentan déficit de heterócigos, dos sitios (CP y MT) se encuentran cercanos al equilibrio entre homócigos y heterócigos.

**Cuadro 7.** Heterocigocis esperada ( $H_o$ ) y observada ( $H_e$ ) por alelo y sitio de muestreo para *Q. grisea*.

Sitio	OC19		1F02		OC11		Total	
	$H_o$	$H_e$	$H_o$	$H_e$	$H_o$	$H_e$	$H_o$	$H_e$
CP	0.5217	0.8483	0.6087	0.8048	0.9565	0.7971	0.7971	0.8167
EC	0.4000	0.9244	0.6842	0.8549	0.8421	0.8634	0.6421	0.8809
ES	0.4286	0.9338	0.6667	0.9024	0.9048	0.8676	0.6667	0.9013
MT	0.5500	0.8282	0.7222	0.9302	0.8500	0.7397	0.7074	0.7397
Todos	0.4762	0.9181	0.6667	0.8886	0.8916	0.8255	0.6781	0.8774

*Estructura genética poblacional.*

El coeficiente de ancestría estimado para todos los locus, para todos los sitios ( $\Theta_{st}$ ), es de 0.0265, el cual es un valor bajo y denota que los sitios no están estructurados genéticamente y comparten flujo génico. De la misma manera, los sitios en términos genéticos son muy similares. Mediante los datos pareados de  $\Theta_{st}$  se puede deducir que las poblaciones más similares entre sí en términos de ancestría, son las poblaciones EC y ES, mientras que las más diferentes son CP y MT (Cuadros 8 y 14).

**Cuadro 8.** Coeficiente de ancestría ( $\Theta_{st}$ ) pareado para los sitios de muestreo de *Q. grisea*.

Pares de sitios	Coeficiente de ancestría ( $\Theta_{st}$ )
CP y EC	0.0237
CP y ES	0.0234
CP y MT	0.0487
EC y ES	0.0057
EC y MT	0.0380
ES y MT	0.0198
Todos	0.0265

La estimación de  $F_{ST}$  resultó en un valor de 0.02732 y es muy similar a  $\Theta_{st}$  (0.0265) por lo que se afirma que los sitios de muestreo no están diferenciados genéticamente. El valor de  $F_{IS}$  calculado es de 0.20004, lo que indica que entre los sitios de muestreo existe deficiencia de heterócigos. El valor calculado de  $F_{IT}$  es de 0.22189 lo que refiere a que el aporte individual hacia la variabilidad total de los sitios es alto.

*Análisis molecular de varianza (AMOVA)*

Los datos resultados del análisis de varianzas (Cuadro 9) denotan que el 77.8 % de la variación genética total es por parte de los individuos dentro de los sitios de muestreo, lo que refiere a similitud genética entre los sitios en términos de varianzas en la heterocigosis. La variación entre los individuos dentro de los sitios es de 19.46 % e indica que hacia el interior de los sitios existe bajo grado divergencia con respecto a una reproducción panmíctica, el componente de varianza indica que las diferencias entre los sitios son heterogéneas. Finalmente, la variación entre los sitios es del 2.73%.

**Cuadro 9.** Análisis molecular de varianza.

Fuente de variación.	g. l.	Suma de cuadrados.	Componentes de varianza.	Porcentaje de variación.
Entre las poblaciones (sitios).	3	8.920	0.03511 Va	2.73
Entre los individuos dentro de las subpoblaciones (subsitos).	80	120.009	0.25006 Vb	19.46
Entre los individuos.	84	84	1.00000 Vc	77.81
Total.	167		1.28517	100

### *Distancias genéticas.*

A partir del cálculo de distancia genética propuesto por Nei (1978) (Cuadros 10 y 14), se observa que los sitios CP, EC y ES en términos genéticos son muy similares entre sí, siendo MT la más diferente con el resto de los sitios.

Los cálculos de distancias genéticas propuestos por Cavalli-Sforza y Edwards (1967) (Cuadros 10 y 14) demuestran que el sitio ES guarda identidad con el resto de las poblaciones y MT es el sitio que más acumula diferencias con el resto de los sitios.

**Cuadro 10.** Distancias genéticas entre datos pareados para *Q. grisea*.  $D_{\text{Nei78}}$ . Distancia Nei 1978,  $D_{\text{C-SE}}$ . Distancia Cavalli-Sforza Edwards.

Pares de sitios	$D_{\text{Nei78}}$	$D_{\text{C-SE}}$
CP y EC	0.2902	0.1560
CP y ES	0.2901	0.0000
CP y MT	0.4055	0.1460
EC y ES	0.2905	0.0000
EC y MT	0.4514	0.2980
ES y MT	0.3116	0.0000

### *Flujo génico.*

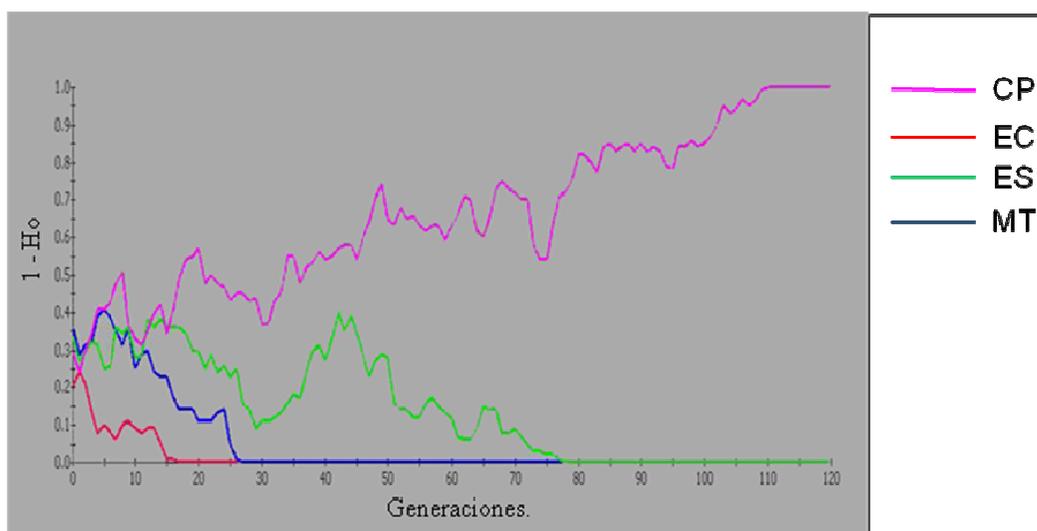
El flujo génico ( $N_{em}$ ) entre pares de sitios (Cuadros 11 y 14), es mayor para los sitios EC y ES (43.61) el menor es el compartido por CP y MT (4.88). El flujo génico calculado para todos los sitios es de 9.18.

**Cuadro 11.** Flujo génico ( $N_{em}$ ) para sitios pareados de la especie *Q. grisea*.

Pares de sitios	$N_{em}$
CP y EC	10.30
CP y ES	10.43
CP y MT	4.88
EC y ES	43.61
EC y MT	6.33
ES y MT	12.38
Todos	9.18

### Modelaje de estabilidad genética.

De acuerdo al modelaje de estabilidad genética (Figura 6), el sitio que se mantendría durante un mayor número de generaciones es CP (110 generaciones), seguida por ES (78 generaciones), MT (26 generaciones) y EC (16 generaciones). La estabilidad en éste modelo no guarda relación alguna con la heterocigosis esperada ( $H_e$ ).



**Figura 6.** Estabilidad genética de los sitios de muestreo en tiempos generacionales.

### Análisis Espacial

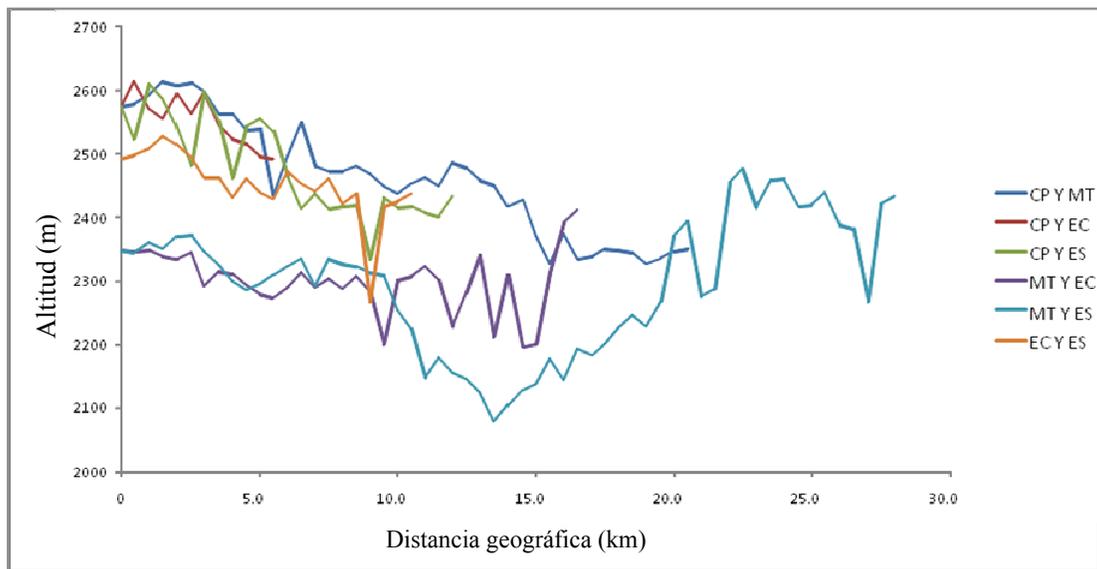
La distancia geográfica (Cuadros 12 y 14) más corta entre un par de sitios es la encontrada entre CP y EC (5.61 km), la distancia mayor se encuentra entre ES y MT (27.95 km). Se guardan al menos 11 km de distancia de separación para el resto de los sitios pareados.

**Cuadro 12.** Cuadro comparativo de distancias geográficas ( $D_{geo}$ ) entre sitios de muestreo.

Sitios pareados	$D_{geo}$
CP vs EC	5.61
CP vs ES	12.59
CP vs MT	19.81
EC vs ES	11.12
EC vs MT	17.23
ES vs MT	27.95

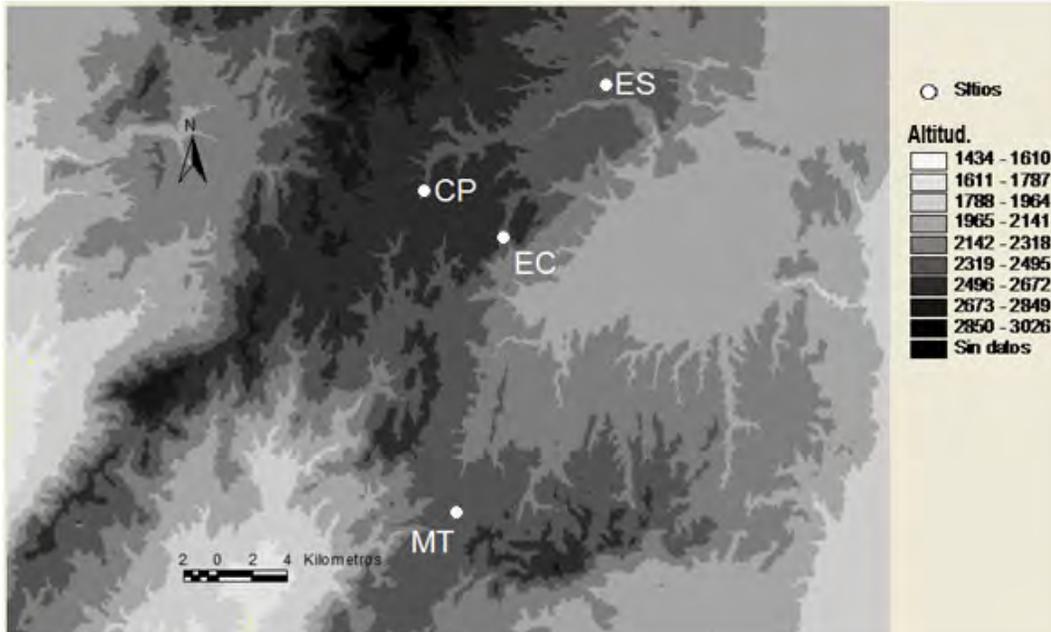
*Perfil topográfico.*

El perfil topográfico (Figura 7) de la altitud obtenida cada 500 m entre los sitios, muestra que el terreno en la Sierra Fría de Aguascalientes es muy irregular. Entre los sitios ES y MT existe una mayor cantidad de puntos intermedios y se caracteriza por una depresión topográfica intermedia. Entre los sitios CP y EC se encuentra la menor acumulación de puntos intermedios y se detectan al menos tres formaciones elevadas. La formación geológica intermedia más elevada se encontró entre los sitios CP y MT.



**Figura 7.** Perfil topográfico entre sitios pareados de *Q. grisea*.

La distribución de la especie *Q. grisea* en la Sierra Fría de Aguascalientes se encuentra asociada con un patrón topográfico, los sitios EC, ES y MT se distribuyen en un perfil que va de los 2319- 2495 m s.n.m., el sitio CP se encuentra entre los 2496-2672 m s.n.m. (Figura 8).



**Figura 8.** Topografía y distribución de los sitios de muestreo de *Q. grisea*

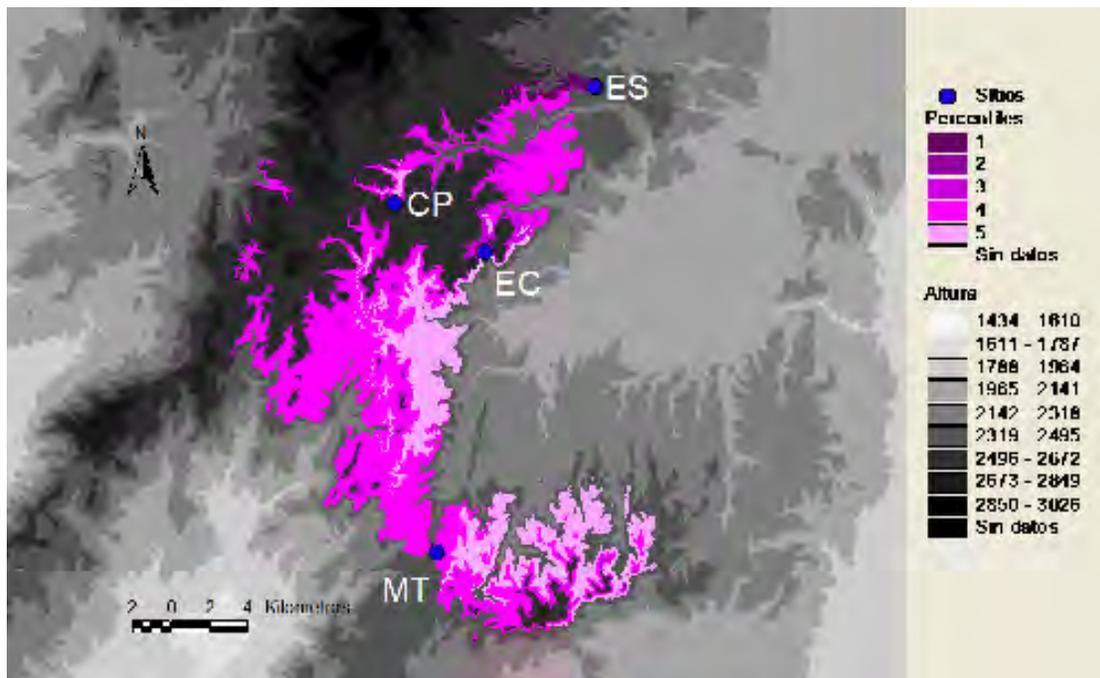
El índice de variación topográfica media (IVTM) demuestra que entre los sitios CP y ES existe la menor variación topográfica intermedia (4.994), mientras que la mayor variación se encuentra entre los sitios ES y MT (6.992). El promedio de IVTM para todos los sitios pareados es de 6.094 (Cuadros 13 y 14).

**Cuadro 13.** Índice de variación topográfica media (IVTM) entre sitios de muestreo.

Sitios pareados	IVTM
CP vs EC	4.994
CP vs ES	5.991
CP vs MT	6.374
EC vs ES	5.564
EC vs MT	6.647
ES vs MT	6.992
Todas	6.094

### *Distribución potencial*

De acuerdo a la distribución potencial (Figura 9), del total de cuadrículas que potencialmente pueden ser viables para la distribución de la especie, el 2.6% cae en el percentil 1, el 0.2% en el percentil 2, el 10.3% en el percentil 3, el 58.6% en el 4 y el 28.3 % en el percentil 5. De manera general se forma un continuo de distribución potencial, que se interrumpe en la parte más alta de la formación geológica localizada entre los sitios CP y EC.



**Figura 9.** Distribución potencial de *Q. grisea* en la Sierra Fría de Aguascalientes.

A manera de síntesis (Cuadro 14), se resumen las relaciones entre sitios pareados en términos de distancias genéticas, coeficiente de endogamia, flujo génico distancia geográfica e índice de variación topográfica media. Se incluyen en el cuadro las pruebas de Mantel de asociación con respecto a la distancia genética calculada de acuerdo a Nei (1978). Ambas relaciones son positivas, a mayor incremento en distancia genética o variación topográfica, es mayor la distancia genética entre los sitios. En ambas relaciones se rechaza la hipótesis nula y se acepta que las series de datos no están correlacionadas de manera proporcional.

**Cuadro 14.** Cuadro comparativo de las relaciones entre sitios pareados.  $D_{Nei78}$ . Distancia genética de Nei 78,  $D_{C-SE}$ , Distancia genética Cavalli-Sforza Edwards,  $\Theta_{st}$  coeficiente de ancestría,  $N_{em}$ . Flujo génico,  $D_{geo}$ . Distancia geográfica. IVTM, Índice de variación topográfica media.  $p$ . probabilidad de rechazar la hipótesis nula.  $\alpha$ . nivel de significación.

Sitios pareados	$D_{Nei78}$	$D_{C-SE}$	$\Theta_{st}$	$N_{em}$	$D_{geo}$ (km)	IVTM
CP vs EC	0.2902	0.1560	0.0237	10.30	5.61	4.994
CP vs ES	0.2901	0.0000	0.0234	10.43	12.59	5.991
CP vs MT	0.4055	0.1460	0.0487	4.88	19.81	6.374
EC vs ES	0.2905	0.0000	0.0057	43.61	11.12	5.564
EC vs MT	0.4514	0.2980	0.0380	6.33	17.23	6.647
ES vs MT	0.3116	0.0000	0.0198	12.38	27.95	6.992
Todas.			0.0265	9.18		6.094
<i>Prueba de Mantel</i>					0.3559	0.5493
<i>p- valor</i>					0.260	0.443
<i>Alfa (<math>\alpha</math>)</i>					0.05	0.05

*Análisis de correlación por sitio de estudio*

De acuerdo al análisis por sitio de la distancia genética (Cuadro15), para el sitio ES se obtiene una correlación positiva entre la distancia genética ( $D_{Nei\ 78}$ ) y el índice de variación topográfica medio (IVTM) de 0.9516, con el logaritmo natural de la distancia geográfica ( $\ln D_{geo}$ ) la correlación es de 0.9901. Para el sitio CP la correlación también es positiva para ambos parámetros, para IVTM es de 0.7134 y para  $\ln D_{geo}$  es de 0.7741. Para el sitio EC la correlación es positiva, siendo mayor para IVTM (0.9411) con respecto a  $\ln D_{geo}$  (0.7972). En el sitio MT existe una correlación negativa entre la distancia genética e IVTM (-0.7071) y  $\ln D_{geo}$  (-0.9990)

**Cuadro 15.** Cuadro de correlación por sitio de muestreo entre la distancia genética ( $D_{Nei\ 78}$ ) y el logaritmo natural de la distancia geográfica ( $\ln D_{geo}$ ). *r*. Coeficiente de correlación lineal.

	$D_{Nei78}$	IVTM	$\ln D_{geo}$
ES			
CP Y ES	0.2901	5.9914	2.5329
EC Y ES	0.2905	5.5641	2.4087
ES Y MT	0.3116	6.9915	3.3304
<i>r</i>		0.9516	0.9901
CP			
CP Y EC	0.2902	4.9939	1.7245
CP Y ES	0.2901	5.9914	2.5329
CP Y MT	0.4055	6.3736	2.9861
<i>r</i>		0.7134	0.7741
EC			
CP Y EC	0.2902	4.9939	1.7245
EC Y ES	0.2905	5.5641	2.4087
EC Y MT	0.4514	6.6471	2.8466
<i>r</i>		0.9411	0.7972
MT			
CP Y MT	0.4055	6.3736	2.9861
EC Y MT	0.4514	6.6471	2.8466
ES Y MT	0.3116	6.9915	3.3304
<i>r</i>		-0.7071	-0.999

## DISCUSIÓN.

La variabilidad genética observada en la Sierra Fría de Aguascalientes, medida en términos de riqueza alélica demuestra que existe en la especie *Quercus grisea* una amplia variabilidad genética. Para el locus *quru* AG OC19 se encontró la mayor variabilidad para un alelo con respecto a las reportadas anteriormente de la misma serie de cebadores (ver cuadro 4), en donde el rango promedio reportado para un locus es de 5 a 14 loci (Aldrich *et al.*, 2002; Aldrich *et al.*, 2003; Aldrich *et al.*, 2003b; Aldrich *et al.*, 2005). Esto quiere decir por un lado, que el marcador es muy variable y por lo tanto, muy útil para estudios de variabilidad genética y por otro, que la diversidad alélica en la especie es muy alta.

En el presente estudio se encontró, que todos los genotipos son diferentes entre sí, un patrón similar se identificó en poblaciones de Irlanda del encino *Q. petraea* (Muir *et al.*, 2004), en donde se detectó, que para un total de 249 individuos genotipificados con 13 loci tipo microsatélite, solo menos del 2% eran idénticos en términos genéticos, lo cual contrasta con especies que presentan reproducción clonal facultativa, por ejemplo, para la especie *Q. pyrenaica* (Valbuena-Carabaña *et al.*, 2008) se identificaron 14 individuos idénticos de un total de 96 individuos analizados con 7 loci tipo microsatélite. El mecanismo reproductivo propuesto para las poblaciones de Irlanda de la especie *Q. petraea*, es preferentemente sexual, por lo que en la Sierra Fría de Aguascalientes podría existir el mismo patrón reproductivo asociado para la especie *Q. grisea*.

En los sitios de “Mesa el Sapo” (ES) y “Entrada a La Congoja” (EC) se encontraron los mayores índices de riqueza alélica observada (ver cuadro 5), sin embargo, el sitio de “Mesa Montoro” (MT) tiene también una alta cantidad de alelos exclusivos. La teoría neutral en genética de poblaciones predice que la mayor cantidad de alelos se encuentra en poblaciones de tamaño grande y más antiguas (Kimura, 1965), es por esto que se propone que los tres sitios serían los candidatos a ser los más antiguos y los más grandes en tamaño poblacional. El sitio de “El Cepo” (CP) podría ser una zona derivada producto de una colonización reciente. Para comprobar ésta hipótesis se pueden generar estudios posteriores de filogeografía mediante análisis de secuencias, estudios recientes en encinos, han demostrado que en las regiones espaciadoras intergénicas *trnL-trnF*, *trnH-psbA* y *trnT-trnL*, se encuentra alta variación genética y resultaron ser muy útiles

para identificar patrones de colonización reciente en cinco especies de encinos en Japón (Okaura, *et al.*, 2007).

Los datos de diversidad genética o heterocigosis esperada ( $H_e$ ) reflejan que los sitios se encuentran muy cercanos al equilibrio entre homocigos y heterocigos (ver cuadro 7), con lo que se deduce que, al interior de los sitios, no están ocurriendo fenómenos de selección natural o procesos intensos de deriva génica o endogamia. Sin embargo se observó que en los loci *quru* OC19 y *quru* 1F02 hay una ligera deficiencia de heterocigos lo que podría estar denotando endogamia. Si bien en términos generales, no puede hablarse de un proceso de selección sobre los heterocigos, sí se debe considerar que el déficit de heterocigos puede ser el resultado de un proceso reproductivo como la endogamia que está actuando de manera muy inicial al interior de los sitios. Esto puede ser probable, ya que se propone que el mecanismo de dispersión de las semillas para las especies de encinos es preferentemente por gravedad (Kaul, 1985), lo que puede estar promoviendo, de manera incipiente, la formación de grupos familiares y el efecto de la endogamia está siendo contrarrestado por la reproducción sexual. En la especie *Q. petraea* (Streiff *et al.*, 1999), se lograron identificar por su similitud genética y distribución espacial, grupos familiares entre los individuos, la contribución de estos grupos familiares no tuvo efecto significativo en la estructura genética poblacional, pero sí en la diversidad genética, al detectarse déficit de heterocigos.

Otra explicación ante ésta situación es que la heterocigosis esperada puede estar sobreestimada, ya que su cálculo depende tanto de la cantidad de alelos como de sus frecuencias, si se presentan una alta cantidad de alelos con altas frecuencias alélicas, el índice de heterocigocidad esperada ( $H_e$ ) es alto y como el tamaño poblacional utilizado para el estudio es pequeño, se tiende a subestimar la cantidad de heterocigos en la población porque no se igualan sus frecuencias esperadas a las observadas (Nei, 1966).

Otro factor que puede estar asociado con la distribución de déficit de heterocigos es que se presente un efecto Walhund (Hartl y Clark, 1987), es decir, la división parcial de un grupo de organismos que se comportan como una sola población provoca que, al estimar la heterocigocidad entre los subgrupos, cada uno de ellos resulte en un déficit de heterocigos. Cuando el grupo de poblaciones se analiza como una unidad, las frecuencias alélicas se encuentran en equilibrio. Éste efecto, es el identificado en el presente estudio, la evaluación de la heterocigosis demuestra que, en los sitios existe deficiencia de heterocigos, sin embargo, en la evaluación de todos los sitios en

conjunto, no se encuentra una desviación significativa del equilibrio entre homocigos y heterocigos. Cabe señalar que al analizar los datos no por sitio de muestreo, sino por gametos, existe déficit de heterocigos, lo que refiere a que entre los sitios de muestreo están ocurriendo patrones incipientes de reproducción entre individuos cercanamente emparentados, que no rompen de manera significativa el equilibrio Hardy-Weimberg. Este mismo efecto es el encontrado en poblaciones de Alemania de la especie *Q. robur* (Degen *et al.*, 1999) donde se demuestra que el alto número de homocigos detectado en una de las poblaciones, se debe al efecto Walhund y en menor medida a la contribución parcial de homocigos por endogamia.

Si bien la heterocigosis esperada puede estar sobreestimada, la heterocigosis observada es un buen estimador para identificar la variabilidad genética (Toro y Caballero, 2005). El valor promedio para todos los sitios, corresponde a especies con reproducción sexual obligadamente cruzada y es muy similar a los valores reportados en estudios previos para encinos (Cotrell *et al.*, 2003; Aldrich *et al.*, 2005; Curtu *et al.*, 2007, Soto *et al.*, 2007) lo que demuestra que los encinos son muy diversos en términos genéticos.

El coeficiente de ancestría ( $\Theta_{st}$ ) tiene un valor muy bajo (0.0265), al igual que  $F_{ST}$  (0.0237), por lo que, se deduce que las poblaciones no están estructuradas genéticamente y el efecto de la deriva genética no está influyendo sobre la diferenciación genética entre los sitios. En el mismo sentido se puede deducir que la endogamia no juega un papel importante en la divergencia genética entre los sitios. Esto puede deberse a que la estrategia de polinización por viento de *Q. grisea* permite la polinización cruzada con intercambio de gametos a larga distancia, lo cual propicia el mantenimiento genético de la especie en la zona. La polinización a larga distancia, puede ser muy efectiva para prevenir fenómenos de estructura genética en encinos, por ejemplo Craft y Ashley (2007), no detectaron fenómenos de estructura genética, entre poblaciones de *Q. macrocarpa* separadas entre sí por 200 kilómetros. De la misma forma, Muir *et al.* (2004) encontraron baja diferenciación genética ( $F_{ST}= 0.020$ ) en poblaciones de *Q. petraea* en Irlanda, separadas entre sí por 140 km.

Para que pueda ocurrir la polinización cruzada a largas distancias, debe de existir un patrón de sincronía entre la generación de los granos de polen en un sitio y la receptividad del estigma en flores femeninas en otros sitios, estudios sobre la fenología de la especie *Q. grisea* entre los sitios de la Sierra Fría de Aguascalientes, pueden contribuir a afirmar esta condición. Para la especie *Q. ilex* se propone que el

desfasamiento entre el período de la receptividad del estigma y la liberación del grano de polen en un árbol individual, puede incrementar de manera potencial, el número de individuos que polinizan ese árbol en particular (Lumaret *et al.*, 1991). Este mecanismo reproductivo reduce la estructura genética y mantiene la alta diversidad genética entre las poblaciones de *Q. ilex* (Soto *et al.*, 2007).

Otra inferencia importante derivada de la baja estructura genética, está relacionada con el tamaño efectivo poblacional, ya que, al no detectarse fenómenos de divergencia entre los sitios, se puede deducir que el tamaño efectivo poblacional es suficiente para contrarrestar el efecto de estructuración por parte de la deriva (Ray, 2001). Esto se relaciona con el alto número de alelos encontrados al interior de los sitios. Como el efecto de la deriva puede resultar tanto en la pérdida de alelos como en la estructuración genética de los sitios (Ray, 2001) y al ser detectadas, tanto alta diversidad genética, como baja estructuración genética, se concluye que la deriva no juega un papel importante como fuerza evolutiva en la estructuración y variabilidad genética en la Sierra Fría de Aguascalientes.

En términos de componentes de variación obtenidos por el análisis molecular de varianzas (AMOVA) se puede concluir que la mayor fuente de variación se encuentra dentro de los individuos de los sitios (ver cuadro 9). Esto quiere decir que cada uno de los sitios de muestreo es muy diverso y que la baja divergencia entre los mismos no es atribuible a estructuración poblacional, sino al proceso de mutación que existe al interior de los sitios. Así entonces la divergencia no es atribuible a la fijación diferencial de alelos entre los sitios, sino a la ganancia de alelos por mutación. Lo que sitúa a la mutación como la principal fuerza evolutiva que genera las diferencias entre los sitios.

El valor de  $F_{IS}$  calculado (0.20004) indica que existe en general deficiencia de heterocigos, lo cual puede estar vinculado a la formación de grupos familiares al interior de los sitios (Shnabel y Hamrick, 1990; Degen, 1999; Streiff, 1999). Sin embargo, esto no tiene un efecto significativo en la estructura genética. La baja formación de grupos familiares puede estar relacionada a que en la especie, puede existir una baja tolerancia a la endogamia, esto quiere decir que puede existir un mecanismo de auto-incompatibilidad dentro de la especie, que está propiciando la reproducción sexual cruzada. De manera general se ha propuesto que en las especies de encinos pueden existir mecanismos de autoincompatibilidad (Ducousso *et al.*, 1993). Estudios genéticos en *Q. ilex* (Yacine y Lumaret, 1988), *Q. robur* y *Q. petraea* (Bacilieri *et al.*, 1994), han

determinado que el tipo de reproducción en tales especies es obligadamente cruzada. Para la especie *Q. ilex* (Yacine y Bouras, 1997), se ha demostrado que cuando se efectúa la autopolinización, existe un alto índice de abortación tanto de flores femeninas polinizadas, como de semillas, siendo muy baja la viabilidad de las mismas. La autoincompatibilidad tiene efectos genéticos y se han encontrado diferencias en términos genéticos para la especie *Q. ilex*, por lo que se propone, que las cruza entre los individuos de un mismo sitio, no son de forma aleatoria entre individuos cercanamente emparentados (Yacine y Lumaret, 1988), esto promueve la alta heterocigosis y la baja estructura poblacional en la especie (Soto *et al.*, 2007).

Los datos pareados del coeficiente de ancestría ( $\Theta_{st}$ ) son, en general, bajos (ver cuadro 8). La mayor estructuración se encuentra entre los sitios CP y MT, por lo que se deduce que entre ambos sitios puede existir una barrera que restringe el intercambio de alelos. Los sitios de CP, EC y ES comparten los menores índices de endogamia pareados y forman un solo grupo de alta intensidad de intercambio genético, el sitio más aislado a este grupo corresponde a MT. Estos datos correlacionan, en buena medida, con la distribución de alelos compartidos entre los datos pareados de los sitios de muestreo (Figura 5a) donde se puede notar el mismo patrón de asociación. MT se encuentra aislado de CP y MT solo comparte alelos exclusivos con ES. Con esto se concluye que entre los sitios “CP y MT” y “EC y MT” existe una barrera de restricción al intercambio de características genéticas por medio de la polinización o dispersión de semillas. En un estudio realizado en la costa de California para la especie *Q. agrifolia*, fueron utilizados marcadores tipo microsatélite de cloroplasto y nucleares, para identificar barreras de restricción al flujo genético (Dodd, 2006), en el mismo estudio se propone, que las barreras genéticas existen cuando se encuentra la mayor distancia genética entre sitios pareados y el menor flujo génico, tal restricción, está asociada ligeramente con la altitud entre los sitios.

Actualmente se pueden generar estudios de movimiento de grano de polen como el propuesto por García-Mozo *et al.*, (2007), dónde se identifica el momento exacto en que florece cada una de las poblaciones y se colectan granos de polen en cada sitio periódicamente, al mismo tiempo se identifican parámetros como la dirección y velocidad del viento, así entonces, para cada vez que se colecta el polen, se asocia una zona de influencia de un sitio diferente de acuerdo a la dirección del viento y la sincronía en la floración. Con esto, se identifica la magnitud de la influencia de una

zona sobre otra de acuerdo a la posición geográfica, la dirección del viento y la temporalidad en la floración, para establecer restricciones temporales de movimiento de polen. Estudios de este tipo pueden contribuir a identificar la naturaleza de la barrera de restricción al flujo genético en la Sierra Fría de Aguascalientes, que puede ser geográfica, climática o ecológica.

Para identificar barreras de restricción a la dispersión, en el presente estudio fue determinada la distribución potencial de la especie utilizando parámetros climáticos (ver figura 9), no se logró identificar de manera directa un patrón de asociación entre la discontinuidad en distribución potencial de la especie y la restricción en flujo génico o distancia genética.

En términos de distancia genética (Nei, 1978), los sitios ES, CP y EC son muy parecidos entre sí y el sitio más divergente con el resto es MT, lo que concuerda tanto con las estimaciones para coeficiente de coancestría  $\Theta_{st}$ , como para los alelos compartidos en común (ver cuadro 14). Tomando como referencia los datos pareados de distancia genética de Cavalli-Sforza y Edwards (1966), se puede concluir que el sitio ES es idéntico con CP, EC y MT, lo cual refiere a que establece relaciones directas con todos los sitios, al tener frecuencias similares en los alelos. Por lo tanto, se puede concluir que el sitio ES es el que se encarga de establecer una buena parte de las relaciones de conectividad entre todos los sitios. Probablemente ES es más efectivo en términos de dispersión comparado con el resto de los sitios, estudios de dispersión como el propuesto por García-Mozo *et al* (2007) pueden contribuir a afirmar ésta condición.

Para ambas estimaciones de distancia genética, los sitios más diferentes entre sí son EC y MT, lo cual no concuerda con la estimación pareada de  $\Theta_{st}$ , esto puede deberse a que  $\Theta_{st}$  establece relaciones en términos de ancestría (Weir y Cokherman, 1982) y las distancias genéticas establecen las diferencias en términos de diversidad alélica y sus frecuencias (Cavalli-Sforza y Edwards, 1967; Nei, 1978), es decir, la divergencia entre ambas está mediada por la diversidad de alelos y sus frecuencias, no por la cantidad de alelos que guardan en común por descendencia. En diversos estudios, se ha propuesto que la contribución de alelos por parte del grano de polen y las semillas en encinos, no está asociada directamente con la distancia genética y está más asociada al coeficiente de ancestría (Loveless y Hamrick, 1984; Slatkin, 1987; Ouborg *et al.*, 1999; Ellstrand, 2003).

El flujo génico para el total de sitios muestreados es de 9.18, el mínimo para sitios pareados es de 4.88, un valor mayor a uno es suficiente para romper la estructura genética poblacional (Wright, 1943, Slatkin, 1987). Con esto se deduce que, en la Sierra Fría de Aguascalientes los mecanismos dispersión de los granos de polen y de las semillas, pueden distribuir los alelos a largas distancias. Esto se comprueba mediante el análisis espacial en donde las poblaciones más lejanas entre sí que son “ES y MT” (27.95 km), poseen un valor alto de flujo genético poblacional (12.38).

No existe un patrón general asociado entre la distancia geográfica y el flujo génico o la distancia genética, ya que los sitios más cercanos geográficamente entre sí, no son los que comparten mayor flujo génico o son los más similares en términos de distancia genética. En el mismo sentido, los sitios más alejados geográficamente, no son los más diferentes entre sí ni comparten el menor flujo génico (ver cuadro 14). El sitio que se encuentra más aislado geográficamente del resto de los sitios es MT, en donde se pueden observar los mayores valores de distancia genética y los menores de flujo génico compartido, particularmente con los sitios CP y EC. Por lo que se puede inferir un posible patrón de aislamiento por distancia de MT con respecto a CP y EC. Existe la posibilidad de que los sitios CP, EC y ES formen un circuito compacto reproductivo influenciado de forma heterogénea con la distancia geográfica, siendo los tres sitios más similares genéticamente entre sí, son también los más cercanos geográficamente, sin embargo, la correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica no es directa para los tres sitios.

Un factor que se puede asociar de forma indirecta con la distancia genética es la topografía entre los sitios. El índice de variación topográfica media (IVTM) calculado, correlaciona en 0.5493 con la distancia genética, por lo que existe una correlación positiva entre la distancia genética y la acumulación de accidentes topográficos (ver cuadro 14), el valor de significancia para la correlación no es estadísticamente significativo, por lo que no se puede atribuir que la acumulación de accidentes topográficos, juega un papel determinante que se manifieste de forma proporcional sobre la diferenciación genética entre los sitios. La heterogeneidad en la topografía, puede derivar en fenómenos de aislamiento reproductivo, hasta el momento, no se han generado estudios en encinos que permitan reconocer fenómenos de aislamiento reproductivo relacionados directamente con la heterogeneidad topográfica, sin embargo, en un estudio realizado para la especie *Q. mongólica* var. *crispula* en Japón (Okaura et

*al.*, 2007), se propone que la acumulación de volcanes entre dos regiones, puede promover el aislamiento reproductivo y patrones heterogéneos de la distribución alélica.

Se pueden atribuir correlaciones locales al nivel de sitio entre la distancia genética con la distancia geográfica o IVTM (ver cuadro 15). Para el sitio ES hay una correlación muy fuerte entre la distancia genética con la distancia geográfica ( $r = 0.9901$ ) o el IVTM ( $r = 0.9516$ ), para este sitio en particular, tanto la distancia geográfica como la topografía juegan un papel importante en la identidad genética con respecto al resto de los sitios. Mientras más alejado geográficamente se encuentre un sitio o se acumulen más accidentes topográficos con respecto a ES, mayor será la diferencia en términos genéticos. Para el sitio EC ocurre un patrón muy similar al identificado en ES, y está más asociado a la topografía ( $r = 0.9411$ ) que a la distancia geográfica ( $0.7972$ ). CP al igual que ES y EC, presenta una correlación positiva entre la distancia genética y la distancia geográfica ( $0.7972$ ) o el IVTM ( $0.7134$ ), sin embargo, la correlación es menos proporcional. El sitio MT presenta un patrón muy diferente, dado que, la correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica ( $r = 0 -0.9990$ ) y el IVTM ( $r = -0.7071$ ) es negativa, esto es, a mayor distancia geográfica o IVTM, es mayor su similitud genética. Cabe señalar, que la correlación positiva entre la distancia genética y la distancia geográfica e IVTM, solo se mantiene entre los sitios que se localizan en el norte y son cercanos geográficamente entre sí y la relación negativa se encuentra en el sitio MT, que se localiza en el sur y que está más aislado geográficamente. Éste mismo patrón fue identificado para la especie *Q. garryana* en el Sureste de Canadá y Este de Estados Unidos (Marsico *et al.*, 2009), donde se pudo identificar que hasta los 600 km de distancia, existe una correlación positiva entre la distancia genética y la distancia geográfica, posterior a los 600 km de distancia, ocurre una correlación negativa con la distancia genética, tanto para caracteres nucleares, como para caracteres cloroplásticos. En el mismo estudio se propone, que pudo existir un fenómeno de colonización rápida para todo el Este de Estados Unidos y que la correlación positiva entre la distancia genética y la geográfica es atribuible a fenómenos locales de dispersión de cada una de las poblaciones.

Si se considera que ES es el sitio que tiene el mayor número de alelos observados (ver cuadro 5) y por ende puede ser el sitio más probable a ser el más antiguo en la zona, se puede considerar que los individuos del sitio ES dieron origen a los individuos de los sitios EC, MT y CP. Como las distancias genéticas compartidas (ver cuadro 10) entre

los sitios CP, EC y MT con respecto a ES, son muy similares entre sí, entonces, se puede deducir que la divergencia genética entre los mismos es muy baja (Hedrick, 1999) y en este mismo sentido, el fenómeno de colonización en la Sierra Fría de Aguascalientes fue inicialmente muy rápido. Se ha propuesto que la velocidad de colonización por parte de las semillas de encino en sitios no colonizados previamente, puede variar de acuerdo a la presencia de animales que funcionen como vectores de dispersión (Bossema, 1979; Sork, 1984; Jensen y Nielsen, 1986) o a fenómenos estocásticos como tormentas o exposición crónica a vientos fuertes (Ennos, 1997). Sin embargo, se ha observado que una medida conservadora para la velocidad de dispersión es de alrededor de 300 m por año (Docouso *et al.*, 1993). Como la velocidad de colonización es muy alta, la diferenciación genética entre los sitios tiende a ser muy baja, porque la deriva génica no actúa de forma significativa cuando existe un bajo número de generaciones intermedias (Nei, 1966), por ende se mantiene la similitud genética entre los sitios.

Si se atribuye que ES inicialmente originó a los sitios CP, EC y MT por una colonización rápida, entonces el establecimiento de relaciones genéticas por dispersión, entre “CP y EC”, “CP y MT” y “EC y MT”, fue posterior a la colonización inicial. La distancia genética que existe entre “CP y EC” es muy similar a la que existe entre ES con el resto de los sitios, esto puede deberse a que los sitios EC y CP son muy cercanos geográficamente entre sí. La cercanía geográfica tiende a homogeneizar las frecuencias alélicas en encinos debido a la intensidad en la dispersión, principalmente de polen y en menor proporción de semillas (Austerlitz y Garnier-Gèrè, 2008; Dodd *et al.*, 2006; Marsico *et al.*, 2009). Las mayores distancias genéticas observadas, corresponden a “CP y MT” y “EC y MT”, ambas diferencias son similares entre sí, al igual que las distancias geográficas asociadas, con esto, se identifica un patrón de aislamiento por distancia del sitio MT con respecto a CP y EC, el cuál es posterior a la colonización rápida y promovido principalmente, por la restricción en la dispersión del polen.

Con la interpretación parcial de los datos, parecería que no hay un patrón asociado entre el flujo genético y la distancia geográfica para todos los sitios de muestreo. Sin embargo la interpretación se vuelve más directa si se asocia un vector como es el viento para la dispersión de los encinos. En un estudio realizado para *Q. lobata* en California (Austerlitz *et al.*, 2007), se pudo identificar que la distribución del polen es diferencial entre los sitios (anisotrópica) y está asociada ligeramente con la dirección y velocidad

del viento. Para establecer la direccionalidad del vector de dispersión, se puede utilizar el cálculo del flujo génico, la estimación de flujo génico es una medida indirecta de la migración entre los sitios (Wright, 1943) y es derivada de los valores calculados del coeficiente de ancestría. Utilizando el flujo génico se pueden identificar también relaciones indirectas de ancestría entre los sitios (Weir y Cokerman, 1982; Slatkin, 1987).

El sitio más al norte es ES (ver figura 8) y se propone como el sitio más ancestral, éste sitio pudo dar origen, inicialmente, al sitio EC, porque que mantiene el mayor valor de flujo génico (Nem de 43.61), posteriormente a MT (Nem de 12.38) y más recientemente a CP (Nem 10.43). Si se considera que los sitios más antiguos, son también los de mayor riqueza alélica, entonces, el orden en el que se originaron los sitios correlaciona con la cantidad de alelos observados por sitio, siendo ES el más antiguo (39 alelos observados) y CP el más reciente (33 alelos observados) (Ver cuadro 5).

El patrón de colonización se puede explicar de manera más detallada, si se considera al viento como el principal promotor de la dispersión, tanto del polen, como de las semillas y en segundo término, la dispersión por vectores animales (Dow y Ashley, 1996). La mayor intensidad de flujo génico, es la que se comparte entre los sitios EC y ES, por lo que se propone de manera teórica, que el principal componente de la dirección del viento es de Norte a Sur (N-S) y en menor intensidad de Este a Oeste (E-O). De la misma forma se propone que EC fue el primer sitio en ser colonizado por individuos provenientes de ES. Como existen variaciones estocásticas en la dirección de los vientos dominantes (Ennos, 1997), se espera que la acumulación de diferencias genéticas con respecto al sitio fuente, sea mayor a medida que el sitio se encuentre más alejado geográficamente del componente principal de la dirección del viento (Austerlitz *et al.*, 2007). Así entonces, la menor variación con respecto al eje del componente principal establecido por “EC y ES”, es la encontrada para MT, su posición geográfica se encuentra en la misma dirección del viento, sin embargo, la diferencia radica en que se encuentra más alejado geográficamente de ES y está posicionado ligeramente al Este del componente principal del viento. Por esta razón, comparte menor flujo génico (Nem de 12.38) que el identificado para EC, por lo que se propone MT como el segundo sitio en ser colonizado. El sitio CP, se encuentra más alejado al Oeste y latitudinalmente se encuentra al norte del componente del viento, por esta razón comparte menor flujo génico (10.43) con el sitio fuente (ES) y es el tercer sitio en ser colonizado.

Una vez colonizados los sitios, se pueden identificar las restricciones al flujo génico en términos de distancias geográficas. La desviación con respecto al componente de dispersión por viento, no explica la cantidad del flujo génico que existe entre los sitios CP y EC, porque su posición geográfica es contraria al componente. Sin embargo, la cercanía geográfica que existe entre los sitios CP y EC, puede estar propiciando el flujo génico entre ellos (Nem de 10.30), promovido principalmente por fenómenos meteorológicos estocásticos (Ennos, 1997) y por la dispersión de semillas por vectores animales (Bossema, 1979; Sork, 1984; Jensen y Nielsen, 1986). Cabe señalar, que a pesar de ser los sitios más cercanos geográficamente entre sí, no son los que comparten el mayor flujo génico, esto puede deberse a que entre los mismos, existe una formación montañosa intermedia que restringe la intensidad del flujo génico, pero no lo anula. El flujo de alelos entre ambos sitios, puede también identificarse porque comparten alelos en común de forma exclusiva (3 alelos). La restricción al flujo genico entre EC y MT (Nem de 6.33), puede explicarse porque MT se encuentra al Este, con respecto al componente de dispersión por viento propuesto, además de que se encuentra separado geográficamente de EC (17.23 km). El mismo patrón ocurre para CP y MT (Nem de 4.88), la diferencia radica en que entre ellos existe una distancia geográfica mayor (19.81 km), que restringe en mayor proporción el flujo génico. Así entonces, la principal restricción al flujo génico entre EC y CP con respecto a MT es una combinación entre la posición y la distancia geográfica.

Al comparar ambas propuestas de colonización, una considerando el flujo génico y otra con la distancia genética, se puede concluir de manera general, que la colonización en la Sierra Fría de Aguascalientes fue muy rápida, que el sitio ES fue el fundador para el resto de los sitios, el tiempo de divergencia entre los sitios, no ha generado patrones de estructura genética poblacional y la distancia geográfica desempeña un papel importante como promotor de diferenciación genética entre los sitios fundados a partir del sitio ES, siendo MT, el más diferente genéticamente con respecto a CP y EC.

De manera general, se propone que en la Sierra Fría de Aguascalientes, todos los sitios se comportan como una sola población en términos genéticos, porque no existe un patrón de estructura genética y todos los sitios en conjunto se encuentran en equilibrio Hardy Weimberg, sin embargo. El sitio MT es el más diferente con el resto de los sitios, el aislamiento geográfico, puede estar promoviendo que, durante las siguientes generaciones MT se comporte como una población diferente en términos genéticos,

establecida por la generación de alelos exclusivos y la acumulación de diferencias genéticas, particularmente con CP y MT.

La pérdida de encinares que ha ocurrido en la Sierra Fría de Aguascalientes al inicio del siglo XX y en los últimos años, no ha tenido un efecto significativo en la estructura genética de los sitios de distribución para la especie *Q. grisea*, sin embargo, falta reconocer, cuáles son los efectos de la fragmentación del hábitat en términos demográficos, para identificar si los sitios se encuentran en riesgo de desaparecer. Al no detectarse procesos de selección sobre alguno de los genotipos, baja diversidad alélica o procesos de endogamia, se puede inferir que intrínsecamente la especie no presenta riesgos de desaparecer en la zona y se garantiza su mantenimiento genético durante un alto número de generaciones. En éste sentido, los datos obtenidos para la viabilidad en términos genéticos proyectados en tiempos generacionales, indican que la población CP es la más estable seguida por ES, MT y EC.

El mantenimiento de la diversidad genética, es dependiente en buena medida del tamaño efectivo de la población (Loveless y Hamrick, 1984), por lo que se deben generar estudios que contemplen caracteres genéticos y demográficos para establecer estrategias adecuadas de conservación (Lande, 1988; Oostermeijer, *et al.*, 2003). Cabe señalar que los tres sitios con mayor riqueza alélica son también los asociados a planicies, ya sea de encinar o pastizales en el mismo gradiente altitudinal, estudios demográficos posteriores en la zona como los realizados para las especies *Q. eduardii* y *Q. potosina* (Alfonso Corrado *et al.*, 2007) podrían contribuir a identificar cuáles son los sitios de mayor tamaño poblacional y aquellos donde ocurre el mayor reclutamiento de plántulas y con esto hacer una asociación entre el tamaño poblacional, el éxito reproductivo, la permanencia generacional de los individuos en cada sitio y la diversidad alélica, para proponer estrategias adecuadas de conservación.

En términos de conservación el sitio ES, reúne los criterios de alta riqueza alélica, presencia de mayor número de caracteres exclusivos, alto nivel de flujo génico y similitud genética con el resto de los sitios. Además de que es el sitio más probable de ser el fundador del resto de los sitios. En ES se encuentran representados el 62% de los alelos identificados en el estudio. Por todo lo anterior, el sitio ES es prioritario para la conservación en la Sierra Fría de Aguascalientes. Sin embargo, si los esfuerzos de conservación se dirigen hacia éste sitio, se corre el riesgo de perder alelos exclusivos como pueden ser los de MT, el cual es el sitio con mayor aislamiento en términos de

flujo génico y distancia genética, el aislamiento reproductivo puede derivar en adaptaciones locales (Abbot *et al.*, 2008) y si las adaptaciones locales se pierden, se corre el riesgo de perder el potencial adaptativo de la especie en la zona. Por lo que se propone que el esfuerzo de conservación se dirija de forma prioritaria hacia la conservación del sitio ES y en segundo término de MT, para conservar tanto la mayor riqueza alélica como la mayor cantidad de alelos exclusivos. Si la intensidad del flujo génico permanece como hasta hoy, el sitio EC puede permanecer como un corredor de alelos entre los sitios ES y MT y se propone como tercer sitio prioritario para la conservación ecológica. Como CP tiene la menor cantidad de alelos representados y podría ser el sitio de colonización más reciente y en términos genéticos es muy similar a ES, es el último sitio al que se podría dirigir un esfuerzo de conservación. Cabe señalar que se necesitarían datos relacionados a la demografía de las poblaciones para planear estrategias sobre la viabilidad a largo plazo de cada uno de los sitios.

En un estudio reciente (Chapa-Bezanilla *et al.*, 2008), se han cuantificado los cambios de uso de suelo en la zona mediante el análisis de fotografías aéreas y de satélite, en donde se propone que desde 1956 hasta 1993, el bosque no se ha reducido ni aumentado, es decir la cobertura se mantiene constante, sin embargo dentro del mismo estudio se propone que en términos de degradación de hábitat, en la Sierra Fría de Aguascalientes, hay una tendencia en aumento para la fragmentación de los bosques, de la misma manera, se identifica que el sitio EC se encuentra en una zona con alto riesgo de desaparecer producto del cambio de uso de suelo, por la generación de pastizales inducidos de uso ganadero. Estudios demográficos realizados en la zona para las especies *Q. potosina* y *Q. eduardii* (Alfonso-Corrado *et al.*, 2007), identifican que la tasa de crecimiento calculada asegura la permanencia de las especies en la zona, sin embargo si se extrae alrededor del 5% de los individuos, se corre el riesgo de que las poblaciones se pierdan a través de las generaciones.

Ambos estudios refieren que la zona es muy vulnerable ante las actividades humanas y se corre el riesgo de perder encinares a corto, mediano y largo plazo. En la Sierra Fría de Aguascalientes la pérdida de encinares producto de la fragmentación del hábitat por cambio de uso de suelo y la extracción de encinos de sus hábitats naturales, representan un riesgo para la distribución de *Q. grisea*. El identificar los sitios más importantes para la conservación ecológica es un paso muy importante para definir las estrategias de conservación, en éste sentido, se ha identificado en el presente estudio que la especie *Q.*

*grisea* no ha sufrido consecuencias genéticas asociadas a la fragmentación del hábitat y se han categorizado los sitios más importantes para la conservación. Esta es una oportunidad única para tomar decisiones que nos permitan mantener no solo los encinares de *Q. grisea*, sino promover estrategias adecuadas que permitan un manejo adecuado de los bosques, para seguir obteniendo los servicios ambientales que prestan a la sociedad para todo el estado de Aguascalientes.

## CONCLUSIONES.

La variabilidad genética medida en términos de diversidad alélica es alta para la especie *Quercus grisea* en la Sierra Fría de Aguascalientes.

En términos genéticos los cuatro sitios de distribución se comportan como una sola población ya que no están estructurados genéticamente y en conjunto se encuentran en equilibrio entre homocigos y heterocigos.

En la especie *Q. grisea* predomina un patrón reproductivo obligadamente sexual en términos genéticos.

En la Sierra Fría de Aguascalientes, la diferenciación entre los sitios está más asociada a la mutación que a la deriva genética entre los sitios de distribución de *Q. grisea*.

Los sitios de “El Cepo”, “Entrada a la congoja” y “Mesa el sapo” pueden considerarse en términos genéticos como un solo grupo reproductivo, siendo el sitio de “Mesa Montoro” el más aislado genéticamente.

En la Sierra Fría de Aguascalientes los procesos de polinización y dispersión son muy efectivos para el mantenimiento de la diversidad genética y están asociados a un patrón anisotrópico, con un componente principal en dirección Norte-Sur y en segunda instancia Oeste-Este.

El sitio ES es el más probable de ser el más ancestral y el que dio origen al resto de los sitios.

No se detectaron consecuencias genéticas asociadas a la fragmentación del hábitat como procesos intensos de endogamia, estructura poblacional o baja diversidad alélica.

En términos de conservación el sitio de distribución más importante es el de “Mesa el Sapo”

Hace falta generar estudios demográficos para complementar el estudio genético y promover estrategias adecuadas para la conservación ecológica de *Q. grisea*.

## BIBLIOGRAFÍA.

- Abbot RJ, Ritchie MG, Hollingsworth PM. 2008. Introduction. Speciation in plants and animals: pattern and process. *Phil. Trans. R. Soc. B* 363: 2965-2969.
- Ainsworth EA, Tranel PJ, Drake G, Long SP. 2003. The clonal structure of *Quercus geminate* revealed by conserved microsatellite loci. *Molecular Ecology*. 12 527:532.
- Aldrich PR, Glaubitz C, Parker GR, Rhodes OE, Michler CH. 2005. Genetic Structure Inside a Declining Red Oak Community in Old-Growth Forest. *Journal of Heredity*. 96: 627-634.
- Aldrich PR, Jagtap M, Michler CH, Romero-Severson J. 2003. Amplification of North American Red Oak Microsatellite Markers in European White Oaks and Chinese Chesnut. *Silvae Genetics*. 52: 176-179.
- Aldrich PR, Michler, CH, Sun W, Romero-Severson J. 2002. Microsatellite markers for northern red oak (Fagaceae: *Quercus rubra*) *Molecular Ecology Notes* (2) p 472-474.
- Aldrich PR, Parker GR, Michler CH, Romero-Severson J. 2003b. Whole-tree silvic identifications and the microsatellite genetic structure of a red oak species complex in an Indiana old-growth forest. *Can. J. For. Res.* 33: 2228–2237.
- Alfonso-Corrado C, Esteban-Jiménez R, Clark-Tapia R, Piñero D, Campos J, Mendoza A. 2004. Clonal and genetic structure of two Mexican oaks: *Quercus eduardii* and *Quercus potosina* (Fagaceae). *Evol Ecol* 18: 585-599.
- Alfonso-Corrado C, Clark-Tapia R, Mendoza A. 2007. Demography and management of two clonal oaks: *Quercus eduardii* and *Quercus potosina* (Fagaceae) in central México. *Forest Ecology and management*. 251: 129-141.
- Alstad D. 2001. Basic Populus Models of Ecology. Upper Saddle River.
- Amos W, Harwood J. 1998. Factors affecting genetic diversity in natural populations. *Phil. Trans. Royal. Society of London B*. 353: 177-186.
- Arnaud JF. 2003. Metapopulation genetic structure and migration pathways in the land snail *Helix aspera*: Influence of landscape heterogeneity. *Landscape Ecol*. 18:333–346.

- Arriaga JM, Espinoza C, Aguilar E, Martínez L. Gómez y E. Loa (coordinadores). 2000. Regiones terrestres prioritarias de México. *Comisión Nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad*, México.
- Austerlitz F, Dutech C, Smouse PE, Davis F, Sork VL. 2007. Estimating anisotropic pollen dispersal: a case study in *Quercus lobata*. *Heredity*. 9: 193-204.
- Austerlitz F, Garnier Gèrè. 2008. Modelling the impact of colonisation on genetic diversity and differentiation of forest trees: interaction of life cycle, pollen flow and seed long-distance dispersal. *Heredity*. 90: 282-290
- Bacilieri R, Ducouso A, Kremer A. 1994. Genetic, morphological, ecological and phenological differentiation between *Quercus petraea* (Matt) Liebl and *Quercus robur* L in a mixed stand of France. *Silvae Genet* 44: 1-10.
- Barker JSF. 1999. Conservation of livestock breed diversity. *AGRI* 25:33–43.
- Bellarosa R, Simeone M, Papini A, Schirone B. 2005. Utility of ITS sequence data for phylogenetic reconstruction of Italian *Quercus* spp. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 34: 355–370.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F. 1996-2002 GENETIX 4.04, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Boecklen W, Howard D. 1997. Genetic analysis of hybrid zones: number of markers and power resolution. *Ecology*. 78: 2611-2616.
- Bonfil C. 1998. Dinámica poblacional y regeneración de *Q. rugosa* implicaciones para la restauración de bosques de encinos. *Tesis de doctorado*. Facultad de Ciencias. México.
- Bossema I. 1979. Jays and Oaks : an ecological study of a simbiosis. *Behaviour* 70: 1-118.
- Bruschi P, Vendramin GG, Bussotti F, Grossoni P. 2000. Morphological and Molecular Differentiation between *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus pubescens* Willd. (Fagaceae) in Northern and Central Italy. *Annals of Botany* 85: 325-333.

- Bruschi P, Vendramin GG, Bussotti F, Grossoni P. 2003. Morphological and Molecular Diversity Among Italian Populations of *Quercus petraea* (Fagaceae). *Annals of Botany*. 91: 707-716.
- Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF. 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics* 19: 233-257.
- Challenger A. 1998. Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México. Pasado, presente y futuro. Primera edición. *CONABIO-UNAM-Sierra Madre*. México.
- Charlesworth B, Nordborg M, Charlesworth D. 1997. The effects of local selection, balanced polymorphism and background selection on equilibrium patterns of genetic diversity on subdivided populations. *Genet. Res. Camb.* 70: 155-174.
- Charlesworth D, Wright S. 2001. Breeding systems and genome evolution. *Current opinion in genetics & development*. 11: 685-690.
- Chapa-Bezanilla D, Sosa-Ramírez J, Alba Dávila A. 2008. Estudio multitemporal de fragmentación de los bosques de Sierra Fría de Aguascalientes, México. *Madera y Bosques* 14: 37-51.
- Chistiakov DA, Hellemans B, Volckaert FA. 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 255: 1–29.
- Collevatti RG, Grattapaglia D, Hay JD. 2001. Population genetic structure of the endangered tropical tree species *Caryocar brasiliense*, based on variability at microsatellite loci. *Mol. Ecol.* 10: 349–356.
- Cottrell JE, Munro RC, Tabbener HE, Milner AD, Forrest GI, Lowe AJ. 2003. Comparison of fine-scale genetic structure using nuclear microsatellites within two british oakwoods differing in population history. *Forest Ecology and Management* 176: 287-303.
- Craft K.J, Ashley MV. 2007. Landscape genetic structure of bur oak (*Quercus macrocarpa*) savannas in Illinois. *Forest Ecology and Management*, 239, 64–70.

- Curtu AL, Gailing O, Leinemann L, Finkeldey R. 2007. Genetic Variation and Differentiation Within a Natural Community of Five Oak Species (*Quercus spp.*). *Plant Biol* 9: 116-126.
- De La Cerda, M. 1999. Encinos de Aguascalientes. *Universidad Autónoma de Aguascalientes*, México.
- Degen B, Streiff R, Ziegenhagen B. 1999. Comparative study of genetic variation and differentiation of two pedunculate oak (*Quercus robur*) stand using microsatellite and allozyme loci. *Heredity*. 83: 597-603.
- Docouso M, Michaud H, Lumaret R. 1993. Reproduction and gene flow in the genus *Quercus* L. *Ann Sci For*. 50 Suppl 1: 91-106.
- Dodd RS, Afzal-Rafi Z, Mayer W. 2006. Molecular Markers Show How Pollen and Seed Dispersal Affect Population Genetic Structure in Coast Live Oak (*Quercus agrifolia* Née). *General Technical Report PSW-GTR-217*.
- Dow BD, Ashley MV. 1996. Microsatellite analysis of seed dispersal and parentage of saplings in bur oak, *Quercus macrocarpa*. *Molecular Ecology* 5: 615-627.
- Dutech C, Sork V, Irwin AJ, Smouse PE, Davis FW. 2005. Gene flow and fine space genetic structure in a wind pollinated tree species, *Quercus lobata* (Fagaceae). *American Journal of Botany*. 92: 252–261
- Eding H, Crooijmans PMA, Groenne MAM, Meuwissen THE. 2002. Assessing the contribution of breeds to genetic diversity in conservation schemes. *Genet. Sel. Evol.* 34: 613–633.
- Eguiarte LE, Souza V, Aguirre X. 2007. Ecología Molecular. *Instituto Nacional de Ecología*. México.
- Ennos RA. 1994. Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity* 72: 250–259.
- Ennos RA. 1997. Wind as an ecological factor. *TREE* 12: 108-111.
- Ellegren H. 2000. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends Genet*: 16, 551–558.

- Ellstrand NC. 2003. Current knowledge of gene flow in plants: implications for transgene flow. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 358: 1163-1170.
- ESRI. (1992-1998) Arc View GIS Version 3.1. Environmental Systems Research Institute, Inc.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Fernández J, Toro MA, Caballero A. 2004. Managing individuals contributions to maximize the allelic diversity maintained in small, conserved populations. *Conserv. Biol.* 18: 1-10.
- Finkeldey R, Mátys G. 2003. Genetic variation of oaks (*Quercus spp.*) in Switzerland. 3. Lack of impact of postglacial recolonization history on nuclear gene loci. *Theor Appl Genet.* 106: 346-352.
- Frankel R, Soulé ME. 1981. *Conservation and Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Frankham R. 1995. Conservation genetics. *Annu. Rev. Genetics.* 29: 305-327.
- Frankham R, Ballou, JD, Briscoe DA. 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press.
- Franklin J. 1995. Predictive vegetation mapping: Geographic modelling of biospatial patterns in relation to environmental gradients. *Prog. Phys. Geogr.* 19: 474-499.
- Galen C, Stanton ML, Shore JS, Sherry RA. 1997. Source-sink dynamics and the effect of an environmental gradient on gene flow and genetic substructure of the alpine buttercup *Ranunculus adoneus*. *Opera Bot.* 132: 179-188.
- García-Mozo H, Gómez-Casero MT, Domínguez E, Galán C. 2007. Influence of pollen emission and weather-related factor on variations in holm-oak (*Quercus ilex* subsp. *ballota*) acorn production. *Environmental and Experimental Botany.* 61: 35-40.

- Gomez JM. 2003. Spatial patterns in long-distance dispersal of *Quercus ilex* acorns by jays in a heterogeneous landscape. *Ecography*. 26: 573–584.
- González-Rivera R. 1993. La diversidad de encinos Mexicanos. *Revista Sociedad Mexicana de Historia Natural*. 154: 125-142.
- González-Rodríguez A, Arias DM, Oyama K. 2006. Genetic variation and differentiation of populations within the *Quercus affinis* – *Quercus laurina* (Fagaceae) complex analyzed with RAPD markers. *Can. Jour. of Bot.* 83: 155-162.
- González-Rodríguez A, Bain JF, Golden L, Oyama K. 2004. Chloroplast DNA variation in the *Quercus affinis*–*Q. laurina* complex in Mexico: geographical structure and associations with nuclear and morphological variation. *Molecular Ecology*. 13: 3467–3476.
- Grivet D, Smouse PE, Sork V. 2005. A novel approach to an old problem: tracking dispersal of seeds. *Molecular Ecology*. 14: 3585-3595.
- Grivet D, Sork V, Westfall RD, Davis FW. 2008. Blackwell Publishing Ltd Conserving the evolutionary potential of California valley oak (*Quercus lobata* Née): a multivariate genetic approach to conservation planning. *Molecular Ecology*. 17: 139–156.
- Guarino L, Jarvis A, Hijmans RJ, Maxted N. 2002. Geographic information systems (GIS) and the conservation and use of plant genetic resources. En: “*Managing Plant Genetic Diversity*”. CAB International, Wallingford. pp. 387–404.
- Gugerly F, Walser C, Dounavi K, Holderegger R, Finkeldey R. 2007. Coincidence of small-scale spatial discontinuities in leaf morphology and nuclear microsatellite variation of *Quercus petraea* and *Q. robur* in a Mixed Forest. *Annals of Botany* 99: 713–722.
- Guillemin ML, Faugeron S, Destombe C, Vlard F, Correa J, Valero M. 2008. Genetic variation in wild and cultivated populations of the haploid–diploid red alga *Gracilaria chilensis*: how farming practices favor asexual reproduction and heterozygosity. *Evolution* (Journal Compilation) 0:1-20.
- Guisan A, Zimmermann N. 2000. Predictive habitat distribution models in ecology, *Ecol. Model* 135: 147–186.

- Hancock, J.M. 1998. Microsatellite and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. En: D.B. Goldstein y C. Schlötterer [eds.]. *Microsatellite evolution and applications*. Oxford University Press. New York.
- Hartl D, Clark A. 1989. *Principles of population genetics*. 2da Ed. Sinauer, Sunderland MA.
- Hedrick PW. 1999. Perspective: Highly Variable Loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution*. 53: 313-318.
- Hornero J, Gallego FJ, Martínez I, Toribio M. 2001. Testing the Conservation of *Quercus spp.* Microsatellites in the Cork Oak *Q. suber L.* *Silvae Genetica* 50: 162-167.
- Houlder 2000. ANUCLIM ver 5.1. Centre for resource and Environmental Studies. The Australian National University.
- INEGI. 1981. *Síntesis geográfica del Estado de Aguascalientes*. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. México.
- Jarvis A, Yeaman S, Guarino L, Tohme J. 2005. The role of geographic analysis in locating, understanding and using plant genetic diversity. *Methods in Enzymology*. 395: 279-298.
- Jensen TS, Nielsen OF. 1986. Rodents as seed dispersers in a heath-oak wood succession. *Oecologia* 70: 214-221.
- Jin L, Chakraborty R. 1995. Population structure, stepwise mutation, heterozygote deficiency and their implications in DNA forensics. *Heredity* 74: 274-285.
- Kalinowski ST. 2002. How many alleles per locus should be used to estimate genetic distances? *Heredity*. 88: 62-65.
- Kashi, Y. y M. Soller. 1998. Functional roles of microsatellites and minisatellites. En: D.B. Goldstein y C. Schlötterer [eds.]. *Microsatellite evolution and applications*. Oxford University Press. New York.
- Kaul R. 1985. Reproductive Morphology of *Quercus* (Fagaceae). *American Journal of Botany*. 72: 1962-1977.

- Lande R. 1988. Genetics and Demography in Biological Conservation. *Science*. 541: 1455-1460.
- Li, W.-H. 1997. *Molecular Evolution*. Sinauer Associates. Sunderland, MA, pp. 177–213.
- Loveless MD, Hamrick JL. 1984. Ecological Determinants of Genetic Structure in Plant Populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 15: 65-95.
- Lumaret R, Yacine A, Berrod A, Romane F, Li TX. 1991. Mating system and genetic diversity in holm oak (*Quercus ilex* L Fagaceae). En. *Biochemical Markers in the Population Genetics of Forest Trees* (Fineshi S, Malvolti ME, Cannata F, Hattemer HH, eds) SPB Academic Publ, The Hague, 149-153.
- Manos PS, Doyle JJ, Nixon KC. 1999. Phylogeny, biogeography, and processes of molecular differentiation in *Quercus* subg. *Quercus* (Fagaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 12: 333-349.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*. 27: 209-220.
- Marsico TD, Hellmann JJ, Romero-Severson J. 2009. Patterns of seed dispersal and pollen flow in *Quercus garryana* (Fagaceae) following post-glacial climatic changes. *Journal of Biogeography* 36: 929–941.
- Márquez-Olivas M, Tarango-Arámbula L, Mendoza-Martínez GD. 2002. Caracterización del hábitat del tecolote moteado mexicano. *Agrociencia*. año/vol 36 num 005. p 541-546.
- Márquez-Olivas M, García-Moya E, González-Rebeles C, Vaquera-Huerta H. 2007. Caracterización de los sitios de percha del guajolote silvestre (*Melleagris gallopavo* mexicana) en Sierra Fría, Aguascalientes, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 78: 163-173.
- Miller MP. 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer Software distributed by author.

- Milligan BG, Leebens-Mack J, Strand AE. 1994. Conservation genetics: beyond the maintenance of marker diversity. *Molecular Ecology*. 3: 423-435.
- Minnich R, Sosa Ramírez J, Franco-Vizcaíno E., Barry J. W y Siqueiros M.E. 1994. Reconocimiento preliminar de la vegetación y de los impactos de actividades humanas en la Sierra Fría, Aguascalientes, México. Investigación y Ciencia. Universidad autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes. *Investigación y Ciencia* 4:23-29.
- Muir G, Lowe AJ, Fleming CC, Vogl C. 2004. High Nuclear Genetic Diversity, High Levels of Outcrossing and Low Differentiation Among Remnant Populations of *Quercus petraea* at the Margin of its Range in Ireland. *Annals of Botany* 93: 691-697.
- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 89: 583-590.
- Nei M, Imaizumi Y. 1966. Effects of restricted population size and increase in mutation rate on the genetic variation of quantitative characters. *Genetics*. 54: 763-782
- Nei M, Maruyama T, Chakraborty R. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29: 1–10.
- Nixon K.C. 1993. Infrageneric classification of *Quercus* (Fagaceae) and typification of sectional names. *Annals Science Forestry*. 50: 25-34.
- Nixon, K.C., 1998. The genus *Quercus* in México. En: *Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution*. Ramamoorthy TR, Bye R, Lot A, Fa J. (eds.). Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp. 435 – 447.
- Nixon KC. 2002. The Oak (*Quercus*) Biodiversity of California and adjacent regions. *USDA Forest Service Gen. Tech. Rep. PSW-GTR-184*. p 3-20.
- Oostermeijer JGB, Luisten SH, De Nigs SCM. 2003. Integrating demographic and genetic approaches in plant conservation. *Biological Conservation*. 113:389-398.
- Ouborg NJ, Piquot Y, Van Groenendael JM. 1999. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants. *Journal of Ecology* 87: 551-568.
- Okaura T, Duc Quang Nguyen, Ubukata M, Harada Ko. 2007. Phylogeographic structure and late Quaternary population history of the Japanese oak *Quercus mongolica*

var *crispula* and related species revealed by chloroplast DNA variation. *Genes Genet. Syst.* 82: 465-477.

Ollivier, L., Foulley, J. J. 2002 Some suggestions on how to preserve both within- and between-breed genetic diversity. *53rd Annual Meeting of the European Association for Animal Production*. Cairo, Egypt.

Oostermeijer JGB, Luijten SH, Den Nijs JCM. Integrating demographic and genetic approaches in plant conservation. *Biological Conservation*. 113: 389-398.

Pakkad G, Ueno S, Yoshima H. 2008. Genetic diversity and differentiation of *Quercus semiserrata* Roxb. in northern Thailand revealed by nuclear and chloroplast microsatellite markers. *Forest Ecology and Management*. 255: 1067–1077.

Petit RJ, Latouche- Hallé C, Pernonge AK. 2002. Chloroplast DNA variation of oaks in France and the influence of forest fragmentation on genetic diversity. *Forest Ecology and Management*. 156: 115–129.

Petit RJ, Mousadik A, Pons O. 1998 Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conserv. Biol.* 12: 844–855.

Rajora OP, Rahman MH, Buchert GP, Dancik BP. 2000. Microsatellite DNA analysis of genetic effects of harvesting in old-growth eastern white pine (*Pinus strobus*) in Ontario, Canada. *Molecular Ecology*. 9: 339–348.

Ray C. 2005. Maintaining genetic diversity despite local extinctions: effects of population scale. *Biological conservation*. 100: 3-14.

Reyes I, Gama-Castro JE. 1995. Revaloración de la importancia de los encinos. pp 44-55. En: III Seminario sobre la utilización de los encinos Linares, N.L. del 4 al 6 de noviembre de 1992. Memorias (Tomo I) Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Nacional Autónoma de Nuevo León.

Rogers R. y Johnson P.S. 1998. Approaches to modeling natural regeneration in oak-dominated forest. *Forest Ecology and Management* 106: 45-54.

Romo-Díaz B, Velásquez-Valle R, Siqueiros-Delgado ME, Sánchez-Martínez G, De la Cerda-Lemus M, Moreno-Rico O, Molphe-Bach,E. 2007. Organismos con efecto

- potencial en el declinamiento de encinos de la Sierra Fría de Aguascalientes. *Investigación y Ciencia. Universidad Autónoma de Aguascalientes*. 15: 11-19.
- Rzendowski J. 1981. *Vegetación de México*. 1era. edición. Editorial Limusa, México.
- Schnabel A., Hamrick JL. 1990. Comparative analysis of population genetic structure in *Quercus macrocarpa* and *Quercus gambelii* (Fagaceae). *Systematic Botany* 15: 240–251.
- SEDES. 1993. Estudio para la declaratoria de la Sierra Fría como área natural protegida (Volumen No 2). Primera edición *SEDES*. Aguascalientes.
- Slatkin M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*. 236: 787-792.
- Smouse PE, Robledo-Arnuncio JJ. 2005. Measuring the genetic structure of the pollen pool as the probability of paternal identity. *Heredity*. 94: 640–649.
- Sork VL. 1984. Examination of seed dispersal and survival in red oak, *Quercus rubra*, using metal-tagged acorns. *Ecology*. 65: 1020-1022.
- Soto A, Lorenzo Z, Gil L. 2007. Differences in fine-scale genetic structure and dispersal in *Quercus ilex* L. and *Q. suber* L.: consequences for regeneration of Mediterranean open woods. *Heredity* 99: 601-607.
- Soulé ME, Simberloff D. 1986. What do genetics and ecology tell us about the design of nature reserves? *Biological Conservation* 35: 19-40.
- Steinkellner H, Fluch S, Turetschek E, Lexer C, Streiff R, Kremer A, Burg A. 1997. Identification and characterization of (GA/CT)<sub>n</sub>- microsatellite loci from *Quercus petraea*. *Plant Molecular Biology*. 33: 1093–1096.
- Streiff R, Ducouso A, Lexer C, Steinkellner H, Gloessl J, Kremer A. 1999. Pollen dispersal inferred from paternity analysis in a mixed oak stand of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt) Liebl. *Molecular Ecology*. 8: 831-841.
- Streiff R, Labbe T, Bacilieri R, Steinkellner H, Gloessl J, Kremer A. 1998. Within population genetic structure in *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. assessed with isozymes and microsatellites. *Molecular Ecology*. 7: 317-328.

- Téllez O, Hutchinson MA, Nix HA Jones P. Desarrollo de una base de datos climática digital para México. *En prensa*.
- Toro MA, Caballero A. 2005. Characterization and conservation of genetic diversity in subdivided populations. *Phil. Trans. R. Soc. B* 360: 1367-1378.
- Torres-Meza MJ, Báez-González AD, Maciel-Pérez LH, Quezada-Guzmán E, Sierra-Tristán JS. (2009) GIS-based modeling of the geographic distribution of *Quercus emoryi* Torr. (Fagaceae) in México and identification of significant environmental factors influencing the species distribution. *Ecol. Model.* 1-13.
- Tovar-Sánchez 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 (9): 1352-1363.
- Vakkari P, Blom A, Rusanen M, Raisio J, Toivonen. 2006. Genetic variability of fragmented stands of pedunculate oak (*Quercus robur*) in Finland. *Genetica.* 127:231–241.
- Valbuena-Carabaña M, González-Martínez SC, Gil L. 2008. Coppice forests and genetic diversity: A case study in *Quercus pyrenaica* Willd. from Central Spain. *Forest Ecology and Management.* 254: 225–232
- Valbuena-Carabaña M, González-Martínez SC, Sork VL, Collada C, Soto A, Goicoechea PC, Gil L. 2005. Gene flow and hybridisation in a mixed oak forest (*Quercus pyrenaica* Willd. and *Quercus petraea* (Matts.) Liebl.) in central Spain. *Heredity* 95: 457-465.
- Valencia-Avalos S. 1989. Contribución al conocimiento del género *Quercus* (Fagaceae) en el estado de Guerrero, México. *Tesis de licenciatura. UNAM.* México.
- Valencia-Avalos S. 2004. Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. *Bol. Soc. Bot. Mex.* 75: 33-53.
- Varela MC, Bras R, Barros IR, Oliveira P, Meierrose. 2008. Opportunity for hybridization between two oak species in mixed stands as monitored by the timing and intensity of pollen production. *Forest Ecology and Management.* 256: 1546–1551.

- Vázquez Villagran M. A. 1992. El género *Quercus* (Fagaceae) en el estado de Puebla. *Tesis de Licenciatura. UNAM. México.*
- Villarreal M. 1986. Contribución al conocimiento del género *Quercus* en el estado de Jalisco. *Universidad Autónoma de Guadalajara.*
- Walker P, Cocks K. 1991. Habitat: A procedure for modelling a disjoint environmental envelope for a plant or animal species. *Global. Ecol. Biogeogr. Lett* 1: 108–118.
- Wang, J. 2005 Monitoring and managing genetic variation in group inbreeding populations without individual pedigrees. *Conserv. Genet.* 5: 813–825.
- Weir BS, Cokerham CC. 1982. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution.* 38: 1358-1370.
- Whittemore AT, Schaal B. 1991. Interspecific gene flow in sympatric oaks. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 88: 2540-2544.
- Widmer A, Lexer C, Cozzolino S. 2009. Evolution of reproductive isolation in plants. *Heredity* 102: 31-38.
- Williams JH, Boecklen WJ, Howard DJ. 2001. Reproductive processes in two oak (*Quercus*) contact zones with different levels of hybridization. *Heredity* 87: 680-690.
- Wright S. 1943. Isolation by distance. *Genetics.* 28: 114–138.
- Yacine A, Bouras F. 1997. Self- and cross- pollination effects on pollen tube growth and seed set in holm oak *Quercus ilex* L (Fagaceae). *Ann Sci For.* 54: 447-462.
- Yacine A, Lumaret R. 1988. Distribution spatiale des génotypes dans une population de chêne vert (*Quercus ilex* L), flux génique et régime de reproduction. *Genet Sel Evol* 20, 181-198.
- Zavala-Chavéz F. 1995. Consideraciones ecológicas del los encinos del Parque Nacional El Chico, Hidalgo. pp. 98-112. En: III Seminario sobre la utilización de Encinos, Linares, N.L. del 4 al 6 de noviembre de 1992. *Memorias (Tomo I). Facultad de Ciencias Forestales. Universidad Autónoma de Nuevo León.*

## APENDICE I

### Extracción de DNA por el método DNeasy Plant Kit (QIAGEN).

1. Moler con nitrógeno líquido un fragmento de hoja de 2 X 2cm hasta obtener un polvo fino y transferir el polvo a un tubo eppendorf de 1.5ml (se obtienen aproximadamente 500 a 800ml de volumen de polvo).
2. Agregar 400µl de la solución AP1 y 2µl de RNasa A. Agitar con vórtex 10 segundos e incubar a 65° C durante 10min. Agitar 2 o 3 veces durante la incubación.
3. Agregar 130µl de la solución AP2 e incubar 5min en hielo.
4. Centrifugar 15min a 14,000rpm.
5. Transferir el sobrenadante a la columna lila (shedder).
6. Centrifugar 2min a 14,000rpm.
7. Recuperar el filtrado y transferir a un tubo eppendorf de 1.5ml, cuidando de no tomar cualquier pastilla de filtrado que llegara a formarse. Se obtienen de 400 a 450µl de filtrado.
8. Agregar 1.5 volúmenes de la solución AP3E (binding buffer) al tubo eppendorf (aproximadamente 625µl) e invertir varias veces.
9. Agregar 750µl de la mezcla a la columna blanca y centrifugar 1min a 8,000rpm. Decantar el filtrado.
10. Agregar el resto de la mezcla a la columna blanca y centrifugar 1min a 8,000rpm. Decantar el filtrado.
11. Agregar 500µl de la solución AW a la columna blanca y centrifugar 1min a 8,000rpm. Para el lavado de DNA.
12. Agregar 500µl de la solución AW a la columna blanca y centrifugar 2min a 14,000rpm. Para secar la membrana.
13. Transferir la columna blanca a un tubo eppendorf de 1.5ml
14. Agregar 100µl de la solución AE preincubada a 65° C e incubar 5min y centrifugar 1min a 8,000rpm para eluir el DNA.
15. Repetir paso anterior y almacenar a -20° C.