

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

Área Académica de Biología

**Variabilidad y estructura genética poblacional de *Fagus grandifolia*
subsp. *mexicana* en la Sierra Madre Oriental, México**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LIC. EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

Diego Armando Meléndez Aguilar

Director de tesis: Dr. Arturo Sánchez González

Codirector de tesis: Dr. Pablo Octavio Aguilar

Mineral de la Reforma, Hidalgo, noviembre de 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
School of Engineering and Basic Sciences
Área Académica de Biología
Department of Biology

Fecha: 21 de septiembre de 2020
Asunto: Autorización de impresión de Tesis.

M. EN C. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR, UAEH
P R E S E N T E

Con base en lo establecido en el artículo 40, Capítulo I del Título Cuarto del Reglamento de Titulación, le comunico que el Jurado asignado al pasante de Licenciatura en Biología **Diego Armando Meléndez Aguilar**, quien presenta el trabajo recepcional de tesis titulado "**Variabilidad y estructura genética poblacional de *Fagus grandifolia* subsp. *mexicana* en la Sierra Madre Oriental, México**", ha decidido autorizar la impresión del mismo, después de revisarlo en reunión de sinodales, hechas las correcciones acordadas.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE: Dr. Luis Fernando Rosas Pacheco

SECRETARIO Dr. Pablo Octavio Aguilar

PRIMER VOCAL: Dr. Arturo Sánchez González

SUPLLENTE: Dra. Dulce María Galván Hernández

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi más atenta consideración.

A T E N T A M E N T E

M. en C. MAGDALENA MEZA SÁNCHEZ
COORDINADORA ADJUNTA DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGÍA



Ciudad del Conocimiento
Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia Carboneras
Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42184
Teléfono: +52 (771) 71 720 00 ext. 6640, 6642 Fax 2112
aab_icbi@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx

AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente al Doctor Arturo Sánchez González por su esfuerzo, dedicación y paciencia en la elaboración de este trabajo, por sus valiosas enseñanzas y por confiar en mí.

Al Doctor Pablo Octavio Aguilar por su apoyo y dedicación en el desarrollo del trabajo de laboratorio.

Al Maestro en Ciencias Mario Adolfo García Montes por su paciencia, su ayuda y sobre todo por guiarme en el desarrollo del trabajo en el laboratorio compartiendo sus conocimientos además por la amena compañía que hace con los estudiantes.

Al Doctor Luis Fernando Rosas Pacheco por permitirme acceder a sus áreas y equipos necesarios para el desarrollo de este trabajo.

A mis padres Bertha y Miguel por sus atenciones, por su confianza y su apoyo en todo momento, por escuchar mis pláticas sobre mi trabajo y la motivación que siempre me dieron.

Al CONACYT por la beca otorgada para la realización de este trabajo, dentro del proyecto básico titulado “Efecto del cambio climático sobre poblaciones relictas de árboles: integrando dendrocronología y genética de poblaciones”, con clave CB-2016/284484.

A mis amigos Daniel y Kenyi por su compañía y ayuda además permitían compartirles mi trabajo.

CONTENIDO	
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES.....	4
El bosque mesófilo de montaña	4
Distribución del género <i>Fagus</i>	5
<i>F. grandifolia</i> subsp. <i>mexicana</i>	6
Variación genética en las poblaciones vegetales.....	8
Técnicas moleculares en genética de poblaciones vegetales.....	9
Estudios de genética de poblaciones en <i>Fagus</i>	12
Estudios de genética de poblaciones en <i>F. grandifolia</i>	13
Los bosques de <i>Fagus</i> y el cambio climático.....	15
JUSTIFICACIÓN	16
HIPOTESIS	17
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
MÉTODO.....	19
Área de estudio	19
Colecta del material	21
Trabajo de laboratorio	21
Extracción de DNA.	21
Análisis de datos	24
RESULTADOS.....	27
Diversidad genética	27
Estructura genética	30
Cuellos de botella	34
Diversidad genética y condiciones ambientales	35
DISCUSIÓN	36
Diversidad genética	36
Estructura genética	38
Diversidad genética y condiciones ambientales	40
CONCLUSIONES	43
ANEXO.....	45
Permiso de colecta.....	45
LITERATURA CITADA.....	50

RESUMEN

En los bosques mesófilos de montaña de México, existen pocos sitios con microambientes adecuados para el desarrollo de una asociación vegetal particular, el bosque de haya, cuyo dosel es dominado por *Fagus grandifolia* subsp. *mexicana*; las poblaciones de esta especie se encuentran dispersas en parches menores de 140 ha en algunos estados del país, por lo que son altamente vulnerables a cambios climáticos y a la reducción de su hábitat. Hasta ahora, los estudios sobre variación genética de *F. grandifolia* subsp. *mexicana* se han realizado entre poblaciones cercanas geográficamente, pero no se han estudiado a lo largo de su área de distribución, dentro de la Sierra Madre Oriental de México. En el presente estudio se analizó la estructura genética de 5 poblaciones de esta especie, mediante seis marcadores moleculares SSR, desarrollados para *F.*. Los resultados obtenidos indican que la estructura poblacional está determinada por eventos de colonización sucesiva de norte a sur y eventos de reducción poblacional en los extremos de su distribución, que ha potenciado el efecto de la endogamia. La diversidad genética de la especie es alta al norte de su distribución y se reduce casi a la mitad en el resto de las localidades con distribución más sureña. Los datos obtenidos representan información básica que puede ser utilizada en el manejo y conservación de la especie y, por ende, de los bosques de haya que conforma, a corto o mediano plazo.

INTRODUCCIÓN

El género *Fagus* está conformado por 11 especies arbóreas, que se distribuyen en el hemisferio norte: *F. crenata*, *F. engleriana*, *F. grandifolia*, *F. hayatae*, *F. japonica*, *F. longipetiolata*, *F. lucida*, *F. multinervis*, *F. orientalis* y *F. sylvatica*; que se caracterizan por ser caducifolias, con una altura de entre 25 y 40 m, corteza lisa y pálida, y hojas dentadas. Los bosques de haya, cuyo dosel es dominado por alguna especie de *Fagus*, cubren grandes extensiones del oeste de Europa, este de Asia y este de Norteamérica (Peters, 1997; Hokusima et al., 2013). En la región Neotropical, dentro de la zona ecológica templada húmeda de la Sierra Madre Oriental de México, existen pequeños fragmentos aislados de bosque de haya, donde predomina el taxón endémico *F. grandifolia* subsp. *mexicana* (Peters, 1997; Denk y Grimm, 2009; Rodríguez-Ramírez et al., 2013).

En general, los bosques de haya del planeta se desarrollan en regiones que reúnen condiciones ambientales particulares (Fang y Lechowicz, 2006; Hokusima et al., 2013); en los trópicos están restringidos a laderas de montañas, en donde las condiciones ambientales que predominan son templadas a frías y con lluvia moderada. El sustrato óptimo para los hayedos es el suelo franco, moderadamente ácido compuesto por arcilla, arena y limo (Peters, 1997; Rodríguez-Ramírez et al., 2016).

El bosque de haya de México (asociación vegetal cuyo dosel es dominado por *F. grandifolia* subsp. *mexicana*), es el de distribución más sureña, dentro de los bosques dominados por alguna especie de *Fagus* en el planeta (Denk y Grimm, 2009). Se considera como una de las asociaciones vegetales características del Bosque Mesófilo de Montaña

(BMM), con distribución restringida a zonas montañosas en un intervalo altitudinal de entre 1,400 y 2,000 m, en laderas orientadas al norte, con pendientes de más de 75%, donde la precipitación pluvial anual es mayor de 1,000 mm (Williams-Linera et al., 2003 Ruiz-Jiménez et al., 2012; Ortiz-Quijano et al., 2016; Rodríguez-Ramírez et al., 2016).

Las poblaciones de haya mexicana se caracterizan por presentar densidad baja, alta especificidad ambiental (vulnerabilidad al cambio climático) y distribución fragmentada a causa de la pérdida de su hábitat (Vargas-Rodríguez et al., 2010; Rodríguez-Ramírez et al., 2013; Ortiz-Quijano et al., 2015, 2016), por lo que se consideran en “peligro de extinción” en la legislación nacional (SEMARNAT, 2010). En cambio, a nivel de especie, se encuentra en la categoría de “preocupación menor” (LC), en la lista roja de la IUCN (International Union for Conservation of Nature), por su amplia distribución y cobertura en Norteamérica por arriba de los 31° de latitud (Barstow, 2017).

La variabilidad genética permite que las especies se adapten a los cambios ambientales y evolucionen, por lo que si disminuye afecta su eficiencia reproductiva y supervivencia (Frankham et al., 2012). La perturbación ambiental genera altos niveles de estrés en las poblaciones vegetales e incrementa su variación genética, por la reducción del tamaño poblacional (cuellos de botella, efecto fundador) o por efecto de la selección natural (Schlichting, 2004, Frankham et al. 2012).

Los estudios de genética de poblaciones en *Fagus* se han centrado principalmente en la evaluación de la variabilidad genética y la influencia del cambio climático sobre su distribución, en particular en *F. crenata*, *F. grandifolia* y *F. sylvatica*. Los estudios de

variabilidad genética en *F. grandifolia* subsp. *mexicana* coinciden en que sus poblaciones presentan altos niveles de diferenciación y baja diversidad genética a causa de la escasa densidad de individuos, aislamiento geográfico, alto grado de perturbación de su hábitat y variación ambiental local (Rowden et al., 2004; Montiel-Oscura et al., 2013; Galván-Hernández et al., 2020). Sin embargo, hasta ahora la estimación de la variación genética de las poblaciones de este taxón se ha restringido a pocas poblaciones locales, es decir, no han incluido toda su área de distribución geográfica conocida dentro de la Sierra Madre Oriental, México.

ANTECEDENTES

El bosque mesófilo de montaña

Este ecosistema tiene una distribución fragmentada en las regiones montañosas y húmedas del país, su límite norte se encuentra en el estado de Nuevo León; al oeste se localiza desde Sinaloa hasta Chiapas; se encuentra en algunas zonas dentro de la Faja Volcánica Transmexicana y su distribución más oriental es en una pequeña área en el municipio de Huimanguillo, Tabasco (Almeida-Cerino, 2008). Además, incluye varias asociaciones vegetales transicionales de las montañas húmedas tropicales y subtropicales entre los 1,500 y 2,500 m de altitud, y asociaciones cuya distribución se extiende muy por debajo de los 600 m o hasta los 3,200 m de altitud, debido al efecto de la topografía en algunas regiones del país (Toledo-Aceves et al., 2011; Leal-Jiménez, 2014).

La distribución discontinua del BMM permite que se desarrolle en suelos derivados de una amplia variedad de sustratos geológicos (sedimentarios, graníticos y basálticos) y en

cañadas protegidas por el viento y la insolación, así como en laderas expuestas a vientos con mucha humedad; a causa de estos factores geológicos y topográficos, el BMM presenta una incidencia alta de especies endémicas, posiblemente paleo-endemismos que han persistido en microhábitats que no han cambiado mucho a través del tiempo (Téllez-Valdez et al., 2006; Ruiz-Jiménez et al., 2012).

Tomando en cuenta las cualidades que distinguen al BMM, es evidente que alberga una gran diversidad biológica, según Rzedowski (1996) la flora de este tipo de vegetación destaca por la abundancia y diversidad de epífitas, trepadoras leñosas, pteridofitas, árboles, bejucos, arbustos y plantas herbáceas; que en su conjunto llegan a formar parte importante de la biomasa de la comunidad. El mismo autor estima que la diversidad de plantas puede ser de cerca de 2,500 especies. Recientemente, Villaseñor (2010), usando una definición más amplia que la de otros autores, reportó cifras mayores de especies restringidas a lo que él denominó “bosque húmedo de montaña” (2,822 especies, 815 géneros y 176 familias). Esta estimación indica, en términos muy generales, la presencia de 10% de las especies, 52% de los géneros y 82% de las familias conocidas en la flora mexicana, unas 27,000 especies (Villaseñor, 2010). Dentro de esta inmensa riqueza, las especies de la familia Fagaceae, particularmente los géneros *Quercus* y *Fagus* son elementos importantes y distintivos de la composición arbórea de este ecosistema.

Distribución del género *Fagus*

La distribución de *Fagus* en el planeta ha cambiado a través del tiempo, primero desde su centro de diversificación en el sureste de China (Yu-Sheng et al., 1998; Denk y Grimm,

2009), hace 100 a 66 Ma, después en Europa durante el Mioceno y Plioceno (24 a 1.6 Ma), hasta alcanzar el norte del Continente Americano, donde se han encontrado registros desde el Eoceno, hace 45 Ma. La amplitud de distribución que presentaba este género en el pasado, probablemente se redujo por la deriva continental, la competencia entre especies y el cambio climático (Gang y Junging, 1998; Denk y Grimm, 2009).

Actualmente, las especies de *Fagus* se distribuyen de forma disyunta a nivel global en las zonas templadas del hemisferio norte; en el este de Asia: *F. engleriana*, *F. hayatae*, *F. longipetiolata* y *F. lucida*, en China; *F. crenata* y *F. japonica* en Japón y *F. multinervis* en Corea. También existen dos especies en Europa y Asia, *F. orientalis* y *F. sylvatica* (Denk y Grimm, 2009; Rose et al., 2009; Milad et al., 2011), y una en América del Norte, *F. grandifolia* cuyas poblaciones se extienden desde el este de Canadá y Estados Unidos de América, hasta la Sierra Madre Oriental de México, donde se distribuye el taxón endémico *F. grandifolia* subsp. *mexicana* con poblaciones restringidas a los estados de Hidalgo, Puebla, Nuevo León, San Luis Potosí, Tamaulipas y Veracruz (Peters, 1997; Rodríguez-Ramírez et al., 2013).

***F. grandifolia* subsp. *mexicana*.**

En México las poblaciones de haya ocupan un área aproximada de 144.54 ha, la asociación vegetal que conforman se distribuye de forma fragmentada en parches que varían desde <1 hasta 45 ha en superficie (Rodríguez-Ramírez et al., 2013). La composición florística y la estructura del bosque de haya se correlaciona con las condiciones micro ambientales; Ohsawa (1990) y Rodríguez-Ramírez et al. (2013, 2016) mencionan que la humedad del

suelo, la temperatura ambiental, la cantidad de hojarasca y el pH son factores, que pueden influenciar dicha estructura.

En nuestro país se han encontrado alrededor de 10 localidades con bosque de haya (Figura 1), todas ellas dentro de la Sierra Madre Oriental, en los estados de Hidalgo, Nuevo León, Puebla, San Luis Potosí, Tamaulipas y Veracruz (Miranda y Sharp, 1950; Hernández et al., 1951; Fox y Sharp, 1954; Little, 1965; Puig et al., 1983; Williams Linera et al., 1996; Rodríguez-Ramírez et al., 2013). Al parecer, tres localidades donde se tenían registros de este bosque, han desaparecido por el cambio de uso de suelo (Williams Linera et al., 2003).

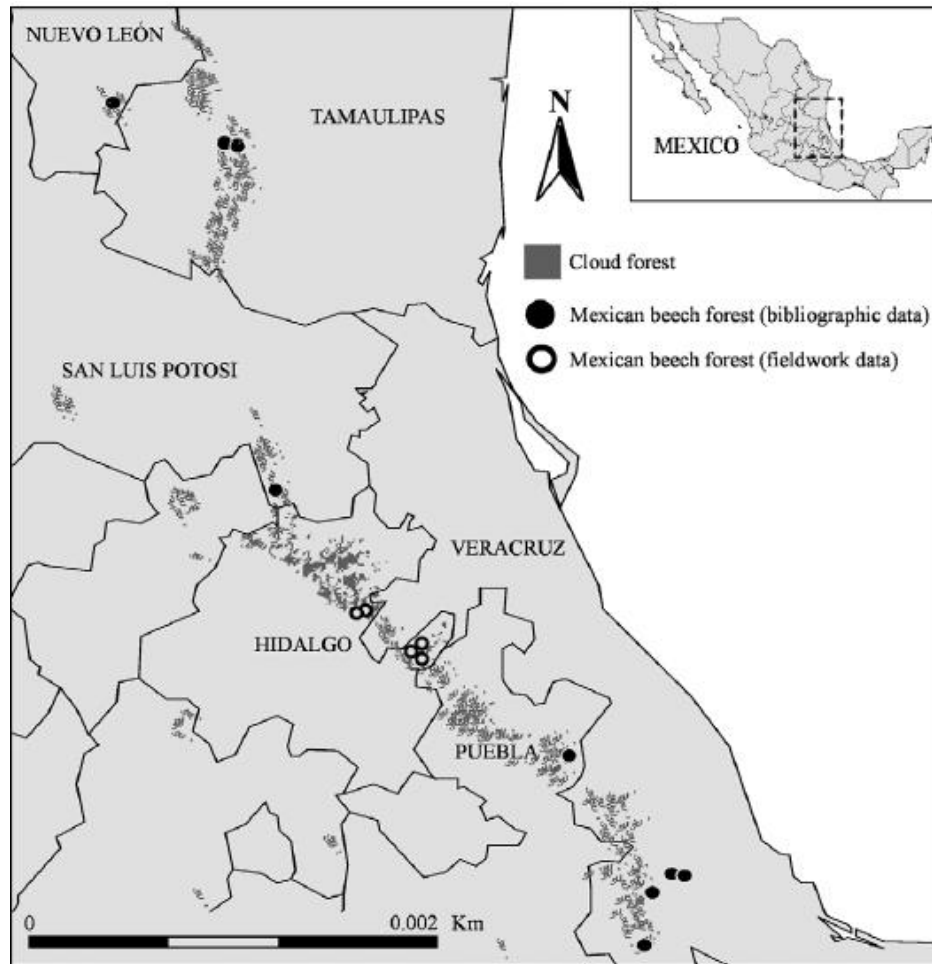


Figura 1. Distribución actual de los hayedos en México. Tomado de: Rodríguez-Ramírez et al. (2013).

Variación genética en las poblaciones vegetales

La variación genética es una condición sin la cual la evolución no es posible, o la selección natural y por tanto la vida como la conocemos. La evolución es un proceso por el que la variación dentro de las especies se transforma en el espacio y el tiempo en variación entre

especies, es un proceso de cambio generacional y la genética de poblaciones es la disciplina biológica que proporciona los principios teóricos de la evolución (Barbadilla, 2010). Se parte del supuesto de que los cambios evolutivos a pequeña escala, los que surgen en las especies, dan pauta para una evolución a gran escala, lo que hace que la variación genética en los individuos que forman las poblaciones sea esencial para la permanencia de las especies. Para estudiar esta variación, la genética de poblaciones se apoya de distintas técnicas moleculares que permiten el análisis preciso de esta diversidad y evidencian polimorfismos, los cuales resultan útiles como marcadores genéticos. Sin embargo, incluso las herramientas moleculares tienen sus limitaciones pues en la mayoría se evalúan solo una pequeña muestra de genes o loci. Aun así, generalmente se encuentra suficiente variación en las muestras de genes para que sea posible contrastar la variación entre las poblaciones (Becerra y Paredes 2000; De Vicente et al., 2004).

Técnicas moleculares en genética de poblaciones vegetales

Isoenzimas. De acuerdo con Nasser y Piñero (1997), las isoenzimas como marcadores moleculares han desempeñado un papel fundamental en diferentes disciplinas botánicas. Las isoenzimas fueron originalmente definidas como formas moleculares múltiples de las enzimas que tienen funciones idénticas o similares y están presentes en el mismo individuo (Markért y Moller, 1959). Estos marcadores pueden presentar varias formas alélicas en un locus en particular, las cuales se conocen como aloenzimas (Prakash, et al., 1969). En su mayoría estas aloenzimas son selectivamente neutras y se utilizan como marcadores hereditarios para cuantificar las frecuencias alélicas y genotípicas de los individuos, que son los estimadores básicos de la composición genética de una población.

Marcadores moleculares. De acuerdo con Becerra y Paredes (2000), el polimorfismo basado en proteínas ha sido de gran utilidad en las investigaciones realizadas en plantas. Con el desarrollo de las tecnologías basadas en DNA, se dispone de distintos marcadores como aquellos basados en Fragmentos de Restricción Polimórficos (RFLP) y en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Estos han derivado en múltiples técnicas como son la Amplificación de DNA al azar (RAPD), Fragmentos Polimórficos de DNA Amplificados (AFLP) y microsatélites (SSR).

a) Fragmentos de Restricción Polimórficos (RFLP)

Los RFLPs permiten estudiar el genoma con una mayor cobertura al incluir secuencias codificantes y no-codificantes (exones, intrones y segmentos silenciados por metilación). Esto permite detectar con mayor eficiencia cambios genéticos puntuales, comparado con las proteínas (Wang et al., 1992). La técnica está basada en la digestión del DNA total de un individuo con diferentes enzimas de restricción. Esta restricción produce fragmentos para una molécula de DNA en particular, los fragmentos resultantes son separados por electroforesis en geles de agarosa y transferidos por capilaridad a una membrana de nylon (Southern Blot).

b) Fragmentos Polimórficos de DNA Amplificados al Azar (RAPD).

A partir de la PCR se han desarrollado técnicas como la de Fragmentos Polimórficos de DNA Amplificado al Azar (RAPD). Esta técnica usa primers aleatorios para amplificar el DNA (Williams et al., 1990). Los productos de la amplificación son separados mediante electroforesis y las bandas visualizadas, de diferente peso molecular, representan diferentes

loci. En algunas especies, la técnica da la opción de usar dos o más primers dentro de la misma reacción para aumentar el número de bandas, logrando una mayor cantidad de información por reacción.

c) Fragmentos Polimórficos de DNA Amplificados (AFLP)

En esta técnica basada en el método de PCR se combinan los principios de los RFLP y PCR, donde una submuestra de fragmentos producidos por la restricción del DNA bajo estudio es amplificada selectivamente en cascada. Así se puede detectar una variación considerable del genoma, lo cual se refleja en el número de productos amplificados con una sola combinación de primers. La eficiencia en detectar polimorfismos puede ser varias veces mayor que la obtenida con RAPD y RFLP (Vos et al., 1995).

d) Microsatélites (SSR)

Son secuencias de 1 a 5 nucleótidos repetidos en tándem y existen en forma abundante en plantas (Condit y Hubbell, 1991). Mediante los microsatélites se puede medir la diversidad entre genotipos amplificando mediante PCR para la región del DNA genómico que contiene estas secuencias repetidas. En general, la amplificación de microsatélites ha demostrado que son más variables que las isoenzimas, RFLP, AFLP y RAPD. Además de ser más conservados por lo que no existe variación aleatoria o inespecífica.

Cuadro 1. Características generales de los marcadores utilizados en genética de poblaciones. Modificado de Becerra y Paredes (2000).

Característica	Isoenzimas	RFLP	RAPD	AFLP	SSR
Polimorfismo	Bajo	Bajo-alto	Medio-alto	Medio-alto	Alto
Estabilidad ambiental	Moderada	Alta	Alta	Alta	Alta
Número de loci	Medio	Alto	Alto	Alto	Alto
Reproducibilidad	Moderada-alta	Alta	Moderada- alta	Alta	Alta
Aplicación	Rápida-barata	Lenta- cara	Rápida- cara	Lenta- cara	Lenta- cara

RFLP: Fragmentos de restricción polimórficos, RAPD: Amplificación de ADN al azar, AFLP: Amplificación de fragmentos polimórficos, SSR: Secuencias simples repetidas.

Estudios de genética de poblaciones en *Fagus*

Merzeau et al. (1994) emplearon AFLPs para analizar la estructura genética de *F. sylvatica* con distintos loci específicos, en árboles adultos y juveniles, observaron un déficit de heterocigosis en adultos y un alto nivel de heterocigosis en juveniles, que pudo ser causado por reproducción moderada entre parientes. Pluess y Weber (2012) emplearon la misma técnica para evaluar la adaptación y variabilidad genética en *F. sylvatica*, lo que les permitió sugerir que, en distancias geográficas cortas, se generan procesos micro evolutivos tales como la adaptación rápida a la sequía (favorecidos por la longevidad de los árboles),

lo cual permite que los genes responsables de esta adaptación se propaguen rápidamente en la población, pero que promueve una menor variación genética en los sitios más secos.

El uso de aloenzimas, que difieren en la secuencia de aminoácidos de otras formas de la misma enzima y están codificadas por un alelo en un locus individual, fueron empleadas por Kitamura et al. (1997) para el análisis de la variabilidad genética de *F. crenata*. Posteriormente, Vornman et al. (2004) analizaron la variación genética en *F. sylvatica*, usando nueve marcadores SSR diseñados para *F. crenata* de los cuales únicamente tres mostraron amplificación polimórfica con diferente número de alelos; de acuerdo con los autores, la nula amplificación en los otros marcadores se debió principalmente a que estas secuencias polimórficas no siempre se comparten entre especies del mismo género.

En un estudio más reciente, Piotti et al. (2013) compararon la estructura genética entre poblaciones de *F. sylvatica* en ambientes perturbados empleando marcadores SSR, los cuales permiten la distinción entre homocigotos y heterocigotos. Además, por su amplia distribución en el genoma, su reproducibilidad y elevada variabilidad (multi-alélicos), se han convertido en uno de los sistemas de marcadores genéticos más informativos y utilizados. Estos resultados ponen de manifiesto que la especie *F. sylvatica* es el referente para la evaluación de la diversidad genética en el género.

Estudios de genética de poblaciones en *F. grandifolia*

Se han realizado varias investigaciones para estimar la variabilidad genética de *F. grandifolia*. Houston y Houston (1994) analizaron la variación genética con el uso de

isozimas en loci específicos; posteriormente Kitamura y Kawano (2001) analizaron los patrones geográficos de diferenciación genética para esta especie usando aloenzimas y su interpretación genotípica. Rowden et al. (2004), encontraron diferenciación significativa entre poblaciones de *F. grandifolia* en México y USA, utilizando marcadores RAPDs, RFLP y haplotipos de cpDNA; también identificaron que existe una correlación positiva entre la diversidad genética y el tamaño efectivo poblacional, por lo que las poblaciones pequeñas del centro del país son prioritarias para la conservación y este indicador es importante para evaluar la adecuación de la especie. Koch et al. (2009) estimaron, mediante el uso de seis marcadores microsatélites, que existe un alto grado de entrecruzamiento en las poblaciones de *F. grandifolia* de Estados Unidos de América (EUA), lo cual explica la alta diversidad genética de la especie. En contraste, Montiel-Oscura et al. (2013) encontraron, mediante el uso de aloenzimas, que la diversidad genética en *F. grandifolia* subsp. *mexicana* es moderada y no está correlacionada con el tamaño poblacional.

Los resultados de los estudios realizados con *F. grandifolia* subsp. *mexicana*, coinciden en que las poblaciones presentan altos niveles de diferenciación y baja diversidad genética a causa de la escasa densidad de individuos, aislamiento geográfico, alto grado de perturbación de su hábitat y variación ambiental local (Rowden et al., 2004; Montiel-Oscura et al., 2013; Galván-Hernández et al., 2020). Acorde con lo anterior, Kitamura et al. (2008) refieren que es probable que el intercambio genético entre poblaciones de *F. grandifolia* de EUA sea mínimo o nulo, porque la dispersión del polen y semillas ocurre solo en distancias cortas, de aproximadamente 1.17 ha.

Los bosques de *Fagus* y el cambio climático

Debido al cambio climático, los bosques están expuestos a modificaciones ambientales, como por ejemplo el aumento de la temperatura y la disminución de la precipitación. Para que las especies que conforman estos bosques logren adaptarse requieren, entre otros factores, que exista suficiente variabilidad genética en sus poblaciones. Se han realizado algunos estudios con la finalidad de analizar el efecto del cambio climático en bosques de *Fagus*. Pluess y Weber (2012) mencionan que la disponibilidad de humedad que se ha visto alterada por cambios ambientales está relacionada con la variación genética de las especies; Burger et al. (2018) analizaron la transferibilidad de la variación genética en *F. orientalis*, *F. sylvatica* y *Quercus labra*, para definir si se conserva en locus específicos compartidos entre especies. En su trabajo emplearon marcadores SSR diseñados para *F. grandifolia* encontrando semejanzas entre especies con cambios en el número de pares de bases de los locus compartidos, lo cual indica que han ocurrido cambios en la misma información genética en las tres especies como resultado de la variación ambiental.

Kramer et al. (2010) realizaron proyecciones a futuro para estimar los efectos del cambio climático sobre poblaciones de *F. sylvatica* en Europa, en especial sobre su rango de distribución y la estabilidad en su variación genética, encontrando que tiene potencial para ampliar su distribución y mantener la variación genética durante dos o tres generaciones más.

Dado que los árboles son las especies dominantes en los ecosistemas forestales, existe interés en definir cómo responden a los efectos del cambio climático, pues son capaces de mantener el flujo genético a largas distancias, lo cual puede promover evolución adaptativa en nuevos entornos (Kremer et al., 2012). Sin embargo, este flujo puede interrumpirse en especies de árboles con tiempos de generación largos y en aquellos que tienen poca variación a causa de sus tamaños poblacionales reducidos. En otro estudio, Gailing et al. (2019), encontraron que las plántulas de *F. sylvatica* son capaces de resistir diferentes condiciones de humedad, temperatura ambiental y sustrato de crecimiento, demostrando su capacidad adaptativa ante los efectos del cambio climático global.

JUSTIFICACIÓN

El BMM de México es uno de los ecosistemas con mayor diversidad biológica en la región Neotropical, aunque se caracteriza por su escasa cobertura (ocupa sólo 18,534 km² del territorio nacional, lo que equivale al 1% del total) y vulnerabilidad por distribuirse en parches aislados en las zonas húmedas de solo 20 estados del país (CONABIO, 2010). El BMM se considera el ecosistema terrestre más amenazado a nivel nacional, debido al cambio de uso del suelo y por los efectos derivados del cambio climático global (González-Espinosa et al., 2012; Ruiz-Jiménez et al., 2012; Leal-Jiménez et al., 2014).

Dentro del BMM, en pocas localidades que se caracterizan por poseer condiciones micro ambientales específicas, se desarrolla una asociación vegetal relictas, el bosque de haya o hayal, cuya especie dominante en el dosel, *F. grandifolia* subsp. *mexicana*, está incluida en la NOM-059-2010 (SEMARNAT, 2010), como endémica y en peligro de

extinción. Por fortuna, las poblaciones de este taxón no se explotan comercialmente desde 1940, año en el que se impuso la veda; pero existe interés por iniciar nuevamente esta actividad (Pérez, 1994; Ortiz-Quijano et al., 2015).

Hasta ahora, los estudios sobre la variación genética de *F. grandifolia* subsp. *mexicana*, se han realizado en poblaciones cercanas entre sí (Rowden et al., 2004; Montiel-Oscura et al., 2013; Galván-Hernández et al., 2020), por lo que incluyen solo una parte de su área de distribución geográfica en México y, por consiguiente, solo una parte de la variación genética del taxón. En este trabajo se analizó la variabilidad genética de distintas poblaciones de *Fagus*, a lo largo de su área de distribución geográfica en el país, con la finalidad de obtener información básica para el manejo y conservación de la especie y de los bosques de haya que conforma, a corto o mediano plazo.

HIPOTESIS

Las diferencias en la variabilidad genética y el tamaño efectivo de las poblaciones de *F. grandifolia* subsp. *mexicana*, podrían ser el resultado de las condiciones ambientales (v. gr. clima) en las que se han desarrollado a través del tiempo; por lo que el análisis genético de las poblaciones del haya mexicana permitirá corroborar si existe relación entre variabilidad y estructura genética, con respecto a los cambios ambientales asociados con la altitud y latitud a lo largo de su área de distribución en la Sierra Madre Oriental, México.

OBJETIVO GENERAL

Estimar la variación genética de las poblaciones de *F. grandifolia* subsp. *mexicana* y definir si dicha variación está relacionada con los cambios en las condiciones climáticas en el gradiente latitudinal y altitudinal que ocupan en los municipios de Aramberri (Nuevo León), Gómez Farías (Tamaulipas), Zacualtipán de Ángeles (Hidalgo) y Chiconquiaco (Veracruz), dentro de la Sierra Madre Oriental, México.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estimar la variación y estructura genética de las poblaciones de *F. grandifolia* subsp. *mexicana* a lo largo de su distribución geográfica en la Sierra Madre Oriental de México.
- Definir si la variabilidad genética de las poblaciones de *F. grandifolia* subsp. *mexicana*, está relacionada con el tamaño del área geográfica que ocupan.
- Analizar si la variabilidad genética de las poblaciones de *F. grandifolia* subsp. *mexicana*, está relacionada con los cambios en altitud y latitud (condiciones climáticas), a lo largo de su distribución geográfica en México.

MÉTODO

Área de estudio

El estudio se realizó en el BMM de Hidalgo, Nuevo León, Tamaulipas y Veracruz (Figura 1, Tabla 1), específicamente en Agua Fría (Aramberri, N.L); Ojo de Agua del Indio y El Salto (Reserva de la Biosfera el Cielo, Ejido Alta Cima, Gómez Farías, Tamaulipas), Las Guacamayas (Chiconquiaco, Veracruz) y La Mojonera (Zacualtipán, Hidalgo). Los sitios evaluados se localizan entre los 1332 y 1863 m snm y presentan gran variación en el tipo de suelo (Tabla 1).

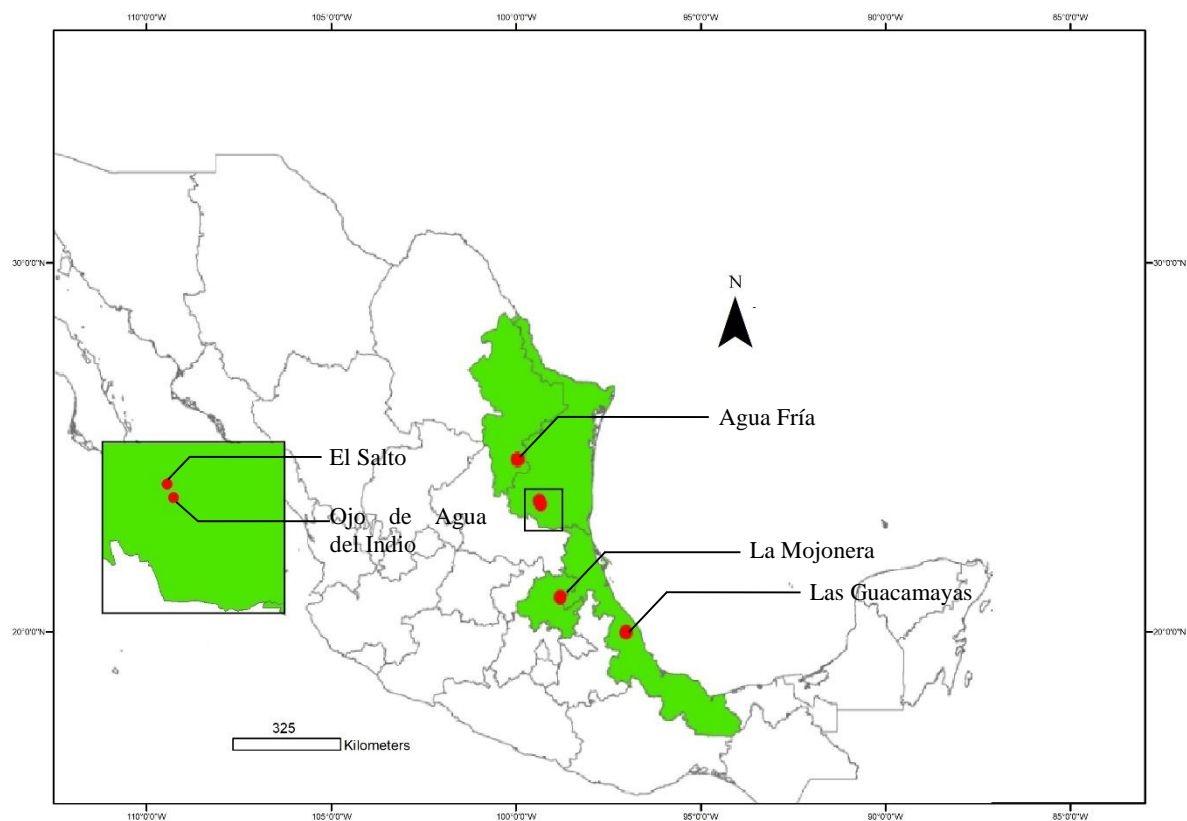


Figura 1. Localización geográfica de las poblaciones de *F. grandiolia* subsp. *mexicana* evaluadas.

Tabla 1. Características generales de las localidades donde se recolectaron las muestras de *F. grandifolia* subsp. *mexicana*. Datos tomados de INEGI (2009).

Localidad	Latitud y longitud	Intervalo altitudinal (m)	Altitud del sitio de colecta (m)	Intervalo de temperatura (°C)	PMA (mm)	Suelo dominante
Agua Fría, Aramberri, Nuevo León	24°06'00"N 99°49'00"O	600 - 3100	1830	12 - 20	300-1,000	Leptosol (65.0%), Calcisol (19.4%), Phaeozem (4.5%)
Ojo de Agua del Indio, Gómez Farías Tamaulipas	22°59'00"N 99°11'00"O	50 - 2,400	1332	14 - 26	900-1,300	Luvisol (37.6%), Vertisol (22.2%), Phaeozem (13.9%), Chernozem (10.5%), Leptosol (9.0%)
El Salto, Gómez Farías, Tamaulipas	23°04'08"N 99°13'04" O	50 - 2,400	1343	14 - 26	900-1,300	Luvisol (37.6%), Vertisol (22.2%), Phaeozem (13.9%), Chernozem (10.5%), Leptosol (9.0%)
La Mojonera Zacualtipán de Ángeles, Hidalgo	20° 38'24"N 98° 37'48"O	500 - 2300	1780	12 - 22	500-2600	Regosol (33.57%), Luvisol (27.0%), Acrisol (24.0%),
Las Guacamayas, Chinconquiaco, Veracruz	19°45'00"N 96°49'00"O	700 -2,300	1863	14 - 24	1,500-2,000	Andosol (96%) Luvisol (3%)

Colecta del material

Se colectaron entre 10 y 15 hojas jóvenes en buen estado de un total de 125 árboles adultos, es decir 25 individuos por localidad. Para evitar la coancestría, se consideró una distancia mínima de 25 m entre individuos. Las hojas se colocaron en bolsas de plástico con silica gel, para eliminar el exceso de humedad y evitar el crecimiento de hongos. Cada bolsa se etiquetó con el nombre de la población y el número de individuo, y se mantuvo a -20°C hasta su uso.

Trabajo de laboratorio

Extracción de DNA.

Para la preparación del tejido se seleccionó una hoja de cada individuo, se eliminó el exceso de silica y se realizó un lavado con agua destilada y alcohol. Para la extracción de DNA se usó el protocolo de Doyle & Doyle (1987) con modificaciones que se describe a continuación:

1. En un mortero se muelen 0.5 gr del tejido vegetal con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino.
2. Agregar 1ml de buffer CTAB 2x con β mercaptoetanol al 3% y seguir moliendo, recuperar el líquido en un microtubo de 1.5 ml.
3. Centrifugar a 8, 000 rpm durante 8 minutos.
4. Eliminar el sobrenadante y resuspender con 1ml de CTAB 2x sin β mercaptoetanol y homogeneizar.
5. Centrifugar a 9, 000 rpm durante 8 minutos.

6. Eliminar el sobrenadante y agregar 600 μ l de CTAB 2x con 10 μ l de RNasa e incubar 1 hora a 40 °C.
7. Agregar 10 μ l de Proteinasa K e incubar a 60 °C por 1 hora.
8. Agregar 600 μ l de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico (25:24:1) y agitar vigorosamente hasta homogeneizar.
9. Centrifugar a 10,000 rpm durante 10 minutos.
10. Trasladar 600 μ l del sobrenadante a un nuevo tubo.
11. Agregar 65 μ l de acetato de sodio pH 5.2 (3M), posteriormente agregar 2/3 del volumen final de isopropanol 100% helado, dejar una noche a -20° C para precipitar el DNA.
12. Centrifugar a 12, 000 rpm durante 10 min, decantar el sobrenadante sin perder la pastilla.
13. Limpiar el DNA agregando 1 ml de etanol al 70% y centrifugar a 14, 000 rpm.
14. Secar totalmente el DNA en el Speed Back (5 a 8 min).
15. Finalmente, re-suspender en 45 μ l de Buffer TE.

Para medir la cantidad de DNA por muestra se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm y se evaluó la integridad del material genético en gel de agarosa al 0.8%. Posteriormente, se prepararon alícuotas para mantener una concentración estandarizada de 40-50 μ g/ μ l y se almacenaron a -20°C para evitar la degradación del DNA.

Amplificación de los marcadores moleculares y electroforesis. Se evaluaron cuatro marcadores SSR desarrollados para *F. sylvatica*: TBN-24, TB-142, FS1-25 y FS1-03 (Pastorelli et al., 2003; Li-Ping et al., 2012), y dos para *F. grandifolia*: FG5 y FG7 (Koch et al., 2009). Cada uno fue preparado a una concentración de 10 μ M. La amplificación se realizó con un volumen de reacción de 8 μ l que contiene 1.6 μ l de MgCl₂ (25 μ M), 0.3 μ l del cebador forward y 0.3 μ l del reverse (10 μ M c/u), 0.3 μ l de dNTP'S(10 mM), 2.4 μ l buffer 5x, 0.9 μ l de agua ultra pura, 0.4 μ l (2 u) de Taq polimerasa (Promega GoTaq) y 2 μ l de DNA genómico (40-50 μ g/ μ l). Las especificaciones para la amplificación son: desnaturalización inicial 95 °C por 5 min, 33 ciclos de desnaturalización a 95 °C 40 seg, alineación de acuerdo al primer por 50 seg (Tabla 2), extensión 72 °C 1 min y una extensión final a 72 °C 10 min. Los productos de PCR se separaron usando geles de acrilamida al 15%, con electroforesis a 90 V durante 75 min, los geles se visualizaron en un transiluminador de luz UV, y los pesos moleculares se registraron con el programa Gel Analyzer (Lazar y Lazar, 2010), capturando el tamaño de pares de bases e intensidad de las bandas por individuo.

Tabla 2. Nombre del locus, secuencia de los primers, temperatura de alineamiento (T_a), alelos por locus obtenidos (A) y tamaño del marcador en pares de bases (pb).

Locus	Primer Forward 5' - 3'	Primer reverse 3' - 5'	T_a °C	A	Pb
TBN-24	GATGGTGATAACTG AGTGAG	CTAGCTTGTCGCTCTA TGC	58 °C	6	201-222
TBN-142	GGCATGCTTGGA CCGAG	CCTTAGGTCTTCTTCA CCGA	60 °C	5	240-291
FS1-25	GACCCATACCTCTCA GCTTC	AGAGATCATTGCAAC CAAAC	54 °C	7	69-84
FS1-03	CACAGCTTGACACAT TCCAAC	TGGTAAAGCACTTTTT CCCCT	62 °C	6	94-104
FG5	ACTGGGACAAAAA ACAAAACA	AATGCAATATCTCCAG GGC	56 °C	5	203-243
FG7	AAATAGTATGGTTAT GTGC	ACACTATTAGTTGTCT TGA	50 °C	6	79-108

Análisis de datos

Diversidad genética. La cantidad de alelos fue depurada por probabilidad Poisson, considerando la eliminación de los alelos nulos al presentar frecuencias menores de 5%, lo que permitió eliminar errores de genotipado, incluyendo alelos no amplificados. Con los datos obtenidos, se calcularon las frecuencias génicas, para determinar el promedio de muestras amplificadas por locus/localidad (N), el promedio de alelos por locus/localidad (A), el número efectivo de alelos por locus/localidad (N_e), el índice informativo de Shannon para cada iniciador (I), la heterocigosis observada y esperada (H_o y H_e respectivamente), el coeficiente de fijación (F) y el equilibrio de Hardy-Weimberg, utilizando el programa GenAEx v.6.5 (Peakall y Smouse, 2006), el cual considera una

prueba de χ^2 modificada para la comparación. Además, se estableció la cantidad de alelos exclusivos por población, medida indirecta de la fijación por deriva génica.

Estructura genética. Con el mismo programa, (GenALEx v.6.5), se evaluó la distribución de la variabilidad genética dentro y entre localidades analizadas calculando los índices de diferenciación/endogamia (FIT, FIS, FST), para determinar el número de migrantes por generación (Nm) de forma pareada (Slatkin, 1993). Se realizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA), asumiendo un modelo de alelos infinitos con 999 permutaciones (Excoffier et al., 1992). Adicionalmente, se establecieron las distancias de Nei para marcadores hipervariables, con lo que se construyó un árbol de divergencia genética mediante el algoritmo Neighbour-Joining, con el programa Past v2.3 (Hammer et al., 2001).

Para establecer la cohesión genética entre los individuos dentro de las poblaciones, se realizó un análisis de asignación basado en el modelo de Monte Carlo, considerando 50,000 permutaciones y 50,000 pasos de asignación por Bootstrap, bajo el modelo ancestral *admixture*, en el cual los individuos en la muestra son asignados a dos o más poblaciones si sus genotipos indican que se mezclan y así, cada individuo representa una fracción de su genoma dentro de cada grupo los cuales pueden tener un origen mixto. El modelo de frecuencias alélicas que se utilizó fue el independiente que asume frecuencias alélicas altamente divergentes entre poblaciones. Estos modelos consideran *a priori* la identidad de procedencia de los individuos y los asigna a grupos hipotéticos, en este caso se utilizó de 2 a 10 grupos (k) con 10 iteraciones cada uno (Falush et al., 2007). Para este análisis se utilizó el programa STRUCTURE v. 5.4 (Pritchard et al., 2000). El límite adecuado de

asignación a la cantidad de grupos con la menor varianza acumulada fue calculado de acuerdo con el método gráfico propuesto por Evanno et al., (2005) generado a partir del programa STRUCTURE SELECTOR (Li y Liu, 2018).

Para contrastar y comparar el análisis de asignación bayesiana a grupos genéticos hipotéticos, se realizó un Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC, por sus siglas en ingles), un método multivariado que se utiliza para identificar y describir grupos de individuos genéticamente relacionados, en donde primeramente por medio de un Análisis de Componentes Principales (PCA) se busca la dirección que muestra la mayor varianza total, seguida de un análisis discriminante (DA) que maximiza la separación entre grupos mientras minimiza la variación dentro del grupo. El DAPC no se basa en un modelo particular de genética de poblaciones, por lo tanto, está libre de suposiciones sobre el equilibrio de HW o desequilibrio por ligamiento y se basa en el mismo modelo estadístico clásico de ANOVA para cuantificar la diferenciación entre grupos (Jombart et al., 2010). Para este análisis se utilizó el programa Statistica v. 10 (StatSoft, 2011).

Cuellos de botella. Para determinar si han existido reducciones recientes en el tamaño efectivo poblacional, se realizó un análisis de cuello de botella, el cual considera la desviación del equilibrio deriva-mutación, que se observa en un incremento sustancial en la cantidad de genotipos heterocigos para cada loci, generados por iteraciones bayesianas hasta por 10,000 pasos. Para esta prueba se utilizó el modelo de mutación de dos fases (TPM); que es intermedio entre el modelo de islas infinitas (IIM) y el de mutación por pasos (SMM). La mayoría de los microsatélites presentan un modelo de mutación intermedia de eventos de mutación por pasos. El resultado final de la iteración es comparado con lo

esperado en el modelo de equilibrio mediante una prueba de Wilcoxon. El programa usado para este análisis fue Bottleneck v.1.2.02 (Cornuet y Luikart, 1996, Piry et al., 1999). Este análisis también detecta la falta de genotipos heterocigotos, disminución atribuible a un incremento poblacional basado en cruces endogámicas, lo que se considera un cuello de botella ancestral, además de poder analizar por separado cada locus. La comparación en cada locus depende de las diferencias entre la heterocigosis calculada y la heterocigosis esperada en el modelo de mutación de dos fases bajo el supuesto de equilibrio deriva-mutación ($H_E - H_{EQ} = DH$), dividido entre la desviación estándar (DE) de la heterocigosis calculada por la iteración a 10,000 pasos.

Por otro lado, se estimó el tamaño efectivo poblacional con la fórmula $T_e = 4\pi Nm$ (Slatkin y Barton, 1989), donde $Nm = (1/F_{ST}-1)/4$ (Slatkin, 1993). El valor de T_e obtenido fue ponderado en relación al tamaño de muestra (25 por población) para obtener una frecuencia de individuos efectivos respecto al total. Finalmente, considerando la heterocigosis observada para el primer modelo, y el tamaño efectivo poblacional para el segundo; se realizaron correlaciones de Spearman independientes; considerando la altitud y la latitud como los predictores.

RESULTADOS

Diversidad genética

El 90 ± 4.08 % de los loci fueron polimórficos con un total de 42 alelos; con un promedio de 3.16 ± 0.27 alelos por locus, 2.22 ± 0.17 alelos, índice de Shannon de 0.82 ± 0.08 , una H_o de 0.34 ± 0.07 , H_e de 0.5 ± 0.04 y coeficiente de fijación de 0.35 ± 0.15 . Sin embargo,

esta diversidad no se distribuyó de manera homogénea, ya que los valores más altos fueron los de la población con distribución más norteña: Agua Fría, Nuevo León, seguida de Las Guacamayas, Veracruz. Por otra parte, es notorio que las dos poblaciones de Tamaulipas son menos diversas (Tabla 3).

Existe una gran cantidad de alelos exclusivos en cada población, prácticamente para todos los loci (Tabla 3), lo que se relaciona con la fijación del alelo 84 del locus FS1-25 en la población de Agua Fría, NL; la cual también tiene la mayor cantidad de individuos con alelos exclusivos (94), seguida de la población con la distribución más sureña (Las Guacamayas, Veracruz), con 81; aunque en este caso el alelo 91 del locus FG5 es el que se encuentra en proceso de fijación con una frecuencia de 0.76. El resto de los loci muestran recambio escalonado, tal como se esperaría en un modelo de “salto en piedra”, aunque la población de El Salto, tiene un alelo fijo para el locus TBN-142 (Figura 2).

En conjunto, las frecuencias alélicas para los seis loci divergen principalmente en la zona sur de la distribución de la especie. Ninguna de las poblaciones se encuentra en equilibrio de Hardy-Weimberg: Agua Fría, Nuevo León: $\chi^2 = 18.06$, $p = 0.011$; Ojo de Agua, Tamaulipas: $\chi^2 = 14.51$, $p = 1.08e^{-6}$; El Salto, Tamaulipas: $\chi^2 = 35$, $p = 3.04e^{-7}$; La Mojonera, Hidalgo: $\chi^2 = 17.13$, $p = 1.9e^{-5}$; Las Guacamayas, Veracruz: $\chi^2 = 44.62$, $p = 1.08e^{-6}$.

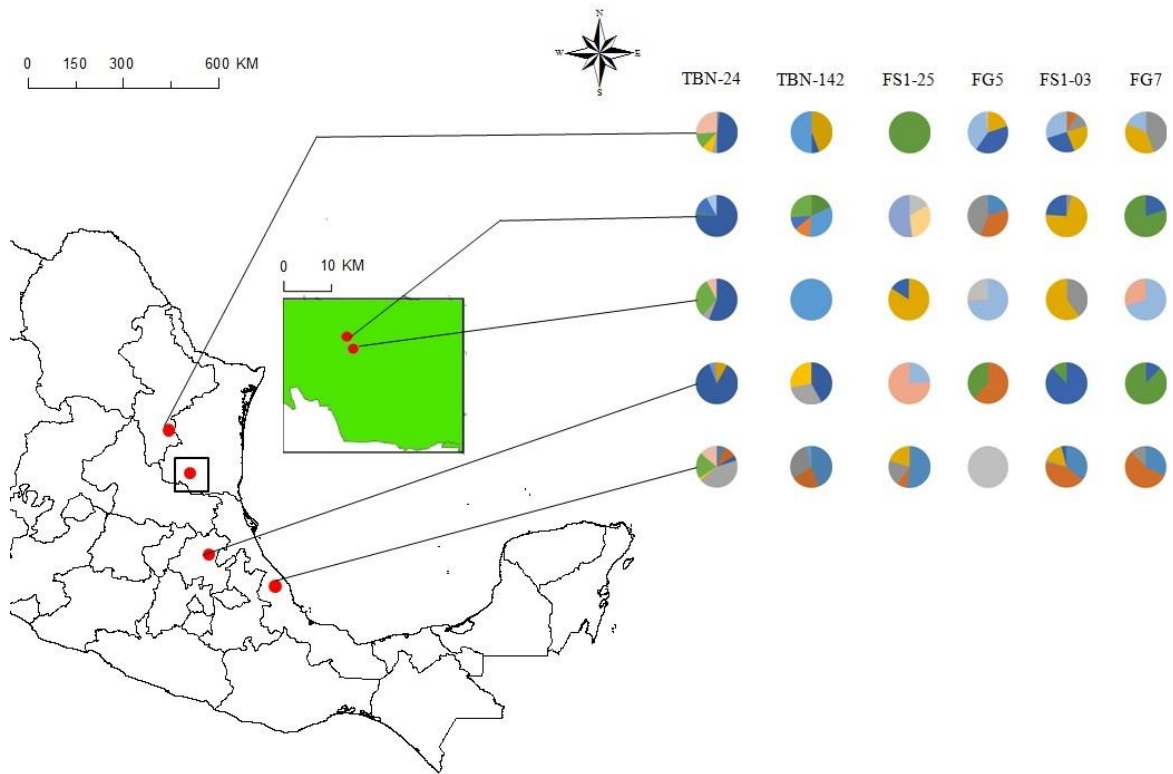


Figura 2. Recambio alélico entre poblaciones de *F. grandifolia* subsp. *mexicana*, considerando los seis loci evaluados.

Tabla 3. Diversidad genética en las poblaciones de *F. grandifolia* subsp. *mexicana*. N: número de individuos, P%: porcentaje de loci polimórficos, Na: promedio de alelos por locus, Ne: número efectivo de alelos por locus, I: índice de Shannon, Ho: heterocigosis observada, He: heterocigosis esperada, F: coeficiente de endogamia, Ex: promedio de alelos exclusivos, % ex: porcentaje de alelos exclusivos (Promedio ± DE).

	Agua Fría, NL	Ojo del Agua del Indio, Tamps.	El Salto, Tamps.	La Mojonera, Hgo.	Las Guacamayas, Ver.
N	25	25	25	25	25
P%	83.33	83.33	100	100	83.33
Na	3.67 ± 0.71	2.33 ± 0.42	3.33 ± 0.42	2.5 ± 0.35	4 ± 0.81
Ne	2.7 ± 0.43	1.68 ± 0.2	2.38 ± 0.41	1.7 ± 0.25	2.65 ± 0.38
I	0.99 ± 0.22	0.6 ± 1.14	0.92 ± 0.14	0.60 ± 0.1	1.018 ± 0.21
Ho	0.57 ± 0.17	0.25 ± 0.12	0.22 ± 0.15	0.31 ± 1.16	0.33 ± 0.17
He	0.55 ± 0.11	0.36 ± 0.08	0.52 ± 0.7	0.36 ± 0.7	0.55 ± 0.11
F	-0.07 ± 0.23	0.4 ± 0.25	0.6 ± 0.25	0.33 ± 0.3	0.42 ± 0.26
Ex	3.76 ± 0.88	1.27 ± 0.47	3.12 ± 0.67	3.16 ± 0.8	3.24 ± 0.66
%ex	31.33%	4.6%	26%	26.33%	27%

Estructura genética

De acuerdo con los resultados del AMOVA, los niveles de diferenciación son significativos ($F_{ST} = 0.45$, $p < 0.01$), existe endogamia ($F_{IT} = 0.61$ $p < 0.01$) y las poblaciones no se encuentran en equilibrio Hardy-Weimberg ($F_{IS} = 0.3$ $p < 0.01$), por lo que el nivel de flujo genético es bajo ($N_m = 0.3$). De forma pareada, las poblaciones con mayor diferenciación son Ojo de Agua, Tamps. y La Mojonera, Hgo. (Tabla 4). Por el contrario, las poblaciones con mayor cantidad de individuos migrantes por generación son Agua Fría, NL y El Salto, Tamps. Esto se observa en el agrupamiento NJ (Figura 3), con la mayor relación entre el

Salto y La Mojonera. Aunque cabe señalar que, de acuerdo con Wrigth (1978), no son suficientes individuos para considerar que son poblaciones relacionadas. Esto se corrobora porque todos los análisis de estructura genética (AMOVA, asignación bayesiana y DAPC), mostraron diferencias significativas, incluso entre las dos poblaciones de Tamaulipas, localizadas a corta distancia geográfica entre sí.

Tabla 4. Análisis de estructura poblacional. FST: índice de diferenciación, Nm: número de migrantes por generación

Fst\Nm	Agua Fría, NL	Ojo de Agua, Tamps.	El Salto, Tamps.	La Mojonera, Hgo.	Las Guacamayas, Ver.
Agua Fría, NL	-	0.39	0.43	0.27	0.36
Ojo de Agua, Tamps.	0.4	-	0.33	0.17	0.28
El Salto, Tamps.	0.37	0.43	-	0.47	0.33
La Mojonera, Hgo.	0.48	0.6	0.35	-	0.22
Las Guacamayas, Ver.	0.41	0.48	0.43	0.53	-

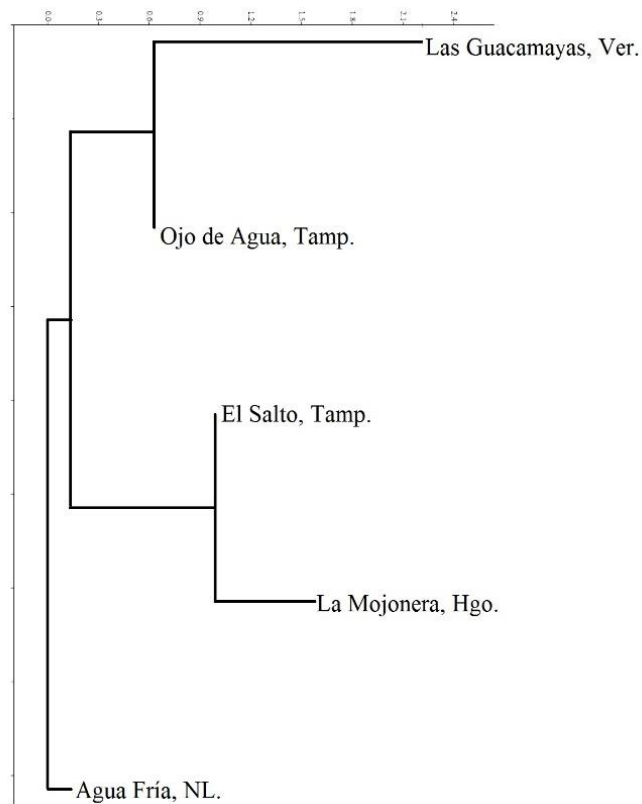


Figura 3. Diagrama de agrupamiento Neighbour-Joining basado en distancias de Nei.

El análisis de asignación bayesiano mostró tres grupos genéticos (similar al agrupamiento NJ) o cinco (similar al DAPC), dependiendo de la aproximación para determinar el número de categorías ($E_{\text{vanno}} = 3$; $\ln P(K) = 5$; Figura 4). En todo caso, el modelo genera un agrupamiento no dependiente del aislamiento geográfico con la mayor divergencia en los extremos de la distribución, tal como lo muestra el AMOVA (Tabla 4).

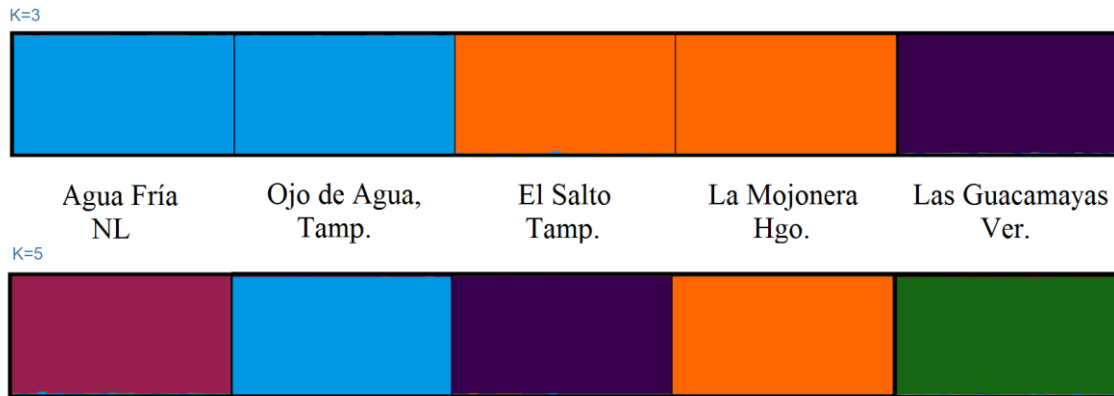


Figura 4. Análisis de asignación bayesiano (STRUCTURE), correspondiente a 3 y 5 grupos genéticos.

El DAPC mostró que todas las poblaciones difieren significativamente en su composición genética ($F_{(11,110)} = 179.9 \pm 121.17$, $p < 1.0e^{-10}$), variación explicada únicamente por cuatro de los seis loci (Eigenvalores: FS1-25 = 51.6, TBN-142 = 16.17, TBN-24 y FG7 = 1.97; en todos los casos $\chi^2 > 100$ y $p < 0.001$). Dado que los dos primeros factores explican más del 94.16% de la varianza entre grupos, solo se usaron estos para la evaluación (Figura 5).

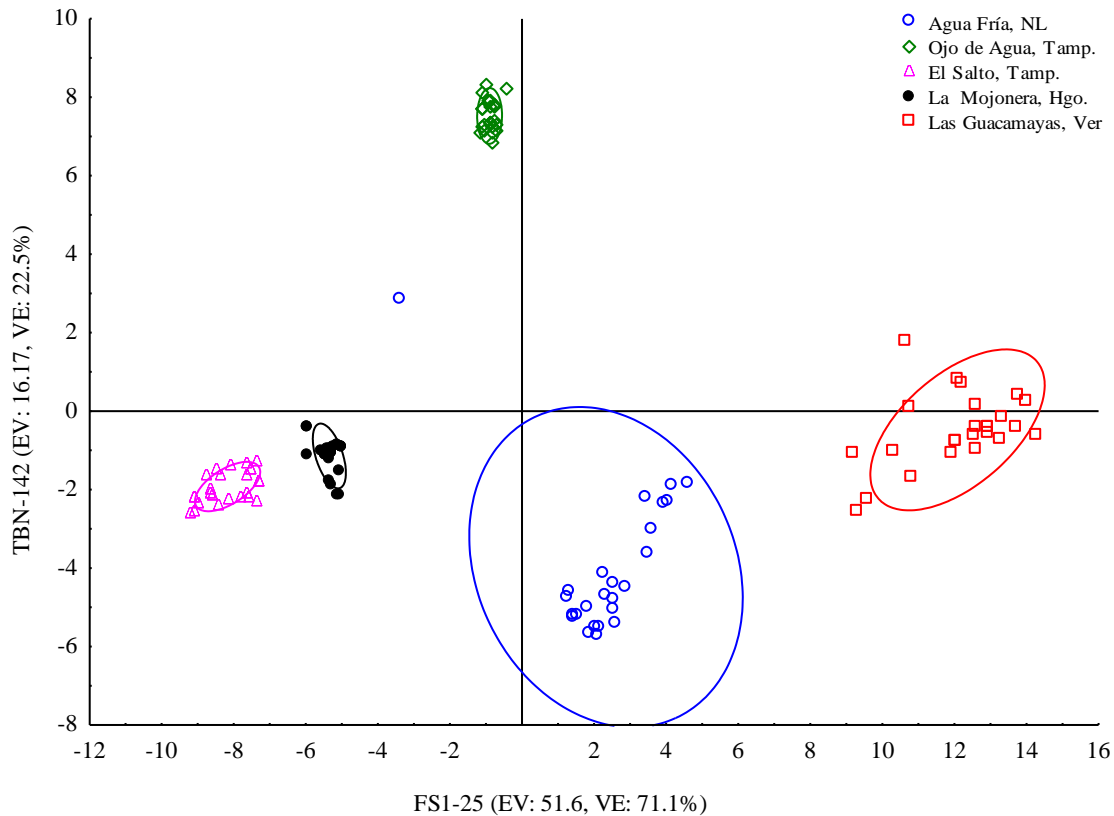


Figura 5. Análisis de Funciones Discriminantes de Componentes Principales. EV: Eigenvalor, VE: varianza explicada por el eje.

Cuellos de botella

El análisis de cuello de botella, mostró reducciones recientes en el tamaño poblacional en Agua Fría, Nuevo León (4 loci con exceso de heterócigos, locus FS1-03 $\hat{H}E$ $p = 0.01$ y FS1-25 fijo $p < 0.001$, Wilcoxon $p = 0.031$), Ojo de Agua, Tamaulipas (4 loci con exceso de heterócigos, locus TBN-142 fijo $p < 0.001$, Wilcoxon $p = 0.031$), El Salto, Tamaulipas (5 loci con exceso de heterócigos, locus TBN-142 $\hat{H}E$ $p = 0.02$, Wilcoxon $p = 0.039$) y la mayor reducción en Las Guacamayas, Veracruz (5 loci con exceso de heterócigos, locus FG5 fijo $p < 0.001$, Wilcoxon $p = 0.015$). En contraste, la población de La Mojonera,

Hidalgo no presenta reducción en el tamaño poblacional (3 loci con exceso de heterócigos, Wilcoxon $p = 0.42$), aunque el locus TBN-142 presenta un incremento significativo en la $H\hat{E}$ ($p = 0.013$), por lo que se infiere que la población se encuentra al principio de una reducción poblacional.

Diversidad genética y condiciones ambientales

El análisis cualitativo de los datos incluidos en la Tabla 5, muestra los valores obtenidos para la heterocigosis observada (H_o) y el cálculo del tamaño efectivo poblacional (T_e). Como se puede observar las poblaciones de Agua fría y Las Guacamayas localizadas en altitudes más elevadas, poseen valores de heterocigosis más altos. Esto corresponde con los valores de correlación obtenidos (H_o vs Altitud, $r_s = 0.8$, $p < 0.05$), siendo las únicas variables que resultaron con asociación positiva significativa (H_o vs Latitud, $r_s = 0.1$, $p = ns$; T_e vs Altitud, $r_s = 0.1$, $p = ns$; T_e vs Latitud, $r_s = 0.3$, $p = ns$).

Tabla 5. Relación de la diversidad genética y el tamaño poblacional con la altitud y latitud en las regiones de muestreo. H_o : heterocigosis observada, T_e : tamaño efectivo poblacional (frecuencia de individuos efectivos por población).

Población	H_o	T_e	Altitud (m)	Latitud
Agua Fría, NL.	0.57	0.182	1,830	24.06
Ojo del Agua del Indio, Tamp.	0.25	0.147	1,332	22.59
El Salto, Tamp.	0.22	0.196	1,574	22.588
La Mojonera, Hgo.	0.31	0.142	1,780	20.3824
Las Guacamayas, Ver.	0.33	0.150	1,863	19.45

DISCUSIÓN

Diversidad genética

La diversidad genética responde a un gradiente latitudinal, con los valores más altos en el norte (Nuevo León), lo que concuerda con un menor coeficiente de endogamia y un mayor número de alelos. Este patrón señala a la población de Agua Fría, Nuevo León como el probable origen de la distribución del clado mexicano, en congruencia con la historia de colonización de la especie, de norte a sur (Peters, 1992; Denk y Grimm, 2009) y en correspondencia con el grupo base o raíz del diagrama NJ (Figura 3). Sin embargo, las poblaciones con mayor cantidad de alelos exclusivos se encuentran en los extremos de la distribución, tanto norte como sur, por lo que podrían ser las poblaciones más aisladas tanto geográfica como genéticamente, lo que concuerda con un modelo de aislamiento asociado a eventos de colonización (Sánchez, 2005). Esto se puede explicar por eventos sucesivos de endogamia posteriores a la colonización. Por ejemplo, en la reserva de la biosfera El Cielo, han existido reducciones subsecuentes de la cobertura vegetal datadas entre 1970 y 1971 (Castillo y Dirzo, 2005), lo que se traduce como una reducción poblacional masiva, tal como lo indican los resultados de cuello de botella.

Aunado a lo anterior, la mayoría de los alelos raros se presentaron en los marcadores TBN-142 y FS1-25, ambos desarrollados para *F. sylvatica* (Pastorelli et al., 2003; Li-Ping et al., 2012), por lo que estos son susceptibles de ser afectados por eventos evolutivos distintos como selección natural, desequilibrio deriva-mutación o endogamia. En las poblaciones de El Salto, Tamaulipas y Las Guacamayas, Veracruz se observó el mayor

número de loci en desequilibrio, por lo que sus condiciones ambientales podrían ser consideradas como en el extremo de lo esperado para la especie, o en su defecto, son poblaciones que se aislaron hace más tiempo, incrementando el efecto de las reducciones poblacionales posteriores y cualquier otra fuerza evolutiva implicada.

Otro elemento a destacar es que las poblaciones de haya que se encuentran en la parte central de su distribución geográfica, tienen el mayor porcentaje de loci polimórficos, lo que apoya la observación de la pérdida de diversidad genética en los extremos de la distribución. El polimorfismo es particularmente importante en este contexto ya que los marcadores microsatélites son considerados altamente polimórficos al identificar múltiples variables alélicas, por lo que no se esperaría una pérdida sustancial de variación en este indicador (Jarne y Lagoda, 1996). Más aún, la corrección realizada en el número de alelos (distribución de frecuencias Poisson), genera un modelo probabilístico de asignación equilibrado por la frecuencia y no por ligamiento o nulidad alélica, es por ello que cualquier variación en el polimorfismo indica eventos poblacionales reales más que variación debida al marcador utilizado.

Por otro lado, las poblaciones de *Fagus* situadas en los extremos de la distribución, así como en la poicon central, tienen una mayor cantidad de alelos, tanto en promedio como efectivos, aún cuando hay fijación para los loci TBN-142 y FS1-25, lo cual es una función directa de la heterocigosis en el resto de los marcadores. Ante la aparente discrepancia se puede decir que los valores de heterocigosis más elevados en el centro y en los extremos de la distribución de la especie, probablemente no obedecen a un patrón de aislamiento sino a un proceso de selección o endogamia, puesto que no hay alelos compartidos entre

localidades. En otras palabras, los heterócigos registrados en las poblaciones del sur presentan diferentes combinaciones alélicas de los encontrados al centro y al norte de la distribución de *F. grandifolia* subsp. *mexicana*, con excepción de los alelos fijos ya mencionados en los extremos de la distribución.

Por lo anterior, se infiere que procesos evolutivos independientes favorecieron el surgimiento de alelos divergentes en combinaciones heterócigas distintas entre poblaciones, independientemente de la distancia geográfica (v.gr. Ojo de Agua y El Salto, en Tamaulipas). Al respecto, se sabe que algunas especies presentan un modo de especiación simpátrica, determinado en principio por divergencias en el hábitat mediado por efectos fundadores subsecuentes, que a largo plazo incrementan la variación morfológica temporal y espacialmente; este fenómeno se conoce como especiación alocrónica (Santos et al., 2007). Tal parece ser el caso de *F. grandifolia* subsp. *mexicana*, ya que históricamente se ha documentado una separación de las poblaciones de Norteamérica desde hace varios miles de años, con limitaciones de radiación atribuidas a los cambios climáticos (Fang y Lechowicz, 2006) y eventos de reducción poblacional en el sur (Galván-Hernández et al., 2020).

Estructura genética

Como ya se ha mencionado, los resultados sugieren eventos sucesivos de colonización desde su origen, en la región biogeográfica neártica hasta la neotropical, como se esperaría para esta especie (Gould, 2014). Sin embargo, la divergencia se magnifica por eventos subsecuentes de endogamia y reducción poblacional, lo cual tiene un antecedente histórico en la reserva de la biósfera El Cielo, situación denominada "vórtice de la extinción"

(Fangan y Holmes, 2006). Sin embargo, en La Mojonera, la alta densidad poblacional probablemente ha permitido mantener cierta estabilidad genética, con un patrón de divergencia evolutiva independiente. En otras palabras, los alelos encontrados en la población de haya de La Mojonera, aun cuando sean más en promedio, no son representativos de la especie a lo largo de su distribución, por lo que es necesario generar planes de conservación independientes para cada localidad. No obstante, Galván-Hernández et al. (2020), mencionan que existen otras poblaciones de haya en el estado de Hidalgo, que si mantienen cierta similitud genética con la población de La Mojonera (aunque en el estudio antes citado utilizaron marcadores SSR distintos para estimar la diversidad alélica), por lo que es probable que exista un núcleo poblacional mayor y, por lo tanto, un agrupamiento alélico en la región central de distribución de la especie; esto enfatiza la importancia de la conservación de las poblaciones de haya que se distribuyen en el estado de Hidalgo (Rodríguez-Ramírez et al., 2013; Ortiz-Quijano et al., 2015).

Por otro lado, la población de Las Guacamayas situada en el extremo sur de distribución de la especie, presenta la mayor divergencia genética (con un nivel de variación similar al encontrado entre especies distintas), debido probablemente al aislamiento y fijación alélica (Vornnam et al., 2004), que puede haber ocasionado eventos de especiación recientes. Además, el que no haya aislamiento por la distancia geográfica, sugiere que las poblaciones han sufrido un grado de fragmentación tan severa, que se ha perdido por completo la conectividad, incluso entre las dos poblaciones que se distribuyen dentro de la reserva de la Biósfera El Cielo. En este caso particular, el patrón de aislamiento

coincide con un gran incendio reportado en esta región en la década de los 70's (Castillo y Dirzo, 2005), lo que aceleró cualquier fenómeno de fijación por cuello de botella.

Para explorar si el cambio climático global es responsable de la divergencia, es necesario asociar los cambios en las frecuencias alélicas con eventos de selección natural. Bajo este contexto se deben correlacionar variaciones adaptativas con variables bioclimáticas, como las bases de datos de WorldClim. La información obtenida permitirá corroborar que la diferenciación en las poblaciones no está influenciada por cuellos de botella (Kempf y Konnert, 2016). No obstante, los resultados actuales permiten inferir que hay dos elementos fundamentales en la distribución de la variabilidad genética, la latitud y la altitud.

Diversidad genética y condiciones ambientales

Los valores de variación genética entre las poblaciones de *F. grandifolia* subsp. *mexicana*, son semejantes a los encontrados en otros trabajos que evalúan la diversidad genética en poblaciones de *F. sylvatica* en función de la altitud, la humedad (Pluess y Weber, 2012) y la perturbación (Vettori y Vendtami, 2013), en donde algunas variables climáticas como la temperatura y la precipitación, se han visto alteradas en años recientes, lo que ha tenido efectos sobre la diversidad genética de sus poblaciones.

En *F. grandifolia* subsp. *mexicana*, el gradiente latitudinal puede estar relacionado con el recambio alélico poblacional, en particular con el patrón observado para los loci TBN-142 y FS1-25, así como con la pérdida de loci polimórficos en los extremos de distribución de la especie. Ante el alto nivel de variación genética encontrado, es destacable

la importancia de la adaptación local, atribuible a combinaciones concretas de alelos con mayor adecuación en condiciones ambientales específicas (Alberto et al., 2013). El patrón documentado indica que los procesos evolutivos han depurado con mayor fuerza los alelos en las poblaciones situadas en los extremos norte y sur de la distribución de la especie, lo que concuerda con el planteamiento base (hipótesis) de la presente investigación.

Se ha documentado que el tamaño poblacional efectivo es buen indicador de los patrones de adaptación en distintas especies de árboles, incluido *F. grandifolia* subsp. *mexicana* (Rowden et al., 2004). Koch et al. (2009) encontraron un alto nivel de entrecruzamiento en las poblaciones de *F. grandifolia* de Estados Unidos de América, que se caracterizan por la gran extensión territorial que ocupan y por la alta densidad de individuos, lo cual es diametralmente diferente en México. Los resultados del presente estudio indican que el tamaño efectivo poblacional es independiente de la variabilidad genética, lo cual concuerda con los datos obtenidos por Montiel-Oscura et al. (2013). Ante este panorama, es posible sugerir que los cambios en las condiciones ambientales asociados con el gradiente de latitud han propiciado la eliminación de alelos en los extremos de la distribución y han magnificado la divergencia entre poblaciones por efecto de la endogamia y la deriva génica.

En cuanto a la altitud, fue la única variable que se relacionó significativamente con los valores de diversidad genética (H_o): conforme se incrementa la elevación, la frecuencia de individuos heterocigos aumenta. Esto es particularmente notorio en las tres poblaciones de haya mexicana que se distribuyen a menor altitud, las cuales presentan la menor cantidad de alelos. No obstante, es imposible determinar cuáles alelos responden a la

variación altitudinal, en principio por el elevado recambio entre poblaciones y en segundo lugar porque los marcadores son neutrales. Este tipo de patrones clinales se han reportado para otras especies de árboles del neártico, sobre todo cuando sus poblaciones se encuentran en regiones tropicales, como es el caso de *F. crenata* (Tomaru et al., 1996), *Nothofagus pumilo* (Premoli, 2003), *Chamaecrista fasciculata* (Etterson, 2004) y *Platanus mexicana* (Galván-Hernández et al., 2015). En estos casos, los alelos identificados como responsables de las adaptaciones locales tampoco pudieron ser identificados, aun cuando se usaron diferentes marcadores, algunos considerados no neutrales (ISSRs e isoenzimas).

En cuanto a la densidad poblacional de *F. grandifolia* subsp. *mexicana*, la localidad de la Mojonera mantiene conectividad genética con las poblaciones de Medio Monte (San Bartolo, Tutotepec, Hidalgo) y El Gosco (Tenango de Doria, Hidalgo) (Galván-Hernández et al., 2020), por lo que aun cuando aparentemente tiene un tamaño efectivo poblacional bajo, consta en realidad de más de 10,000 individuos, lo que resulta sustancialmente mayor en términos numéricos, al del resto de las poblaciones a lo largo de su distribución en México (Rodríguez-Ramírez et al., 2013). Con esta información en mente, el que no exista relación significativa entre el tamaño efectivo poblacional y la altitud o latitud, podría ser un artefacto del método de estimación de los valores.

Por otro lado, la variación altitudinal se considera como un factor fundamental para la conservación de la diversidad genética en especies neárticas de zonas tropicales, que se distribuyen en áreas conocidas como “islas en el cielo”, en latitudes de menos de 40°. Estas áreas consideradas como refugios, con eventos de contracción y expansión durante las glaciaciones, mantienen cierta conectividad entre poblaciones, pero que en interludios

temporales generan retrogresión, divergencia genética y especiación, en las áreas de distribución (Knowles, 2000; Gong et al., 2016). Esta dinámica de contracción-expansión genera un patrón histórico reticular de superposición en la distribución de las poblaciones, lo que consume variación genética por eventos sucesivos de colonización-extinción a través del gradiente (Coyne, 1992; Dlugosch y Parker, 2008). Con base en la información anterior, es probable que las poblaciones de *F. grandifolia* subsp. *mexicana* que se distribuyen en altitudes elevadas, representen reservorios de variabilidad genética; mientras que en las que ocupan áreas en altitudes más bajas, los eventos de colonización-extinción local consumen diversidad e incrementan el efecto de la endogamia.

Los resultados obtenidos sugieren que el tiempo de aislamiento de las poblaciones analizadas es de al menos 10,000 años (Galván-Hernández et al., 2020). Si se considera el aislamiento del clado mexicano con relación a las poblaciones de Estados Unidos, los eventos de divergencia podrían ser mucho más antiguo. Sin embargo, es necesario realizar estudios filogenéticos más robustos para datar molecularmente el momento exacto de separación. Los elevados niveles de variación en la estructura genética entre poblaciones sugieren que existen al menos tres especies dentro del complejo *F. grandifolia*, la especie de Norteamérica y probablemente dos clados mexicanos separados latitudinalmente, uno en el norte-centro de la distribución y otro en el sur, por lo que los resultados obtenidos concuerdan con la hipótesis del trabajo.

CONCLUSIONES

- La diversidad genética de *F. grandifolia* subsp. *mexicana*, considerando como indicadores el polimorfismo y el número efectivo de alelos por locus, es menor en los

extremos norte y sur de su área de distribución, lo que corrobora un gradiente de variación latitudinal. Adicionalmente, la existencia de elevado recambio alélico, con fijación para dos loci en los extremos de la distribución confirma esta tendencia geográfica. En cambio, la heterocigosis observada corresponde a un patrón distinto, mediado por la altitud lo cual indica un gradiente de norte a sur en donde las poblaciones con mayor variabilidad se ubican al norte de la distribución de la especie.

- El tamaño efectivo poblacional de *F. grandifolia* subsp. *mexicana*, aun cuando se considera un indicador importante de la adecuación en las especies, no responde a un gradiente latitudinal o altitudinal. Sin embargo, es necesario considerar que existen otras poblaciones de haya que no fueron evaluadas en el centro de su distribución geográfica, que mantienen conectividad genética de acuerdo con estudios previos, lo que implica un incremento sustancial del tamaño efectivo en las poblaciones del estado de Hidalgo y podría explicar por qué no se registraron cuellos de botella en la población de haya de La Mojonera.

ANEXO

Permiso de colecta



SEMARNAT
SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE
Y RECURSOS NATURALES



2019
A LOS CINCUENTA Y CINCO AÑOS
DE LA REVOLUCIÓN MEXICANA
EMILIANO ZAPATA

**SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN PARA
LA PROTECCIÓN AMBIENTAL
DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE**

Oficio N° SGPA/DGVS/ 4240 /19

Ciudad de México, a 02 de mayo de 2019

DR. ARTURO SÁNCHEZ GONZÁLEZ

INVESTIGADOR DEL INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
REYNA DE LOS BONDADOSOS No. 1556
COL. PASEO DE LAS REYNAS
PACHUCA, MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO
C.P. 42184-MÉXICO
TEL. 01 (771) 710 6708, E-MAIL: artsag@hotmail.com

En atención a la solicitud de licencia de colecta científica o con propósitos de enseñanza en materia de vida silvestre, recibida en esta Dirección General el 17 de abril de 2019, a la cual se le asignó la bitácora 09/K4-0659/04/19 y considerando que ha dado cumplimiento a los requisitos establecidos para efectuar investigación y colecta científica de flora y fauna silvestres en territorio mexicano y con fundamento en el Artículo 32 Bis fracciones I, III, XXII, XXXIX de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; Artículo 19 fracción XXV y 32 fracción VI, XVIII, XXI, XXIV del Reglamento Interior de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 26 de noviembre de 2012; 79, 80 fracción I, 82, 83 y 87 párrafo cuarto de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente; Artículos 9º. Fracción XII, 97 y 98 de la Ley General de Vida Silvestre; 12, 123 Fracción IV y 126 del Reglamento de la Ley General de Vida Silvestre; Artículo 85, Artículo 88, fracciones I y II, Artículo 105, fracciones II y III del Reglamento de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente en Materia de Áreas Naturales Protegidas (ANP´s); las disposiciones relativas de la Norma Oficial Mexicana NOM-126-SEMARNAT-2000, por la que se establecen las especificaciones para la realización de actividades de colecta científica de material biológico de especies de flora y fauna silvestres y otros recursos biológicos en el territorio nacional; la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo, la Dirección General de Vida Silvestre **autoriza** la licencia de colecta científica o con propósitos de enseñanza en materia de vida silvestre por proyecto sobre especies o poblaciones en riesgo o sobre hábitat crítico, para desarrollar las siguientes actividades inherentes al proyecto denominado: **“Estructura (poblacional y comunitaria) y la composición florística del bosque templado húmedo (bosque mesófilo de montaña) y del bosque templado subhúmedo (bosque de pino, encino, oyamel) y los subproyectos: 1) Análisis de la dinámica y estructura poblacional de las cícadas en peligro de extinción (2014-2018): perspectiva ecológico-evolutiva para la conservación y manejo sustentable, 2) Efecto del cambio climático sobre poblaciones relictas de árboles: *Fagus grandifolia* y *Magnolia rzedowskiana* (*M. dealbata*) y *M. mexicana*, 3) Helechos y licopodios del estado**

Página 1 de 5

Av. Ejército Nacional No. 223. Col. Anáhuac, Alcaldía Miguel Hidalgo, Ciudad de México. C.P. 11320
Teléfono: (55)54906900 www.gob.mx/semarnat





de Nayarit y 4) Helechos y lycopodios del municipio de Tlahuiltepa y Tepehuacan de Guerrero, Hidalgo”:

- Colecta de hasta cinco (05) estróbilos (piñas) por especie de **Ceratozamia** spp. por localidad, que se encuentren listadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, para herborizar.
- Colecta de hasta dos (02) foliolos por especie de **Ceratozamia** spp. por localidad, que se encuentren listadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, para herborizar.
- Colecta de hasta cinco (05) hojas por árbol en hasta 10 árboles por especie de “guichín, acailite, pepinque” **Fagus grandifolia**, **Magnolia dealbata** y **M. mexicana**, que se encuentran listadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, para herborizar.
- Colecta de hasta dos (02) núcleos de crecimiento de 4 mm de espesor por árbol en hasta veinte (20) árboles por población y por especie de “guichín, acailite, pepinque” **Fagus grandifolia**, **Magnolia dealbata** y **M. mexicana**, que se encuentran listadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010.
- Colecta de hasta dos (02) muestras botánicas por especie por localidad de colecta de los órdenes **Cyathea**, **Dicksoniales**, **Marattiales**; los géneros **Alsophila** spp. y las especies **Psilotum complanatum** y **Huperzia dichotoma = Lycopodium dichotomum**, que se encuentran listadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 para su herborización.

Referente a la colecta de plantas que no se encuentren en riesgo de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, queda fuera del ámbito de competencia de esta Dirección General de Vida Silvestre, siendo la autoridad competente para otorgar dicha autorización la Dirección General de Gestión Forestal y Suelos (Avenida Progreso No. 3, Edif. 3, Planta alta, Col. Del Carmen Coyoacán, Deleg. Coyoacán, C.P. 04100, México, D.F. Tel. 01 (55) 54 84 35 68, e-mail: dgforestal@semarnat.gob.mx.

Las actividades se llevarán a cabo en **bosques mesófilos de montaña de la Sierra Madre Oriental de los estados de Hidalgo, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí y Veracruz; en las localidades de La Mojonera de Zacualtípán de Ángeles, Medio Monte, municipio de San Bartolo Tututepec; El Gosco, Municipio de Tenango de Doria; Volcán de Acatlán, Acomulco, municipio de Xochicoatlán; Apantlazol, municipio de Tlanchinol; Chilijapa, municipio de Tapehuacán de Guerrero; Zotictla, municipio de Acaxochitlán; Agua de la Calabaza, municipio de Huayacocotla; La Yesca, municipio de Landa de Matamoros; La Trinidad, municipio de Xilitla; bosque mesófilo de montaña y selva mediana en los municipios de Magdalena Zongolica, Xicotepec de Juárez, Tuzamapan de Galeana, Hueyatanalco, Jopala, Chiquihuitlan, San Juan Yatza y Tlahuiltepa, en los estados de Hidalgo, Veracruz, Puebla y Oaxaca, así como localidades del estado de Nayarit, fuera de Áreas Naturales Protegidas.**





La presente autorización tendrá una vigencia de **un (01) año** a partir de la emisión de la misma.

Las actividades se realizarán con el aval del Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, con la colaboración del Dr. Pablo Octavio Aguilar, Dra. Dulce María Galván Hernández, M. en C. Marisol Gutiérrez Lozano, M. en C. Liliana Cuapio Hernández, Dr. Oscar Bravo Bolaños; estudiantes: Cynthia Amairane Oaxaca Acosta y Diego Armando Meléndez Aguilar, **debiendo sujetarse obligatoriamente el titular y los colaboradores a las siguientes condiciones:**

1.- Cumplir con las disposiciones Administrativas, Fiscales y de Sanidad exigibles por las autoridades competentes en la materia, sean Federales, Estatales o Municipales, así como con las disposiciones establecidas en la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y su Reglamento en Materia de Áreas Naturales Protegidas y demás disposiciones legales aplicables.

2.- Obligatoriamente y previo al inicio de las actividades de campo deberá contactar al Director y/o encargado de la Estación de Anillado de Aves Rapaces de Cansaburro, operada por Pronatura Veracruz A.C. para coordinar las actividades de campo.

3.- Previo al inicio de las actividades de campo, deberá enviar obligatoriamente por escrito y utilizando cualquier medio su programa de trabajo a las Delegaciones Federales de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales en los estados de **Hidalgo** 01 (771) 717 9416, **Nayarit** 01 (311) 215 4902, **Oaxaca** 01 (951) 512 9606, **Puebla** 01 (222) 229 9506, **Querétaro** 01 (442) 238 3410, **San Luis Potosí** 01 (444) 834 0635 y **Veracruz** 01 (228) 841 6521, enviando copia del mismo a la Dirección General de Vida Silvestre. De igual manera, al término de dichas actividades lo notificará a esa Delegación Federal, enviando un reporte detallado por escrito.

4.- Con base al Capítulo IV, Artículo 98 de la Ley General de Vida Silvestre y 126 del Reglamento de la Ley General de Vida Silvestre, el responsable del proyecto deberá someter a la consideración de la Dirección General de Vida Silvestre, en un plazo no mayor de 30 (TREINTA) días de concluida la vigencia de la presente, un informe que describa detalladamente las actividades realizadas, los resultados obtenidos, la problemática del área trabajada, las potenciales alternativas de solución y en su oportunidad, la(s) publicación(es) y sobre tiros producto de la investigación.

5.- La totalidad del material colectado deberá destinarse exclusivamente a los fines específicos del proyecto, objeto de la presente autorización. Con base al Capítulo IV, Artículo 98 de la Ley General de Vida Silvestre, las muestras botánicas colectadas serán depositadas para herborizar en el Herbario MEXU de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el Herbario de la





Universidad Autónoma de Nayarit, en instalaciones del Instituto de Biotecnología y Ecología Aplicada de la Universidad Veracruzana, para analizar la composición isotópica del hidrógeno, como medio para determinar el origen geográfico y estimar el grado de conectividad migratoria, y el titular de la autorización asume la responsabilidad de remitir a esta Dirección General, copia de la(s) constancia(s) del(os) depósito(s) debidamente firmado(s), especificando la cantidad del material depositado.

6.- Con fundamento en el Artículo 123, Fracción IV del Reglamento de la Ley General de Vida Silvestre su solicitud se evaluó y dictaminó de acuerdo a la Modalidad B: Por proyecto sobre especies o poblaciones en riesgo o sobre hábitat crítico.

7.- Queda estrictamente **prohibido** efectuar cualquier aprovechamiento de las especies de flora y fauna silvestres, cualquiera que sea su estatus, excepto lo aquí autorizado, así como realizar actividades en áreas naturales protegidas de México, sean Estatales o Federales, sin previa autorización.

8.- Se recomienda que, durante sus actividades de campo, en el caso de observar ejemplares de especies listadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, se notifique de ello (la especie, ubicación geográfica y la fecha) a esta Dirección General, en el informe de actividades antes mencionado.

9.- De acuerdo al Artículo 87 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y al Capítulo IV, Artículo 97 de la Ley General de Vida Silvestre, esta autorización no ampara el aprovechamiento de los especímenes colectados para fines comerciales, ni de utilización en biotecnología.

La presente autorización es personal e intransferible y habrá de mostrarse a las Autoridades Federales, Estatales y Municipales cuantas veces lo soliciten. Así mismo y tomando en consideración lo establecido en el Artículo 87 de la Ley General de Vida Silvestre el titular de la presente deberá contar con el consentimiento previo, expreso e informado de los legítimos propietarios de la(s) tierra(s) donde pretende desarrollar el proyecto.

El incumplimiento de las condiciones aquí establecidas, dará origen a la instauración de un procedimiento administrativo ante la autoridad competente, para proceder a la cancelación de la autorización y a la aplicación de la legislación correspondiente, según sea el caso.





Notifíquese la presente resolución al DR. ARTURO SÁNCHEZ GONZÁLEZ, INVESTIGADOR DEL INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO, por alguno de los medios legales previstos por el artículo 35 y demás relativos y aplicables de la Ley Federal de Procedimiento Administrativo.

**ATENTAMENTE
LA DIRECTORA GENERAL**



MARÍA DE LOS ÁNGELES PALMA IRIZARRY

- C.c.e. p. Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental. - copias.sgpa@semarnat.gob.mx
- C. Joel González Moreno - Director General de Inspección y Vigilancia de Vida Silvestre, Recursos Marinos y Ecosistemas Costeros de la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA). - vida_silvestre@profepa.gob.mx
- Delegación Federal de la SEMARNAT en el Estado de Hidalgo
- Delegación Federal de la SEMARNAT en el Estado de Nayarit
- Delegación Federal de la SEMARNAT en el Estado de Oaxaca
- Delegación Federal de la SEMARNAT en el Estado de Puebla
- Delegación Federal de la SEMARNAT en el Estado de Querétaro
- Delegación Federal de la SEMARNAT en el Estado de San Luis Potosí
- Delegación Federal de la SEMARNAT en el Estado de Veracruz
- Delegación Federal de la PROFEPA en el Estado de Hidalgo
- Delegación Federal de la PROFEPA en el Estado de Nayarit
- Delegación Federal de la PROFEPA en el Estado de Nuevo León
- Delegación Federal de la PROFEPA en el Estado de Oaxaca
- Delegación Federal de la PROFEPA en el Estado de Puebla
- Delegación Federal de la PROFEPA en el Estado de Querétaro
- Delegación Federal de la PROFEPA en el Estado de San Luis Potosí
- Delegación Federal de la PROFEPA en el Estado de Veracruz
- Subdirección de Comercio Nacional, Internacional y Otros Aprovechamientos.

Archivo General (09/K4-0659/04/19, 09/O1-0660/04/19)
cooscar/colecta científica/proyecto_Arturo Sánchez (plantas-Mod B por A) SUNIVS (02-05-19)



LITERATURA CITADA

- Alberto, F. J., Aitken, S. N., Alia, R., González-Martínez, S. C., Hanninen, H., Kremer, A., Lefevre, F., Lenormand, T., Yeaman S., Whettenm R. & Savolainen, O. (2013). Potential for evolutionary responses to climate change evidence from tree populations. *Global Change Biology*, 19(6): 1645-1661
- Almeida-Cerino, C.M. (2008). Distribución espacial de la comunidad de orquídeas epífitas en la selva alta perennifolia y bosque mesófilo de montaña, en el ejido Villa Guadalupe, Huimanguillo, Tabasco, México. Tesis licenciatura en Ecología. Universidad de Juárez Autónoma de Tabasco. 99 pp.
- Barbadilla, A. (2010). La genética de poblaciones (<http://bioinformatica.uab.es/divulgacio/genpob.html>)
- Barstow, M. (2017). *Fagus grandifolia*. The IUCN Red List of Threatened Species 2017: e.T62004694A62004696. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-3.RLTS.T62004694A62004696.en>. Downloaded on 13 February 2018.
- Becerra, V. V. & Paredes, C. M. (2000). Uso de Marcadores Bioquímicos y Moleculares en Estudios de Diversidad Genética. *Agricultura Técnica*, 60(3): 270-281.
- Burger, K., Müller, M., & Gailing, O. (2018). Characterization of EST-SSRs for European beech (*Fagus sylvatica* L.) and their transferability to *Fagus orientalis* Lipsky, *Castanea dentata* Bork., and *Quercus rubra* L. *Silvae Genetica*, 67(1): 127-132.

- Castillo, R. & Dirzo R. (2005). Historia natural de la reserva de la biosfera El Cielo, Tamaulipas, México (No. 508.097212 H5). Universidad Autónoma de Tamaulipas. 732 p.
- CONABIO. (2010). El Bosque Mesófilo de Montaña en México: Amenazas y Oportunidades para su Conservación y Manejo Sostenible. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México D.F. México. 197 pp.
- Condit, R. & Hubbell, S.P. (1991). Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genome. *Genome*, 34, 66-71.
- Cornuet, J. M. & Luikart, G. (1996). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014.
- Coyne, J. A. (1992). Genetics and Speciation. *Nature* 355(6360): 511-515.
- De Vicente, M.C., López, C. & Fulton, T. (eds.). (2004). Análisis de la Diversidad Genética Utilizando Datos de Marcadores Moleculares: Módulo de Aprendizaje. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Roma, Italia.
- Denk, T. & Grimm, G.W. (2009). The biogeographic history of beech trees. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 158: 83-100.
- Dlugosch, K. M. & Parker, I. M. (2008). Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology* 17(1): 431-449.

- Doyle, J. J. & Doyle J. L. (1987). Genomic plant DNA preparation from fresh tissue-CTAB method. *Phytochemical Bulletin*, 19: 11-15.
- Etterson, J. R. (2004). Evolutionary potential of *Chamaecrista fasciculata* in relation to climate change. 1. Clinal patterns of selection along an environmental gradient in the great plains. *Evolution*, 58(7): 1146-1458.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulatory study. *Molecular Ecology* 14: 2611-2620.
- Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J. K. (2007). Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7: 574-578.
- Fang, J. & Lechowicz, M.J. (2006). Climatic limits for the present distribution of beech (*Fagus L.*) species in the world. *Journal of Biogeography*, 33: 1804-1819.
- Fangan, F. W & Holmes, E. E. (2006). Quantifying the extinction vortex. *Ecology Letters*, 9: 51-60.
- Fox, W. B. & Sharp, A. J. (1954). La distribución de *Fagus* en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 17: 31-33.
- Frankham, R., Ballou, J. D., Dudash, M. R., Eldridge, M. D. B., Fenster, C. B., Lacy, R. C., Mendelson, J. R., Porton, I. J., Ralls, K. & Rider, O. A. (2012). Implications of different species concepts for conserving biodiversity. *Biological Conservation*, 153: 25-31. doi:10.1016/j.biocon.2012.04034

- Gailing, O., Varsamis, G., Papageorgiou, A. C., Merou, T., Malesios, C., Tsiripidis, I. & Manolis, A. (2019). Adaptive diversity of beech seedlings under climate change scenarios. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1918.
- Galván-Hernández, D. M., Lazcano-Cruz, L., Octavio-Aguilar, P. & Sánchez-González, A. (2020). Morphological and genetic differentiation on isolated populations of Mexican beech (*Fagus grandifolia* subsp. *mexicana*). Aceptado.
- Galván-Hernández, D., Lozada-García, J. A., Flores-Estévez, N., Galindo-González, J. & Vázquez-Torres, S. M. (2015). Variation and genetic structure in *Platanus mexicana* (Platanaceae) along riparian altitudinal gradient. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1): 2066–2077. DOI: 10.3390/ijms16012066
- Gang, W. & Junging, L (1998) Distribution, regeneration and succession of *Fagus*. *Journal of Forestry Research*, 9(4): 1-2.
- Gong, W., Liu, W. Z., Gu, L., Kaneko, S., Koch, M. A. & Zhang, D. X. (2016). From glacial refugia to wide distribution range: demographic expansion of *Loropetalum chinese* (Hamamelidaceae) in Chinese subtropical evergreen broadleaved forest. *Organisms Diversity & Evolution* 16(1): 23-38.
- González-Espinosa, M., Meave, J.A., Ramírez-Marcial, N., Toledo-Aceves, T., Lorea-Hernández, F.G. & Ibarra-Manriquez, G. (2012). Los bosques de niebla de México: conservación y restauración de su componente arbóreo. *Ecosistemas*, 21: 36-54.
- Gould, B., D. A. E. Moeller, V. Tiffin, P. Fabio y M. Geber (2014) Local adaptation and range boundary formation in response to complex environmental gradients across the

- geographical range of *Clarkiaxantiana* ssp. *Xantiana*. *Journal of Ecology*, 102: 95-107.
- Hammer, O., Harper, D. A. T. & Ryan, P. D. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*, 4: 9. https://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf
- Hernández, X., Crum, H., Fox, W. B., & Sharp, A. J. (1951). A unique vegetational area in Tamaulipas. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 78: 458-453.
- Houston, D. B. & Houston, D. R. (1994). Variation in American Beech (*Fagus grandifolia* Ehrh.): Isozyme Analysis of Genetic Structure in Selected Stands). *Silvae Genetica*, 43: 5-6.
- Hokusima, T., Matsui, T., Nishio, T., Pignatti, S., Yang, L., Lu, S.-Y., Kim, M.-H., Yoshikawa, M., Honma, H. & Wang, Y. (2013). *Phytosociology of the Beech (Fagus) Forests in East Asia*. Geobotany Studies Series, Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg.
- INEGI. (2009). *Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos (Gómez Farías, Tamaulipas-Aramberri, Nuevo León-Chinconquiacó-Veracruz- Zacualtipán-Hidalgo)*. México DF., México.
- Jarne, P., Lagoda, P. J. L. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11(19): 424-429.

Jombart, T., Devillard, S., Balloux, F. (2010). Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. *BMC Genetics* 11: 94.

Kempf, M. & Konnert, M. (2016). Distribution of genetic diversity in *Fagus sylvatica* at the north-eastern edge of the natural range. *Silva Fennica* vol. 50 no. 4 article id 1663. 17 p. <http://dx.doi.org/10.14214/sf.1663>.

Kitamura, K. y Kawano, S. (2001). Regional differentiation in genetic components for the American beech, *Fagus grandifolia* Ehrh., in relation to geological history and mode of reproduction. *J. Plant Res.* 114: 353-368.

Kitamura, K., Shimada, K., Nakashima, K. y Kawano, S. (1997). Demographic genetic of the Japanese beech, *Fagus crenata*, at Ogawa Forest Preserve, Ibaraki, Central Honshu, Japan. I. Spatial genetic substructuring in local populations. *Plant Species Biol.* 12: 107-135.

Kitamura, K., Takasu, H., Hagiwara, S., Homma, K., O'Neill, J., Whigham, D.F. y Kawano, S. (2008). Demographic genetics of American beech (*Fagus grandifolia* Ehrh.) IV.

Development

Knowles, L. L. (2000). Test of pleistocene speciation in montane grasshoppers (genus *Melanoplus*), from the sky islands of western North America. *Evolution* 54(4): 1337-1348.

- Koch, J. L., Carey, D. W. y Mason, M. E. (2009). Use of microsatellite markers in an American beech (*Fagus grandifolia*) population and paternity testing. *Silvae Genet* 9: 62-68
- Kramer, K., Degen, B., Buschbom, J., Hickler, T., Thuiller, W., Sykes, M. T., y de Winter, W. (2010). Modelling exploration of the future of European beech (*Fagus sylvatica*) under climate change—Range, abundance, genetic diversity and adaptive response. *Forest Ecology and Management*, 259(11): 2213-2222.
- Kremer, A., Ronce, O., Robledo- Arnuncio, J. J., Guillaume, F., Bohrer, G., Nathan, R., Bridle, R. J., Gomulkiewicz, R., Klein, K. K., Ritland, K., Kuparinen, A., Gerber, S. & Schueler, S. (2012). Long- distance gene flow and adaptation of forest trees to rapid climate change. *Ecology letters*, 15(4): 378-392.
- Lazar I. & Lazar, I. (2010). Gel Analyzer 2010: Freware 1D gel electrophoresis image analysis software 2010.
- Leal-Jiménez M.A. (2014). Conservar los bosques mesófilos de montaña. En: Gual-Díaz M, Rendón-Correa A. (Comp.). *Bosques Mesófilos de Montaña de México: diversidad, ecología y manejo*. México, D.F.: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, pp. 327-345. ISBN: 978-607-7607-35-9.
- Li, Y. y Liu, J. (2018). Structure Selector: A web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. *Molecular Ecology Resources* 18: 176-177.

- Li-Ping, J., Huei-Chuan, S. & Yu-Chung, C. (2012). Microsatellite primers for the endangered beech tree, *Fagus hayatae* (Fagaceae). *American Journal of Botany* 453-456.
- Little, E. L. (1965). Mexican beech, a variety of *Fagus grandifolia*. *Castanea* 30: 167-170.
- Markért C.L., Moller F. (1959). Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species-specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 45: 753-763.
- Merzeau, D., Comps, B. B., Thiebaut, B., Cuguen, J. & Letouzey, J. (1994). Genetic structure of natural stands of *Fagus sylvatica* L. (beech). *Heredity* 72: 269-277.
- Milad, M., Schaich, H., Bürgi, M. & Konold, W. (2011). Climate change and nature conservation in Central European forests: a review of consequences, concepts and challenges. *Forest Ecology and Management* 261: 829-843.
- Miranda, F., & Sharp, A. J. (1950). Characteristics of the vegetation in certain temperate regions of Eastern Mexico. *Ecology*, 31(3): 313-333.
- Montiel-Oscuro D., Ramírez-Herrera C., Ángeles-Pérez G., López-Upton J. & Antonio-López P. (2013). Variación aloenzimática y tamaño poblacional de haya mexicana (*Fagus grandifolia* subsp. mexicana) en la Sierra Madre Oriental. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 36: 413-420.
- Ohsawa, M. (1990). An interpretation of latitudinal patterns of forest limits in south and east Asian mountains. *Journal of Ecology* 78: 326-339.

- Ortiz-Quijano, A.B., Cuevas-Cardona, M. del C. & Sánchez-González A. 2015. Historia ambiental de tres bosques de haya del estado de Hidalgo, México, periodo 1935-2014. *Historia 2.0: Conocimiento Histórico en Clave Digital* 5: 25-41.
- Ortiz-Quijano, A.B., Sánchez-González, A., López-Mata, L. & Villanueva, J.D. (2016). Population structure of *Fagus grandifolia* subsp. *mexicana* in the cloud forest of Hidalgo State, Mexico. *Botanical Sciences*, 94(3): 483-497. doi:10.17129/botsci.515
- Pastorelli, R., Smulders, M. J. M., Van'tWestende, W. P. C., Vosman, B., Giannini, R., Vettori, C. & Vendtamin, G. G. (2003). Characterization of microsatellite markers in *Fagus sylvatica* L. and *Fagus orientalis* Lipsky. *Molecular Ecology Resources* 3: 76-78.
- Peakall, R. & Smouse, P. E. (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excl. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Notes* 6: 288-295, <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
- Pérez, P. M. (1994). Revisión sobre el conocimiento dendrológico, silvícola y un censo de las poblaciones actuales del género *Fagus* en México. Tesis de Maestría (Biología). Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. 146 pp
- Pérez-Nasser, N. y Piñero, D. (1997). Izoenzymes. *Botanical Sciences*, 60: 77-84.
- Peters, R. (1992). Ecology of beech forest in the northern hemisphere. PhD thesis, Wageningen Agricultural University, Wageningen. 125p.
- Peters, R., (1997). Beech Forests. *Geobotany* 24, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

- Piotti, A., Leonardi, S., Heuertz, M., Buiteveld, J., Geburek, T., Gerber, S., Kramer, K., Vettori, C. & Vendramin, G. G. (2013). Within-Population Genetic Structure in Beech (*Fagus sylvatica* L.) Stands Characterized by Different Disturbance Histories: Does Forest Management Simplify Population Substructure? PLoS ONE September 2013 Volume 8 Issue 9 e73391.
- Piry, S., Luikart, G. & Cornuet, J. M. (1999). BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. Journal of Heredity 90: 502-503.
- Pluess, R. A & Weber, P. (2012). Drought-Adaptation Potential in *Fagus sylvatica*: Linking Moisture Availability with Genetic Diversity and Dendrochronology. PLoS ONE Volume 7
- Prakash, S., Lewontin R.C., & Hubby, J.L. (1969). A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. IV Patterns of genic variation in central marginal and isolated population of *Drosophila pseudobscura*. Genetics, 61: 841-858.
- Premoli, A. C. 2003. Isozyme polymorphisms provide evidence of clinal variation with elevation in *Nothofagus pumilio*. Journal of Heredity, 94: 218-226.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics, 155: 945-959.
- Puig, H., Bracho, R., & Sosa, V. J. (1983). Composición florística y estructura del bosque mesófilo en Gómez Farías, México. Botánica 8: 339-359

- Rodríguez-Ramírez, E. Ch., Sánchez-González, A. & Ángeles-Pérez, G. (2013). Current distribution and coverage of Mexican beech forests *Fagus grandifolia* subsp. *mexicana* in Mexico. *Endangered Species Research* 20: 205-216.
- Rodríguez-Ramírez, E. Ch., Sánchez-González, A. & Ángeles-Pérez, G. (2016). Relationship between vegetation structure and microenvironment in *Fagus grandifolia* subsp. *mexicana* forest relicts in Mexico. *Journal of Plant Ecology*, rtw138,10.1093/jpe/rtw138. Pages 1-11. Publicado online 24 de diciembre de 2016.
- Rodríguez-Ramírez, E. Ch., Sánchez-González, A. & Ángeles-Pérez, G. (2013). Current distribution and coverage of Mexican beech forests *Fagus grandifolia* subsp. *Mexicana* in Mexico. *Endangered Species Research* 20: 205-216.
- Rose, L., Leuschner, C., Köckemann, C. & Buschmann, H. (2009). Are marginal beech (*Fagus sylvatica* L.) provenances a source for drought tolerant ecotypes? *European Journal of Forest Research* (128), 335-343.
- Rowden, A., Robertson, A., Allnutt, T., Heredia, S., Williams-Linera, G. & Newton A.C. (2004). Conservation genetics of Mexican beech, *Fagus grandifolia* var. *mexicana*. *Conservation Genetics* 5: 475-484.
- Ruiz-Jiménez, CA., Téllez-Valdés, O., Luna-Vega, I. (2012). Clasificación de los bosques mesófilos de montaña de México: afinidades de la flora. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 83: 1110-1144. DOI: <http://doi.org/10.7550/rmb.29383>.
- Rzedowski, J. (1996). Análisis preliminar de la flora vascular de los bosques mesófilos de montaña de México. *Acta Botánica Mexicana* 35: 25-44.

- Sánchez-Sánchez, H. (2005). Coevolución genética de la interacción parásito-hospedero. *Ciencias Naturales y Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México.* 12(2): 144-148.
- Santos, H., Rousselet, J., Magnoux, E., Paiva, M. R., Branco, M. & Kerdelhue, C. (2007). Genetic isolation through time: allochronic differentiation of a phenologically atypical population of the pine processionary moth. *Proceedings of the Royal Society N-Biological Sciences* 274(1612): 935-941.
- Schlichting, C. D. (2004). The role of phenotypic plasticity in diversification. In *Phenotypic Plasticity: Functional and Conceptual Approaches* (ed. T. J. DeWitt and S. M. Scheiner), pp. 191-200. Oxford: Oxford University Press
- SEMARNAT. (2010). [Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales]. 2010. Norma Oficial Mexicana NOM-059SEMARNAT-2010, Protección ambiental – Especies nativas de México de flora y fauna silvestres – Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio – Lista de especies en riesgo. *Diario Oficial de la Federación.* 2da Sección, 30 de diciembre de 2010.
- Slatkin, M. & Barton, N. H. (1989). A comparison a three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution*, 43: 1349-1368.
- Slatkin, M. (1993). Isolation by distance in equilibrium and nonequilibrium populations. *Evolution*, 47: 264-279.
- StatSoft, Inc. (2011). STATISTICA, ver. 10 (data analysis software system). Tulsa. www.statsoft.com.

- Téllez-Valdés, O., Dávila-Aranda, P. & Lira-Saade R. (2006). The effects of climate change on the long-term conservation of *Fagus grandifolia* var. *Mexicana*, an important species of the cloud forest in eastern Mexico. *Biodiversity and Conservation* 15:1095-1107.
- Toledo-Aceves, T., Meave, J.A., González-Espinosa, M. & Ramírez-Marcial, N. (2011). Tropical montane cloud forests: current threats and opportunities for their conservation and sustainable management in Mexico. *Journal of Environmental Management* 92: 974-981
- Tomaru, N., Mitsutsuji, T., Takahashi, M., Tsumur, Y., Uchida, K. & Ohba, K. (1996). Genetic diversity in *Fagus crenata* (japanese beech): influence of the distributional shift during the late-Quaternary. *Heredity*. 78: 241-251.
- Vargas-Rodríguez, Y.L., Platt, W.J., Vázquez-García, J.A. & Boquin, G. (2010). Selecting relict montane cloud forests for conservation priorities: the case of Western Mexico. *Natural Areas Journal* 30:156173.
- Vettori, C. & Vendtamin, G. G. (2003). Characterization of microsatellite markers in *Fagus sylvatica* L. and *Fagus orientalis* Lipsky. *Molecular Ecology Resources* 3: 76-78.
- Villaseñor, J.L. (2010). El Bosque Húmedo de Montaña en México y sus Plantas Vasculares: Catálogo Florístico-Taxonómico. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad/Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México.

- Vornam, B., Decarli, N., & Gailing, O. (2004). Spatial Distribution of Genetic Variation in a Natural Beech Stand (*Fagus sylvatica* L.) Based on Microsatellite Markers. *Conservation Genetics*, 5(4): 561-570.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van De Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. & Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. 23: 4407-4414
- Wang, Z.Y., Second, G. & Tanskley, S.D. (1992). Polymorphism and phylogenetic relationships among species in the genus *Oryza* as determined by analysis of nuclear RFLPs. *Theoretical and Applied Genetics* 83 :565-581
- Williams, K. G., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalsky, J. A. & Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18:6531-6533
- Williams-Linera, G., Pérez, I., & Tolome, J. (1996). El bosque mesófilo de montaña y un gradiente altitudinal en el centro de Veracruz, México. *La Ciencia y el Hombre* 23: 149-161.
- Williams-Linera, G., Rowden, A., & Newton, A. C. (2003). Distribution and stand characteristics of relict populations of Mexican beech (*Fagus grandifolia* var. *mexicana*). *Biological Conservation* 109: 27-36.
- Yu-Sheng, L., Wei-Ming, W. & Monohara A. (1998). China's beech forests in the Pre-Quaternary. *Mitteilungen aus dem Museum für Naturkunde in Berlin*. 1:151-16