



El Colegio de la Frontera Sur

Diferenciación genética y fenotípica de especies de encinos (*Quercus*: Fagaceae) de Los Altos de Chiapas, México.

Tesis

presentado como requisito parcial para optar al grado de
Maestra en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural
Con orientación en Ecología y Sistemática

Por

Ana Cristina Ruiz Domínguez

2021



El Colegio de la Frontera Sur

San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, 02 de agosto de 2021

Las personas firmantes abajo, miembros del consejo examinador de: **Ana Cristina Ruiz Domínguez** hacemos constar que hemos revisado y aprobado la tesis titulada **“Diferenciación genética y fenotípica de especies de encinos (*Quercus*: Fagaceae) de Los Altos de Chiapas, México”** para obtener el grado de **Maestra en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural**.

Directora: Dra. Lorena Ruiz Montoya

Asesora: Dra. Gabriela Castellanos Morales

Asesor: Dr. Alfonso Ángel González Díaz

Sinodal adicional: Dr. Neptalí Ramírez Marcial

Sinodal adicional: Dra. Bárbara Cruz Salazar

Sinodal suplente: Ligia Guadalupe Esparza Olguín

Dedicatoria

A mi mamá, hermanas y sobrinos con todo mi amor y cariño por ser mi pilar.

A todas aquellas personas que han sido un ejemplo a seguir y mi apoyo.

Agradecimientos

A mi familia, por su amor, confianza y apoyo en cada una de las etapas vividas durante el posgrado y en la vida misma.

A mi consejo tutelar: la Dra. Lorena Ruiz Montoya, el Dr. Alfonso Ángel González Díaz y la Dra. Gabriela Castellanos Morales, por su apoyo a lo largo de la realización del proyecto, conocimientos compartidos, la confianza depositada en mí y aceptar formar parte de este camino a pesar de las circunstancias.

A la Biól. Maricela García Bautista por todo el apoyo brindado durante el trabajo de laboratorio a pesar de lo complicado y frustrante que a veces resultara.

A los directivos de PRONATURA A. C, El Centro Ecoturístico Arcotete, El Parque Natural Encuentro, Parque Educativo San José y dueños de los predios de Tenejapa, Tzontehuitz, Huixtán, Zinacantán y Teopisca, por permitirnos la entrada a los sitios para realizar las colectas.

A don Alfonso Luna Gómez, José Ignacio Sántiz García, David E., Andrés y Adriana por su apoyo durante las salidas a campo.

Al Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR) por abrirme sus puertas y por todo el aprendizaje obtenido a lo largo de mi estancia en el posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca de Maestría que permitió llevar a término este proyecto.

A Claudia Brunel y Laura Rubio por su apoyo y confianza.

A Azucena, Ana Laura, David, Yanet, Miriam, Viridiana, Chahim y Camilo por el tiempo y aprendizajes compartidos durante la Maestría.

Al Dr. Neptalí Ramírez Marcial, la Dra. Bárbara Cruz Salazar y Dra. Ligia Guadalupe Esparza Olguín por aceptar formar parte de mis sinodales, sus comentarios fueron valiosos para culminar este proyecto.

Tabla de contenido

Resumen.....	7
Capítulo 1	
1.1 Introducción general.....	8
1.2 Concepto de especie utilizado en el género <i>Quercus</i>	10
1.3 Objetivos.....	11
1.4 Metodología.....	12
Capítulo 2	
2.1 Artículo enviado a la revista Acta Botánica Mexicana: Genetic and morphological differentiation of <i>Quercus</i> species (Fagaceae) in Los Altos de Chiapas, Mexico.....	14
2.2 Abstract.....	14
2.3 Introduction.....	16
2.4 Materials and methods.....	19
2.4.1 Area of study and collection.....	19
2.4.2 Linear morphometry.....	22
2.4.3 Geometric morphometry.....	23
2.4.4 Genetic variation.....	24
2.4.5 Relationship between morphometric and genetic variation.....	26
2.5 Results.....	27
2.5.1 Linear morphometry.....	27
2.5.2 Geometric morphometry.....	28
2.5.3 Genetic variation.....	32
2.5.4 Relationship between morphometric and genetic variation.....	36
2.6 Discussion.....	38
2.7 Conclusions.....	44
2.8 Contributions of authors.....	45
2.9 Financing.....	45
2.10 Acknowledgments.....	45
2.11 References.....	45

Capítulo 3

3.1 Discusión general.....	58
3.2 Conclusiones generales.....	61
3.3 Literatura citada.....	63

Resumen

Los encinos o robles como también se les conoce a las especies de *Quercus* son el grupo más diverso dentro de la familia Fagaceae. Se caracterizan por su alta variación morfológica intra e interespecífica y su alta capacidad de hibridación. Por lo anterior, a este género se le considera como taxonómicamente complicado para la delimitación sin ambigüedades de sus especies.

En Chiapas se han reportado alrededor de 44 especies agrupadas en dos secciones (*Lobatae* y *Quercus*) y para la región de Los Altos de Chiapas se tiene un registro de 23 especies. El número de especies para cada región es difícil de precisar debido a que la clasificación taxonómica de los encinos se basa principalmente en la morfología foliar y distribución geográfica. Sin embargo, los cambios en la morfología foliar pueden ser resultado de cambios fenotípicos, cuya plasticidad está asociada al ambiente, lo cual dificultan la identificación taxonómica entre especies.

En el presente trabajo se realizó la caracterización morfológica y genética de 13 especies de *Quercus*, colectando material vegetal en 12 localidades de Los Altos de Chiapas, para determinar el nivel de diferenciación genética y morfológica entre estas especies. La caracterización se hizo mediante el análisis de cinco caracteres vegetativos, con base en medidas lineales y en la relación geométrica de 23 puntos morfométricos en las hojas de los individuos mediante morfometría geométrica y la secuenciación de la región de cloroplasto *matK* de 105 individuos de las 13 especies de *Quercus*. Los resultados muestran una baja diferenciación morfológica y genética entre especies. Los caracteres lineales como el ancho de la hoja, longitud total de la hoja y longitud de la hoja, ayudaron a discriminar a *Q. crassifolia*, *Q. calophylla*, *Q. rugosa*, *Q. crispipilis*, *Q. ocoteifolia*, *Q. acutifolia* y *Q. polymorpha*. El análisis de morfometría geométrica y el marcador molecular *matK* permitieron separar claramente a siete de las 13 especies. A partir de los datos genéticos se identificaron dos grupos de haplotipos que corresponden a la sección *Lobatae* y *Quercus*. Para separar a las seis especies restantes (*Q. acatenangensis*, *Q. castanea*, *Q. dysophylla*, *Q. peduncularis*, *Q. sapotiifolia* y *Q. segoviensis*) se necesitan estudios considerando otros caracteres morfológicos y marcadores moleculares más variables.

Palabras claves: Encinos blancos, encinos rojos, ADN de cloroplasto, morfometría geométrica, variación.

Capítulo 1.

1.1 Introducción general

Chiapas cuenta con una gran diversidad de ecosistemas debido a la complejidad fisiográfica e historia geológica de la región (Müllerried 1957). Se considera como uno de los estados más importantes de México en cuanto a diversidad florística, la cual está conformada entre 8,250 y 10,000 especies de plantas vasculares (Rzedowski 1978, Breedlove 1986 y González-Espinosa et al. 2005).

Miranda (1952) y Breedlove (1981) reconocen para Chiapas entre 12 y 18 formaciones vegetales, de las cuales los bosques de pino, pino-encino y bosque mesófilo de montaña constituyen los tipos de vegetación que predominan en las regiones fisiográficas de la Sierra Madre, Los Altos de Chiapas y las Montañas del Norte (Palacio-Prieto et al. 2000; González-Espinosa et al. 2005). Los bosques de pino-encino (asociaciones de especies de *Pinus* spp. y *Quercus* spp.) de Los Altos de Chiapas contienen una gran diversidad de especies arbóreas (Rzedowski 1978, Breedlove 1981) lo mismo que los bosques mesófilos de montaña; en ambos dominan las especies del género *Quercus* (Juárez-Medina 2013).

A nivel mundial se estima que hay entre 300 y 600 especies de *Quercus* (McVaugh 1974; Valencia 2004) y lo constituyen dos subgéneros: *Quercus* y *Cyclobalanopsis*. El subgénero *Quercus* comprende las secciones *Lobatae* (encinos rojos), *Protobalanus* (encinos intermedios) y *Quercus* (encinos blancos) *sensu stricto* (Manos et al. 1999). La riqueza de especies de *Quercus* para México es difícil de precisar, ya que el número varía según los autores (Zavala-Chávez 1998, Valencia 2004, Rzedowski 1978, Nixon 1993 y Álvarez-Zúñiga et al. 2010).

En Chiapas se han reportado alrededor de 44 especies de *Quercus*, agrupadas en dos secciones: *Quercus* y *Lobatae* (Valencia 2004, Villaseñor 2016), de las cuales 10 están dentro de alguna categoría de riesgo (Breedlove 1981; González-Espinosa et al. 2007). Para Los Altos de Chiapas se han registrado 23 especies de *Quercus* (Alba-López et al. 2003, Quintana-Ascencio y González-Espinosa 1993; Rocha-Loredo et al. 2010);

sin embargo, el número de especies de cada región de Chiapas podría cambiar, en la medida en que se estudie más la ecología y taxonomía de los encinos en el estado.

La clasificación taxonómica de las especies de encinos se basa principalmente en la morfología (tamaño y forma) de sus hojas y en su distribución geográfica (Bacilieri et al. 1995, Meade y Parnell 2003). Se ha propuesto que la forma y tamaño de las hojas de los encinos es resultado de un proceso de selección natural (Bacilieri et al. 1995); sin embargo, se ha observado que la amplia variación en el tamaño y forma de las hojas de los encinos es principalmente ambiental. Es decir, la variación observada en las especies es plasticidad fenotípica y no totalmente producto de la variación genética bajo selección.

Si los genotipos de una población son sensibles al ambiente, es posible que estos expresen fenotipos distintos en función de la variación ambiental, al grado que especies emparentadas filogenéticamente pueden ser fenotípicamente similares en ciertas condiciones ambientales; lo que podría indicar procesos de desarrollo involucrados en la evolución de los caracteres como el paralelismo (Hall 2003, Shubin et al. 2009). También es esperable que, una misma especie sea fenotípicamente diferente en ambientes contrastantes, como resultado de la alta plasticidad fenotípica que presentan los mismos. Otra fuente de variación fenotípica de origen genético es la capacidad de hibridación (entrecruzamiento entre especies diferentes) de los encinos, cuyo producto puede ser una especie distinta con rasgos fenotípicos intermedios con relación a los de las especies que participan en la hibridación (González-Rodríguez et al. 2004; Tovar-Sánchez y Oyama 2004; González-Rodríguez y Oyama 2005). Tanto la plasticidad fenotípica como la hibridación producen una amplia variación y similitudes fenotípicas que dificultan la identificación taxonómica de las especies de encinos y han generado numerosas sinonimias que reducen el número de especies en ciertas áreas geográficas (Muller y McVaugh 1972, McVaugh 1974, Zavala 1998, Martínez-Cabrera et al. 2011).

De las 23 especies descritas hasta el momento para Los Altos de Chiapas, 16 se encuentran dentro de la sección *Lobatae* (*Q. acatenangensis*, *Q. acutifolia*, *Q. benthamii*, *Q. calophylla*, *Q. conspersa*, *Q. cortesii*, *Q. castanea*, *Q. crispipilis*, *Q. crassifolia*, *Q. dysophylla*, *Q. laurina*, *Q. ocoteifolia*, *Q. sapotiifolia*, *Q. skutchii*, *Q. tenuaristata*, *Q. xalapensis*) y siete dentro de la sección *Quercus sensu stricto* (*Q. obtusata*, *Q. pilarius*, *Q. polymorpha*, *Q. rugosa*, *Q. segoviensis*, *Q. peduncularis* y *Q. sebifera*), las cuales

presentan sinonimia. En taxonomía, sinonimia hace referencia a la existencia de dos o más nombres científicos designadas a un mismo taxón (Turland et al. 2018). Por ejemplo, *Q. acatenangensis* es considerado como sinónimo de *Q. ocoteifolia* (Valencia y Flores-Franco 2006). Se sabe también que *Q. acutifolia* ha sido objeto de revisiones taxonómicas por estar confundida con *Q. conspersa* y/o *Q. grahamii*, pero mediante la revisión del espécimen tipo éstas últimas han sido propuestas como sinónimos y parte del complejo *Acutifoliae* (Romero 2006; Valencia-A. et al. 2015). *Quercus achoteana* es considerado como sinónimo de *Q. segoviensis*; *Q. cerifera*, *Q. cinnamomea* y *Q. skutchii* como sinónimos de *Q. crispipilis* y *Q. petiolaris* como sinónimo de *Q. polymorpha* (Valencia y Flores-Franco 2006).

Por otro lado, *Q. laurina* es una especie que puede presentar hibridación con *Q. affinis* (González-Rodríguez y Oyama 2005). Estudios en poblaciones de *Q. rugosa* sugieren que la variación morfológica de sus hojas está asociada a factores ambientales como la precipitación y es una especie de amplia distribución (Uribe-Salas et al. 2009), que puede presentar hibridación con *Q. glabrescens* y es considerada como la especie que presenta hibridación con un mayor número de especies (Zavala 1995, Núñez-Castillo et al. 2011). En la región de Los Altos de Chiapas se presentan condiciones ambientales asociadas a la acentuada orografía que repercute en la variación de la temperatura, humedad y radiación solar lo que probablemente afecta la expresión fenotípica y los procesos de divergencia de las especies de encinos.

1.2 Concepto de especie en el género *Quercus*

Las especies son la unidad fundamental de los estudios biológicos (Mayer 1982, Rosell et al. 2010, Bacon et al. 2012, Su et al. 2015), ya que proveen las bases para describir la diversidad natural y los procesos evolutivos que operan en la naturaleza (Rosenberg 1985).

Existen diversos conceptos de especie, todos ellos contribuyen al conocimiento y comprensión de los organismos vivos y su biología. Sin embargo, ninguno de estos conceptos ha sido universalmente aceptado debido a que los criterios de determinación varían de acuerdo al campo y grupo con el que se trabaja (Mayden 1997, De Queiroz 2007, Aldhebiani 2018, Valencia-Ávalos 2021).

Tradicionalmente los estudios de los encinos estan basados en el concepto biológico y taxonómico de especie. Sin embargo, el uso de estos conceptos dentro del género *Quercus* ha sido cuestionado, debido a la frecuente hibridación entre diferentes especies (Grant 1971, Burger 1975 y Hardin 1975) y alta variación intra e interespecífica (Valencia-Ávalos 2004). Por lo que, Simeone y colaboradores (2013) consideran que para definir la identidad de las especies de *Quercus*, es necesario hacer una revisión profunda basada en la sinergia de múltiples datos para cada taxón, como ecología, morfología, historia y genética. Lo anterior ha llevado a considerar que el concepto de especie unificado propuesto por De Queiroz (2007) es adecuado para tratar a las especies de *Quercus*, ya que considera a las especies como linajes que han evolucionado a diferentes ritmos, lo mismo que sus caracteres (morfológicos, genéticos, etc).

1.3 Objetivos

En este estudio se propuso como objetivo general analizar la variación fenotípica y genética de las especies de *Quercus* que se distribuyen en Los Altos de Chiapas.

Los objetivos específicos fueron:

1. Analizar el nivel de diferenciación morfológica entre especies de *Quercus* en Los Altos de Chiapas con base en el análisis de caracteres lineales y geométricos.
2. Determinar el nivel de diferenciación genética entre especies de *Quercus* presentes en Los Altos de Chiapas con base en una región del cloroplasto (*matK*).
3. Analizar la relación entre la variación genética y morfológica de las especies de *Quercus* presentes en Los Altos de Chiapas.
4. Ratificar las especies de *Quercus* reportados para Los Altos de Chiapas.
5. Determinar la riqueza de especies de *Quercus* presentes en Los Altos de Chiapas a partir de datos morfológicos y genéticos de los ejemplares obtenidos en campo.

1.4 Metodología

La presente investigación tuvo como fundamento metodológico el análisis de caracteres foliares a través de la morfometría tradicional y geométrica, así como el estudio de la variación genética mediante el análisis de la región de cloroplasto *matK*.

La clasificación taxonómica de las especies del género *Quercus* está basada principalmente en la caracterización morfológica de las especies, mediante el análisis cualitativo (forma del ápice, margen y base) y cuantitativo (largo y ancho) de las hojas (Acedo 2004, Martínez-Cabrera et al. 2011). Sin embargo, estos caracteres no siempre logran establecer claramente los límites taxonómicos de las especies dentro de un género, como en el caso de *Quercus*, debido a que hay especies que presentan plasticidad fenotípica asociada a las condiciones ambientales en el que se desarrollan (Pedroso et al. 2010).

Ante tal dificultad, una de las soluciones emergentes ha sido el análisis digital de imágenes mediante la morfometría geométrica. La morfometría geométrica es una herramienta que permite el análisis de los patrones de forma, donde las mediciones derivan de contornos y puntos morfológicos claves o *landmarks* (Adams et al. 2004). El análisis por puntos clave permite caracterizar la forma a través de coordenadas de un conjunto de puntos que pueden ser localizados inequívocamente en cada uno de los especímenes bajo estudio (Klingenberg et al. 2002). Lo que nos permite capturar la forma de las estructuras con mayor eficiencia, además de poder analizar las variaciones en tamaño y forma por separado (Klingenberg y McIntyre 1998). Por lo que la morfometría geométrica, es una herramienta útil en estudios taxonómicos y ecológicos de plantas y un método complementario a la morfometría tradicional (Jaramillo-Ocampo 2011, Viscosi et al. 2010, Canché-Delgado et al. 2011, Klingenberg et al., 2012).

Ante la complejidad biológica de las especies, se requiere que los límites taxonómicos sean estudiados desde perspectivas múltiples y complementarias (Padial y de la Riva 2007).

Actualmente, el código de barras de ADN ha surgido como una nueva herramienta para identificación de especies. Un código de barras de ADN es una región de ADN corta y estandarizada que normalmente se utiliza para la identificación de especies (Hebert et al. 2003).

Dentro de los códigos de barras propuestos por el grupo de trabajo de plantas del consorcio para el código de barras de la vida (CBOL) se encuentra la región codificante *matK* (Hollingsworth et al. 2009). El gen *matK* es una región con una tasa evolutiva rápida y ha demostrado buenos niveles de discriminación entre especies (66 %). Sin embargo, la universalidad de los oligonucleótidos utilizados para su amplificación tiene resultados variables entre grupos de plantas (Hollingsworth et al. 2009, Lahaye et al. 2008). La utilización de estas herramientas en forma combinada puede ser de gran ayuda, más aún cuando se utilizan para la verificación de especies y análisis filogenéticos.

Por lo tanto, se espera que la información obtenida en el presente trabajo contribuya al mejoramiento de la delimitación de las especies de *Quercus* de Los Altos de Chiapas y sea útil para la conservación y el manejo de los encinos en la región. En los siguientes capítulos de la tesis se presentan más detalles del marco teórico de la tesis, la metodología, resultados y discusión de éstos. En el capítulo 2, se encuentran detalles del marco metodológico que se realizó para cubrir los diferentes objetivos específicos y corresponde al artículo científico derivado del trabajo de tesis. El artículo fue enviado a la Revista Acta Botánica Mexicana.

En el tercer capítulo se hace una discusión adicional a la presentada en el capítulo 2, y se ofrecen conclusiones generales, así como líneas de investigación que le dan continuidad al trabajo.

Capítulo 2.

2.1 Artículo sometido a la Revista Acta Botánica Mexicana: Genetic and morphological differentiation of *Quercus* (Fagaceae) in Los Altos de Chiapas, Mexico.

Genetic and Morphological Differentiation of *Quercus* Species (Fagaceae) in Los Altos de Chiapas, Mexico

Diferenciación genética y morfológica entre especies de *Quercus* (Fagaceae) en Los Altos de Chiapas, México

***Quercus* in Los Altos de Chiapas**

Ana Cristina Ruiz-Domínguez¹, Lorena Ruiz-Montoya¹, Alfonso Ángel González-Díaz¹ y Gabriela Castellanos-Morales²

¹El Colegio de la Frontera Sur, Unidad San Cristóbal, Departamento de la Conservación de la Biodiversidad. Carretera Panamericana y Periférico Sur s/n, María Auxiliadora, C. P. 29290, San Cristóbal de Las Casas, Chiapas, México.

²El Colegio de la Frontera Sur, Unidad Villahermosa, Departamento de Conservación de la Biodiversidad. Carretera a Reforma Km. 15.5 s/n Ra, Guineo 2da. Sección. C.P. 86280. Villahermosa, Tabasco, México.

Abstract

Background and Objectives:

Oaks (*Quercus* spp.) belong to the family Fagaceae and dominate the forests in Los Altos de Chiapas (Chiapas Highlands), Mexico, where they promote plant and animal diversity. Until now, the genetic and morphological variation of *Quercus* species in this region has not been reported. This study aimed at determining the levels of genetic and morphological variation in 13 oak species recorded in Los Altos de Chiapas.

Methods:

Leaves were collected from 205 *Quercus* trees of 13 species in 12 locations across Los Altos de Chiapas. Morphological variation was determined based on the measurement of five leaf characters and the analysis of leaf shape through geometric morphometrics. The genetic analysis was

performed by sequencing the chloroplast *matK* region (810 bp); then the level of genetic diversity (*H_d*) was obtained for each species. To determine the genealogical relationships between taxa, we obtained a haplotype network, estimated Nei's genetic distance, and subsequently grouped these taxa by the UPGMA method. Additionally, genetic clusters of species were obtained through a Bayesian population assignment (BAPS) analysis. Finally, genetic differentiation was correlated with morphological differentiation between taxa through a Mantel test.

Key results:

We recorded a wide morphological variation and low genetic differentiation among the 13 *Quercus* species inhabiting Los Altos de Chiapas. Little genetic and morphological differentiation was observed between *Q. ocoteifolia* and *Q. acatenangensis*, supporting the previous hypothesis that they are synonyms. Geometric morphometrics and analysis of the *matK* region (cDNA) clearly separated seven of the 13 species. The genetic data clearly separated the sections *Lobatae* and *Quercus*. The genetic and morphological distances were not significantly correlated.

Conclusions:

The 13 *Quercus* species inhabiting Los Altos de Chiapas showed low levels of genetic and morphological differentiation. Further studies are needed to identify the factors determining the observed morphological and genetic differentiation between species and to identify the characters that better define each *Quercus* species.

Key words: white oaks, red oaks, chloroplast DNA (cDNA), taxonomy, variation.

Resumen

Antecedentes y objetivos:

Los encinos (*Quercus*) pertenecen a la familia Fagaceae y son especies que dominan los bosques de la región de Los Altos de Chiapas, México, en donde son promotores de diversidad tanto de plantas como de animales. Hasta ahora no se había reportado la variación genética y morfológica de las especies de *Quercus* en esta región. El objetivo de este estudio fue determinar el nivel de variación genética y morfológica de 13 especies de encinos registrados en Los Altos de Chiapas.

Métodos:

Se colectaron hojas de 205 individuos de *Quercus* de 13 especies en 12 localidades de Los Altos de Chiapas. La variación morfológica se determinó con base en la medición de cinco caracteres foliares y el análisis de la forma de la hoja a través de morfometría geométrica. El análisis genético se realizó mediante la secuenciación de la región de cloroplasto *matK* (810 pb), con lo que se estimó

el nivel de diversidad genética por especie (H_d). Para determinar las relaciones genealógicas entre taxa se obtuvo una red de haplotipos, luego se estimó la distancia genética de Nei y posteriormente se agruparon por el método de UPGMA. Adicionalmente, se obtuvieron grupos genéticos de especies a través de un análisis Bayesiano de estructura poblacional (BAPS). Finalmente, se estimó la correlación entre la diferenciación genética y morfológica entre taxa por medio de una prueba de Mantel.

Resultados clave:

Registramos una amplia variación morfológica y baja diferenciación genética entre las 13 especies de *Quercus* de Los Altos de Chiapas. Se observó poca diferenciación genética y morfológica entre *Q. ocoteifolia* y *Q. acatenangensis*, lo cual apoya la hipótesis previa de que son sinónimos. La morfometría geométrica y el análisis de la región *matK* (ADNc) permitieron separar claramente a siete de las 13 especies. Las secciones *Lobatae* y *Quercus* fueron claramente diferenciadas a partir de los datos genéticos. El análisis de correlación entre la distancia genética y morfológica fue no significativo.

Conclusiones:

Los niveles de diferenciación genética y morfológica entre las 13 especies de *Quercus* de Los Altos de Chiapas fueron bajos. Se requieren estudios adicionales para determinar los factores que promueven diferenciación morfológica y genética observada entre las especies y para identificar caracteres que delimiten mejor las especies de *Quercus*.

Palabras clave: encinos blancos, encinos rojos, ADN de cloroplasto (ADNc), taxonomía, variación.

Introduction

Oaks, as *Quercus* species are commonly known comprise a highly diverse and taxonomically complex biological group within the family Fagaceae (Manos et al., 1999; Acedo, 2004). Worldwide, the genus is distributed in temperate and subtropical areas of the northern hemisphere, with two recognized centers of diversity, one in southeast Asia and the other in the mountainous regions of central and eastern Mexico (Nixon, 1998; Valencia-Ávalos, 2004; Rzedowski, 2006). Villaseñor (2016) recognizes about 174 species in Mexico, which are grouped in three sections:

Quercus (white oak), *Lobatae* (red oak), and *Protobalanus* (intermediate oak) (Nixon, 1993; Manos et al., 1999; Valencia, 2004; Álvarez-Zúñiga et al., 2010).

In Chiapas, 44 species have been recorded to date; of these, 10 are listed within a risk category (González-Espinosa et al., 2007, 2009, 2011; Villaseñor, 2016). In particular, around 23 oak species are recorded for the central highlands of the state of Chiapas, a region commonly known as Los Altos de Chiapas (Alba-López et al., 2003; González-Espinosa et al., 2006).

Similar to the taxonomic and systematic classification of most plants, oak species are defined based on leaf morphology (Bell and Bryan, 2008; Meade and Parnell, 2003; Marcus, 1990; Henderson, 2006). The typical leaf characters used are shape of the apex, base, and margin, and leaf length and width (Marcus, 1990; Hernández, 2014). However, changes in foliar morphology can result from plastic phenotypic changes as the leaf is highly exposed to environmental conditions (Sack and Frole, 2006). In oaks, for example, foliar variation has been observed between populations, between individuals, and even between branches of the same individual; thus, it has been proposed that oaks display high plasticity and phenotypic differentiation related to the environment they inhabit (González-Rodríguez and Oyama, 2005). Another source of phenotypic variation in oaks is hybridization, i.e., the crossing between different species (González-Rodríguez et al., 2004; Tovar-Sánchez and Oyama, 2004; González-Rodríguez and Oyama, 2005). Both hybridization and phenotypic plasticity contribute to foliar variation giving rise to a wide variety of shapes; this adds complexity to the taxonomic identification of species and can produce numerous synonymies and uncertainty in the number of species in certain geographic areas (Muller and McVaugh, 1972; McVaugh, 1974; Zavala, 1998; Martínez-Cabrera et al., 2011).

The reliable distinction of oak species is crucial for their conservation and management. Thus, the analysis of their levels of phenotypic and genetic variation in a given geographic region can be useful for improving the knowledge of the local species. Today, geometric morphometrics

(GM) is an alternative to linear morphometry to detect morphological divergence in biological groups displaying slight differences. GM allows estimating the size and shape of organisms, as well as the relationship between these traits and ecological and evolutionary processes (Dryden and Mardia, 1998; Viscosi and Cardini, 2011; Valcárcel and Vargas, 2010).

On the other hand, neutral molecular markers represent an additional source of information that is not under selection by environmental factors (Martínez et al., 2010). In particular, chloroplast DNA (cpDNA) is considered a neutral molecular marker that allows the interpretation of genetic variation patterns from a broad temporal perspective as it is haploid, not subject to recombination, and characterized by uniparental inheritance (paternal in gymnosperms and maternal in angiosperms; Petit et al., 2002; Lumaret et al., 2002). In addition, the chloroplast shows a low mutation rate, which is useful for the characterization of variation patterns in several tree species (López de Heredia et al., 2005).

Oak species are considered one of the main components of vegetation in Los Altos de Chiapas and are of great ecological and economic importance; nevertheless, the genetic-morphological studies carried out for the genus *Quercus* in the region are scarce (Martínez, 2011; Rivas, 2017). Most studies on *Quercus* have focused on aspects related to the ecological succession of mountain forests and the propagation of trees for forest restoration (González-Espinosa et al., 2007; Quintana-Ascencio and González-Espinosa, 1993; Martínez-Icó et al. 2015; Martínez-Meléndez and López-Santiago, 2019). The present work investigated the genetic and morphological differentiation of 13 *Quercus* species reported for Los Altos de Chiapas and assessed the taxonomic resolving power of analyzed data. This information is expected to contribute to: (1) validate previously reported species and (2) assess the power of lineal and geometric morphometrics and certain cpDNA regions to solve taxonomic uncertainty in *Quercus*. The results of this analysis are valuable for the management and conservation of oak species in Los

Altos de Chiapas and set the grounds for further studies addressing the taxonomic and genetic diversity of oak species at local, and regional levels.

Materials and Methods

Study Area and Leaf Collection

Leaf samples for morphological and genetic analyses of the 13 species of *Quercus* studied were collected from 12 localities of six municipalities in the Los Altos de Chiapas region (CEIEG, 2020) (Table 1, Fig. 1). This region is located within parallels 16°15'' latitude and –91° 50'' longitude, over an altitudinal range of 1500 to 2840 m asl, stretching across 3717.08 km² (INEGI, 2010). The climate of the region is temperate subhumid, with a mean annual temperature of 14.8°C and mean annual precipitation of 1402 mm (García, 1987).

The Los Altos de Chiapas region is formed by a massif of limestone rocks and rendzina soils, deep humic acrisols, and infertile chromic luvisols (INEGI, 2010). The dominant vegetation types are pine-oak forest in the highest parts and mountain cloud forest in areas with high humidity. The current landscape comprises vast areas of secondary vegetation and grasslands (CEIEG, 2020).

Sampling sites were determined from records of oak species from the Herbarium of Colegio de la Frontera Sur (ECO-SC-H). The areas selected for the present study are currently covered by well-preserved oak-pine, oak, and pine-oak forests (Table 1). Leaf samples were taken from five randomly selected individual with a distance of at least 100 m between them of the species found in each site. From each individual, leaf samples were collected from different branches with no apparent damage. The leaf samples for the morphometric analysis were placed between newspaper sheets in wooden presses with the respective label. Samples were determined using taxonomic keys (Valencia-Ávalos et al., 2002; Romero, 2006), species descriptions (Trelease, 1924 and Muller,

1942), and by comparison with specimens available in virtual herbaria (Tropics, 2020; JSTOR, 2020).

For the genetic analysis, three to five healthy young leaves were collected per individual; these leaves were placed in plastic bags and labeled, and then stored at -20°C to preserve the tissues until DNA extraction.

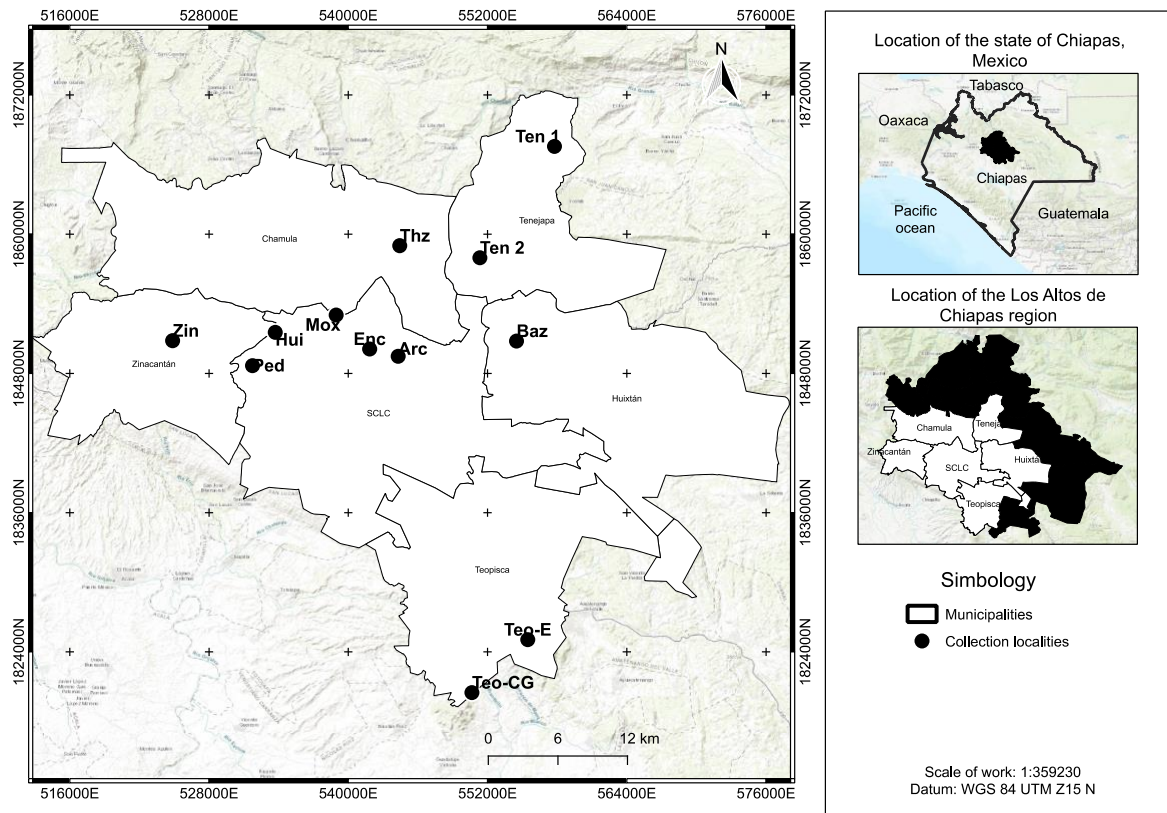


Figure 1: Location of the sampling sites for leaf samples of *Quercus* in the Los Altos de Chiapas region. **Ten 1**= Ch'ixtontik, **Ten 2** = Centro de Tenejapa, **Mox**= Moxviquil, **Thz**= Tzontehuitz, **Enc** = Encuentro, **Arc** = Arcotete, **Hui**= Huitepec, **Ped**= Parque Educativo San José, **Zin**= Zinacantán, **Teo-E** = Teopisca, **Teo-CG** = Cerro grande, Teopisca, **Baz** = Bazom.

Table 1: Locality, municipality, georeference coordinates, and altitude of sampling sites of 13 *Quercus* species in Los Altos de Chiapas. Q. aca = *Q. acatenangensis*, Q. acu = *Q. acutifolia*, Q. cal = *Q. calophylla*, Q. cas = *Q. castanea*, Q. cras = *Q. crassifolia*, Q. cris = *Q. crispipilis*, Q. dys = *Q. dysophylla*, Q. oco = *Q. ocoteifolia*, Q. ped = *Q. peduncularis*, Q. pol = *Q. polymorpha*, Q. rug = *Q. rugosa*, Q. sap = *Q. sapotiifolia*, Q. seg = *Q. segoviensis*.

Locality	Species												
	Q. aca	Q. acu	Q. cal	Q. cas	Q. cras	Q. cris	Q. dys	Q. oco	Q. ped	Q. pol	Q. rug	Q. sap	Q. seg
Bazom, Huixtán (16°44'50'' N 92°29'45'' W; 2400 m asl)	X				X		X	X			X		
Arcotete Ecotourism Center (16°43'55'' N 92°35'05'' W; 2350 m asl)					X	X	X				X		X
San José Educational Park (16°43'12'' N 92°42'03'' W; 2380 m asl)					X	X		X			X		
Encuentro National Park (16°44'13'' N 92°38'15'' W; 2136 m asl)					X	X	X	X			X		X
Huitepec Ecological Reserve (16°44'43'' N 92°40'46'' W; 2750 m asl)			X		X			X			X		
Moxviquil Ecological Reserve (15°45'22'' N 92°37'55'' W; 2240 m asl)						X	X				X		X
Tenejapa (16°49' No. 92°30' W; 2060 m asl)		X	X		X			X	X			X	
Teopisca (16°32'33'' N 92°28'19'' W; 1800 m asl)		X	X	X	X			X	X			X	
Tzontehuitz, Chamula (16°48'35'' N 92°34'24'' W; 2800 m asl)					X			X			X		
Zinacantán (16°46' N 92°43' W; 2162 m asl)					X	X	X	X		X	X		
Total No. of Individuals (N)	4	6	12	1	38	37	12	30	9	1	39	2	14

Linear Morphometry

We collected five leaves per individual of each species; these were individually scanned at a resolution of 200 dpi with the upper side of the leaf facing upwards and a sheet of millimetric paper as background for scale reference. The number and location of the anatomical marks were determined by tracing equidistant lines with the MakeFan program (Sheets, 2014); subsequently, these were digitalized (placed) with the programs tpsUtil and tpsDig ver 2.26 of the TPS series (Rolf, 2015); this generated a matrix of coordinates for each leaf sample.

From the coordinate matrix, five morphological characters of the leaf underside were measured using the CoorGen8 program of the software Integrated Morphometrics Package (IMP) (Sheets, 2001). The characters measured were as follows: total leaf length (TLL, distance between the leaf apex and the base of the petiole), leaf length (LL, measured from the leaf apex to the base, not including the petiole), leaf width (LW, measured at the widest cross-section), petiole width (PW), and petiole length (PL) (Uribe-Salas et al., 2008; Zúñiga et al., 2009; Ruiz-Domínguez, 2016).

The data were normalized by $\log_{10}$ transformation and processed through a multivariate analysis of variance (MANOVA), with the species as the independent variable with 13 levels (species) (Zar, 1999). To assess the degree of separation between species, we used a discriminant function (DA) analysis based on the metrics of the five leaf characters. The morphometric separation was visualized through a biplot that was constructed with the averages of the scores of the first two discriminant functions. The MANOVA and DA were conducted in the PAST program (Hammer et al., 2001).

Geometric Morphometrics

The images of leaves used for linear morphometry were also used for the geometric analysis, which allowed obtaining a geometric description of leaf shape. A configuration of 23 anatomical points was designed, consisting of five major marks (type-1 landmarks) and 18 semilandmarks or secondary marks. Type-1 landmarks are discrete homologous anatomical points that are recognized in all samples and species. This study included five type-1 landmarks, two located in the petiole, one at the apex, and two at the base of the leaf (Fig. 2). Semilandmarks are points with a variable anatomical position, which depends on the natural shape of the leaf, so these were used to delimit the contour of the leaf (Aguirre and Jimenez-Prado, 2018). The number and location of semilandmarks were defined by tracing equidistant cross-lines on the image of each leaf with the MakeFan program of the IMP software (Sheets, 2014). Subsequently, the MakeFan images were used to set type-1 landmarks and semilandmarks to construct a matrix of geometric coordinates using the programs tpsUtil and tpsDig ver 2.26 of the TPS series (Rolf, 2015) (Fig. 2).

From the coordinate matrix, we performed a Generalized Procrustes Analysis (GPA) to eliminate the variation in the shape of the leaf due to the orientation, location and scale of the analyzed organisms (Klingenberg and McIntyre, 1998), and to obtain the matrix for the shape variables (partial warps) and for the centroid size (CS). To eliminate the effect of leaf size on shape, we performed a regression analysis between the matrix of shape variables and the natural logarithm of the centroid size (Aguirre and Jiménez-Prado, 2018). The residual values of this regression were used for further statistical analyses. We conducted a Principal Component Analysis (PCA) and a Canonical Variate Analysis (CVA) to reduce the number of coordinates and to evaluate the morphological differentiation between species due to the geometric configuration of leaf shape (Lattin et al., 2003; De Luna, 2020). Subsequently, we used the first two principal components to

elaborate deformation grids, which provide a visual description of the partial change in the shape of the specimens. Also, the contours of the consensus leaves for each species were extracted from these data (Manly, 1986; Lattin et al., 2003). All analyses were performed in the MorphoJ program (Klingenberg, 2011); graphs were constructed with the PAST program (Hammer et al., 2001).

Figure 2: Configuration of anatomical points of *Quercus* leaves. Blue dots represent type-I landmarks and black dots represent semilandmarks

Genetic Variation

Total DNA was extracted from leaves collected from 205 individuals of different *Quercus* species. Prior to extraction, the leaves were washed with 70% alcohol and distilled water to remove the pubescence in both sides of the leaf. From each sample, 60 mg of tissue were weighed and macerated with liquid nitrogen to form a dust. Then, we used the CTAB 2× method for DNA extraction (Doyle & Doyle, 1987), adjusting for substance volumes and incubation time. DNA

extraction and quality were verified by electrophoresis in 1% (w/v) agarose gel in TAE 1× buffer and stained with ethidium bromide.

DNA Amplification, Visualization, and Sequencing

From the extracted DNA we amplified a fragment of the *matK* gene through the polymerase chain reaction (PCR) (Yang et al., 2017). The *matK* region was amplified in a Bio Rad T100 thermal cycler in a final volume of 32 µL. Each reaction was prepared with a mixture of 13 µL of Taq 2× Master Mix (QIAGEN), 10 µL of nuclease-free water (QIAGEN), 3 µL of each primer (forward and reverse) (IDT), and 3 µL of DNA. PCR conditions were: initial denaturation at 94°C for 2 minutes, followed by 30 denaturation cycles at 94°C for 1 minute; alignment at 55°C for 1 minute; elongation at 72°C for 2 minutes; and final extension at 72°C for 7 minutes (Yang et al., 2017).

PCR products were confirmed by 2% agarose gel electrophoresis using 3 µL sample (DNA), 2 µL dye (Blue Orange, Promega), and 2 µL ladder 100 bp (Promega). DNA migration was performed in a horizontal electrophoresis chamber (OWL, model B1) in buffer (TBE 1×), applying a current of 90 volts (V) for 45 minutes. Gels were stained with ethidium bromide for 20 minutes and photographed with an imaging system (BioRad, Universal Hood III model). The fragments obtained from the PCRs were sent for Sanger DNA sequencing on an ABI PRIS 3730XL (Macrogen Inc. Seoul, Korea).

Genetic Data Analysis

To confirm that the sequences belong to the genus *Quercus*, we conducted a Nucleotide Blast analysis at NCBI-GenBank webpage (Benson et al., 2015). Afterward, sequences were edited manually and then aligned using the ClustlalX algorithm contained in MEGA version 7.0 (Kumar et al., 2016). For further analyses sequences should have the same length so we removed the

extreme bases of the longest sequences. The sequences obtained were deposited in the NCBI-GenBank database (accession number MZ383802-MZ383813) (Benson et al., 2015).

We used DNAsp program (Librado and Rozas, 2009) to estimate standard measures of genetic variation parameters including the number of haplotypes (H), haplotype diversity (H_d), number of segregating or variable sites (S), and nucleotide diversity (π). We determined the genealogical relationships between haplotypes by constructing a network of haplotypes in the program Network 5.0 with the *Median Joining* algorithm (Bandelt et al. 1999), where all minimum-expansion trees are pooled within the network following an algorithm equivalent to the one proposed by Excoffier and Smouse (1992).

The genetic similarity between individuals was assessed by calculating Nei's standard genetic distance between species (Nei, 1978) with the program MEGA version 7.0 (Kumar et al., 2015). Additionally, a Bayesian analysis of population structure was performed in the rhierbaps library (Cheng et al., 2013; Tonkin-Hill et al., 2018) in R (RCore Team, 2020). We run ten iterations setting $K = 13$ as the upper limit of genetic groups (K). The individual probabilities of assignment to each genetic group for the best-supported value of K were plotted using the ggplot2 library (Wickham, 2010) in R (R Core Team, 2020).

Relationship between Morphometric and Genetic Variation

The coherence between morphometric and genetic variation was assessed using the Nei's genetic distances matrix (Nei, 1972) and recovering the matrix of Mahalanobis distances from the Canonical Variate Analysis (CVA) of geometric morphometrics. From these, we obtained a dendrogram by UPGMA (Unweighted pair-group average) of each matrix; the position of each species was visually compared between both analyses. Finally, the correlation between the two

distance matrices was analyzed using a Mantel test implemented in the Vegan package (Oksanen et al., 2020) using the software R (R Core Team, 2020).

Results

Linear Morphometry

The lowest values of total leaf length (TLL), leaf length (LL), leaf width (LW), and petiole width (PW) were observed in *Quercus crispipilis* (TLL = 39.93 mm, LL = 37.78 mm, LW = 14.73 mm, PW = 0.45 mm); *Q. calophylla* showed the highest values for TLL and PL (TLL = 308.6 mm, PL = 38.34 mm). Highest values for LL, LW, and PW were observed in *Q. crassifolia* (LL = 288.28 mm, LW = 175.61 mm, PW = 8.02 mm). The lowest petiole length was recorded in *Q. ocoteifolia* (PL = 0.93 mm). The MANOVA detected overall significant differences between species (Wilks Lambda $g_{.acit.60/4729} = 45.23$; $p < 0.05$). However, the results of the Hotelling paired values test showed that *Q. sapotiifolia*-*Q. crispipilis*, *Q. sapotiifolia*-*Q. disophylla*, and *Q. sapotiifolia*-*Q. ocoteifolia* did not differ significantly ($p > 0.05$).

The first two discriminant functions (FD) captured 90.49% of the variation. The first and second discriminant factors accounted for 73.6% and 16.89% of the variation, respectively. Leaf width (LW) was the most important trait on the first discriminant function (FD1, eigenvector = 12.06). The most relevant traits for discriminant function 2 (DF2) were total leaf length (TLL) and leaf length (LL). The discriminant function analysis found that 67.96% (150 specimens) of the 205 individuals analyzed were correctly classified as the species initially assigned.

The biplot of the first two functions shows a trend toward the morphological separation of *Q. calophylla*, *Q. crassifolia*, *Q. rugosa*, *Q. crispipilis*, *Q. ocoteifolia*, *Q. polymorpha*, and *Q. acutifolia*, although an overlap was observed in some cases (Fig. 3).

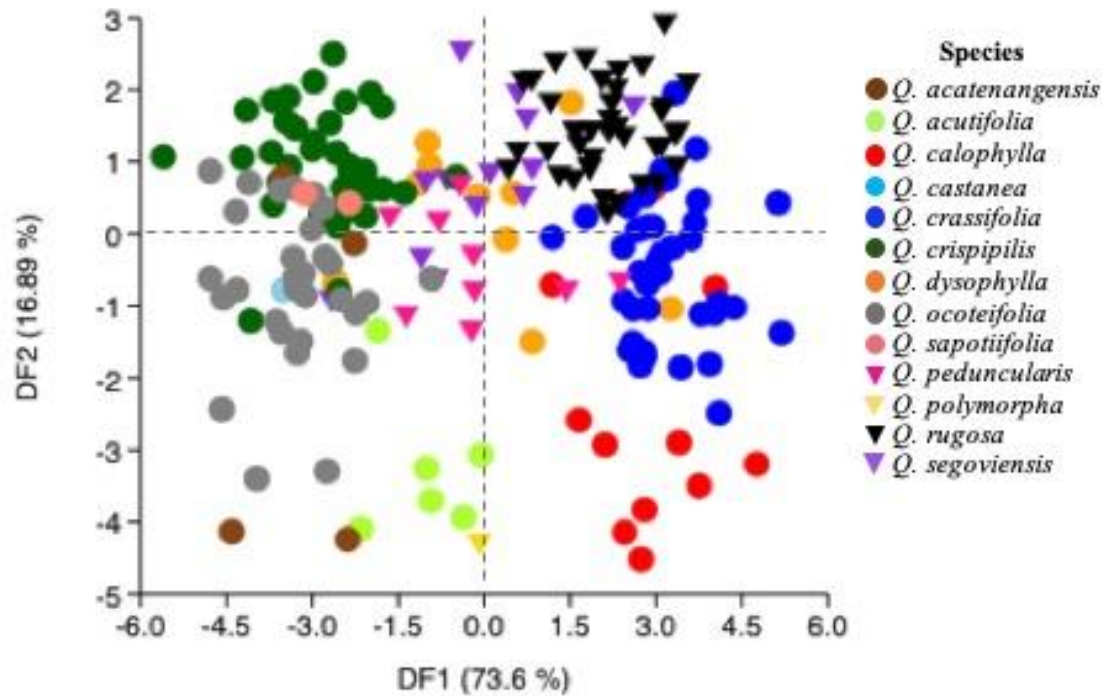


Figure 3: Scatterplot of the discriminant analysis based on the five linear variables recorded for the 13 *Quercus* species. Circles correspond to species in the section *Lobatae*; triangles correspond to species in the section *Quercus*

Geometric Morphometrics

The first two components explained 81.73% of the total variance. The first and second components accounted for 72.25% and 9.48% of the variation, respectively (Fig. 4). The deformation grids based on the negative and positive sections of CP1 showed that, in all species, leaf shape changes as a result of the expansion or retraction of the apical and middle parts of the leaf. In CP2, the greatest variation occurs in the shape of both the petiole and the base of the leaf (Fig. 5). The species positioned on the negative side of the CP1 axis have broad leaves with the apex slightly pronounced, while the species positioned in the positive section of CP1 have narrower elliptical leaves with pronounced apices and thin petioles. The positive axis of CP2 is associated with the separation of species with lobed leaves. The scatterplot of the averages of scores of the first two components shows the relative segregation of some species, e.g., *Q. ocoteifolia*, *Q. calophylla*, *Q.*

crassifolia, *Q. crispipilis*, and *Q. rugosa* (Fig. 4). For their part, *Q. acatenangensis*, *Q. acutifolia*, and *Q. ocoteifolia* share a similar leaf shape; the same is observed in the group of *Q. crispipilis*, *Q. sapotiifolia*, and *Q. dysophylla*, and in the group of *Q. peduncularis*, *Q. segoviensis*, *Q. crassifolia*, and *Q. rugosa* (Fig. 6).

The averages of the first two canonical variables explained 83.64% of the total variation in leaf morphology (CV1 = 56.6% and CV2 = 27.04%). The scatterplot of the canonical variables 1 (CV1) and 2 (CV2) showed the segregation of seven species: *Q. calophylla*, *Q. crassifolia*, *Q. crispipilis*, *Q. ocoteifolia*, *Q. acutifolia*, *Q. rugosa*, and *Q. polymorpha*; although some cases of overlap of traits were observed (Fig. 7)

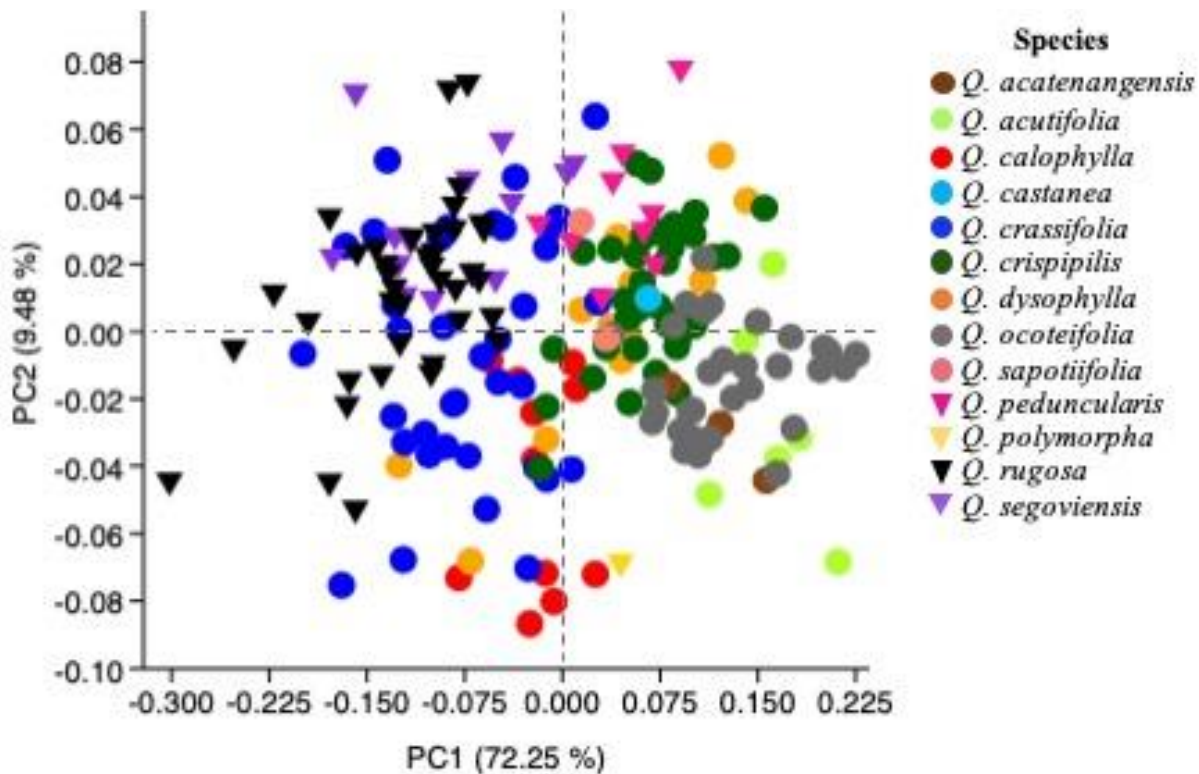


Figure 4: Scatterplot of the first two PCA components based on the five linear foliar variables measured in the 13 *Quercus* species.

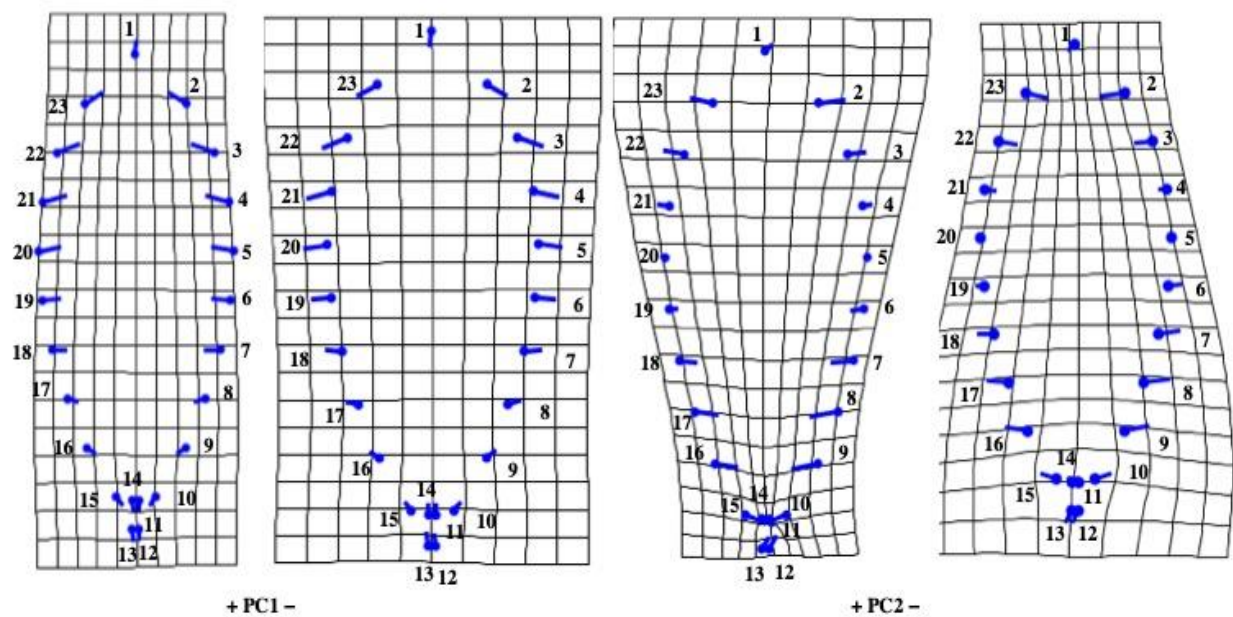


Figure 5: Deformation grids obtained from the positive and negative axes of PCA components 1 and 2 for the 13 *Quercus* species present in Los Altos de Chiapas.

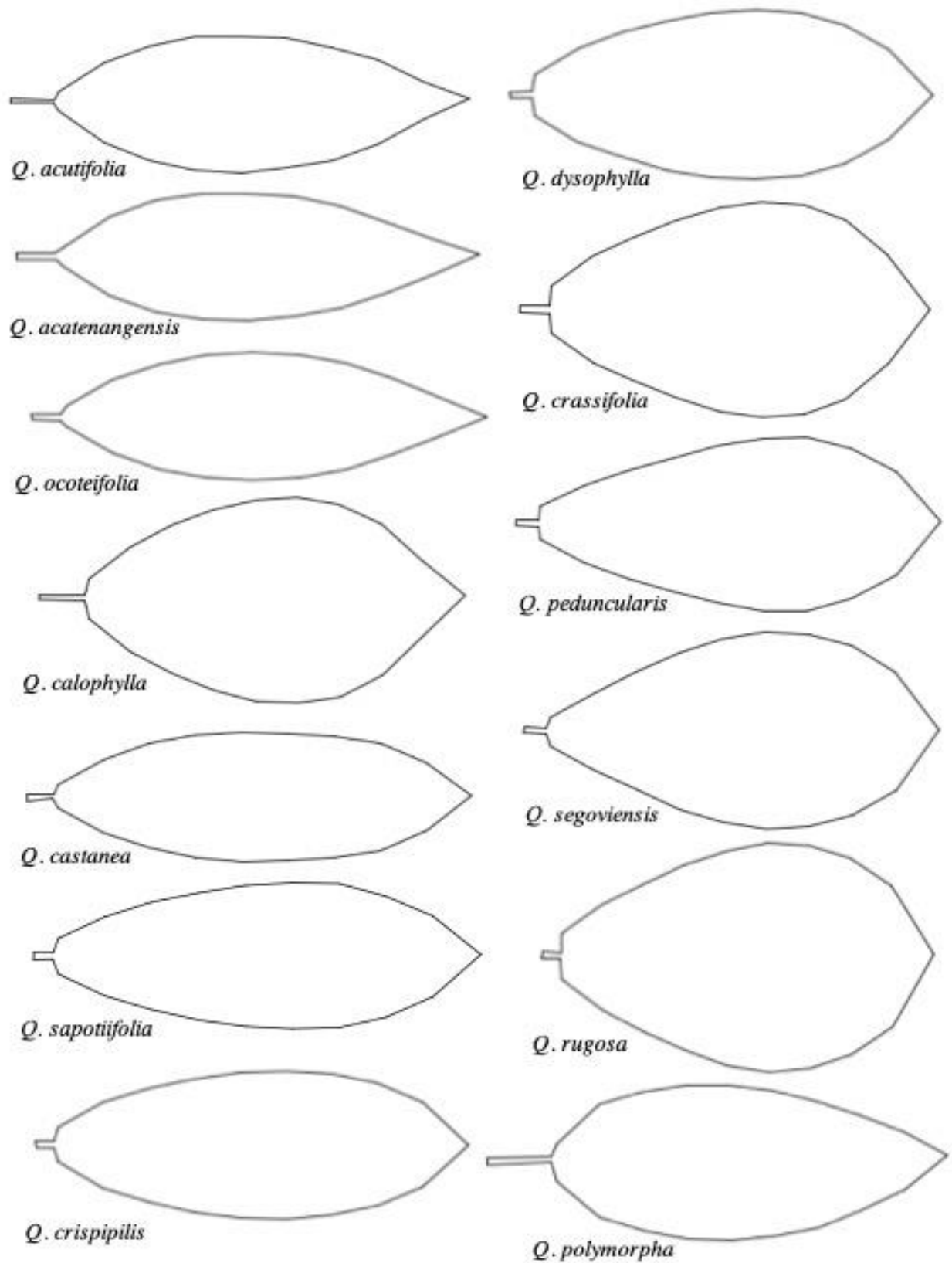


Figure 6: Reconstruction of contours obtained from the PCA for each species of *Quercus* analyzed.

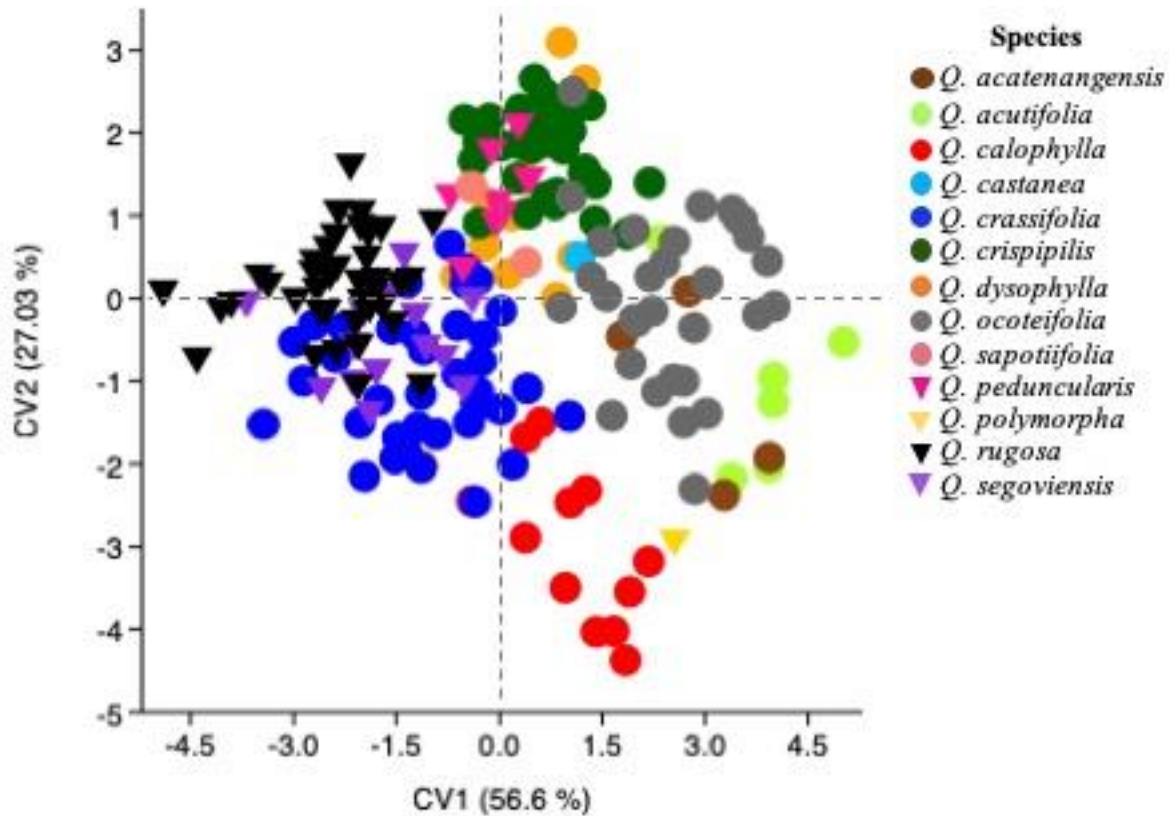


Figure 7: CVA plot for the 13 *Quercus* species present in Los Altos de Chiapas. Circles correspond to species in the section *Lobatae*; triangles correspond to species in the section *Quercus*.

Genetic Variation

Good-quality DNA was obtained from 108 of the 205 samples collected, corresponding to a variable number of samples for the 13 species. The marker *matK* was successfully amplified in 105 samples; three sequences were discarded due to the poor quality (noise in the electropherogram), as in several sites the correct base could not be recognized. The final alignment for the *matK* region had a length of 810 bp, with a total of 17 segregating sites, 12 haplotypes, haplotype diversity (H_d) of 0.674, and nucleotide diversity (π) of 0.0047 (Table 2).

The haplotype network shows 17 mutations and reveals two groups of haplotypes corresponding to the sections *Quercus* and *Lobatae*. The highest number of mutations was observed

between haplotypes H1 and H11 and between H6 and H8. H1 was the most frequent haplotype; it was observed in nine species pertaining to the section *Lobatae* (Fig. 8). H3 was the second most frequent haplotype, being recorded in four species, three of which belong to the section *Quercus*.

Six of the 12 haplotypes were unique. Of these, H9 and H10 were observed only in *Q. ocoteifolia*; H5 and H6, in *Q. crassifolia*; and H11, in *Q. calophylla*; all the above species belong to the section *Lobatae*. These haplotypes are connected to H1 in the haplotype network. Haplotype H12 was only observed in *Q. rugosa* (section *Quercus*). The rest of haplotypes were observed in more than two individuals and are shared between two or more species. H4 is shared between *Q. crassifolia*, *Q. crispipilis*, and *Q. ocoteifolia* (section *Lobatae*). H8 is shared between *Q. segoviensis* and *Q. polymorpha* (section *Quercus*); H7, between *Q. rugosa* and *Q. segoviensis* (section *Quercus*); and H2, between *Q. crassifolia* and *Q. dysophylla* (section *Lobatae*).

The Bayesian allocation analysis detected two genetic groups ($K = 2$) (Fig. 9). The first includes individuals of *Q. acutifolia*, *Q. calophylla*, *Q. crispipilis*, *Q. dysophylla*, *Q. crassifolia* (except for two individuals), *Q. ocoteifolia*, *Q. sapotiifolia*, *Q. acatenangensis*, and *Q. castanea*, all in the section *Lobatae*. For their part, *Q. peduncularis*, *Q. rugosa*, *Q. segoviensis*, and *Q. polymorpha*, all in the section *Quercus*, form another group, which also includes two individuals of *Q. crassifolia*.

Table 2. Genetic diversity by species of *Quercus* collected in Los Altos de Chiapas. **N** = number of sequences, **S** = segregating sites, **H** = number of haplotypes, **H_d**= haplotype diversity, **π** = nucleotide diversity.

Species	N	S	H	H _d	π
<i>Q. acatenangensis</i> Trel.*	1	-	1	-	-
<i>Q. acutifolia</i> Née.	2	0	1	0	0
<i>Q. calophylla</i> Schltdl. & Cham.	6	5	2	0.3333	0.0020
<i>Q. castanea</i> Née. *	1	-	1	-	-
<i>Q. crassifolia</i> Humb. & Bonpl.	19	9	6	0.7777	0.0028
<i>Q. crispipilis</i> Trel.	18	1	2	0.1250	0.0016
<i>Q. dysophylla</i> Benth.	6	1	2	0.2500	0.0002
<i>Q. ocoteifolia</i> Liebm.	13	2	2	0.2948	0.0003
<i>Q. sapotiifolia</i> Liebm.*	1	-	1	-	-
<i>Q. peduncularis</i> Née	5	0	1	0	0
<i>Q. polymorpha</i> Schltdl. & Cham.*	1	-	1	-	-
<i>Q. rugosa</i> Née	23	3	3	0.3122	0.0005
<i>Q. segoviensis</i> Liebm.	9	2	3	0.4166	0.0006
Total	105	17	12	0.674	0.0047

* The diversity indices of these species could not be calculated because only one haplotype was recorded. Data in **bold** correspond to the highest diversity values.

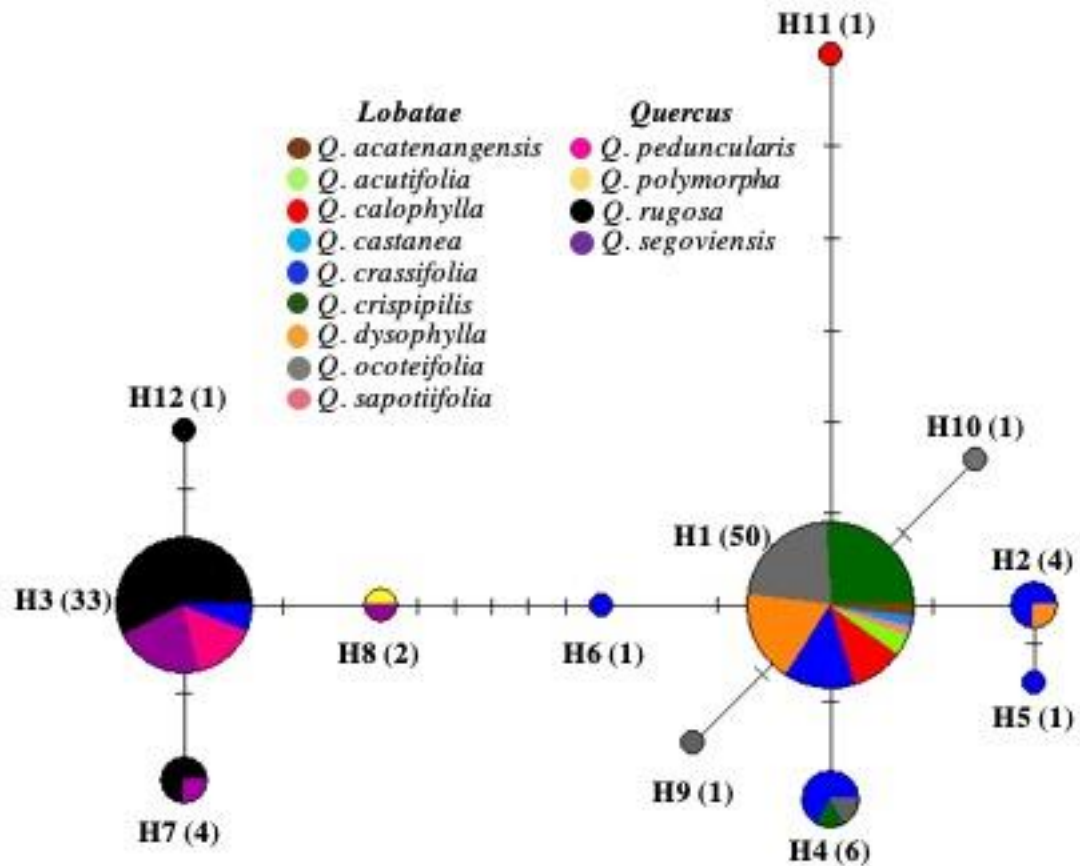


Figure 8: Haplotype network of the 12 haplotypes identified in *Quercus* individuals using the Median Joining algorithm (Excoffier and Smouse, 1992). Each circle represents a single haplotype (size [in brackets] is proportional to haplotype frequency); lines represent mutational steps between haplotypes. Colors indicate the species including each haplotype according to the legend in the figure.

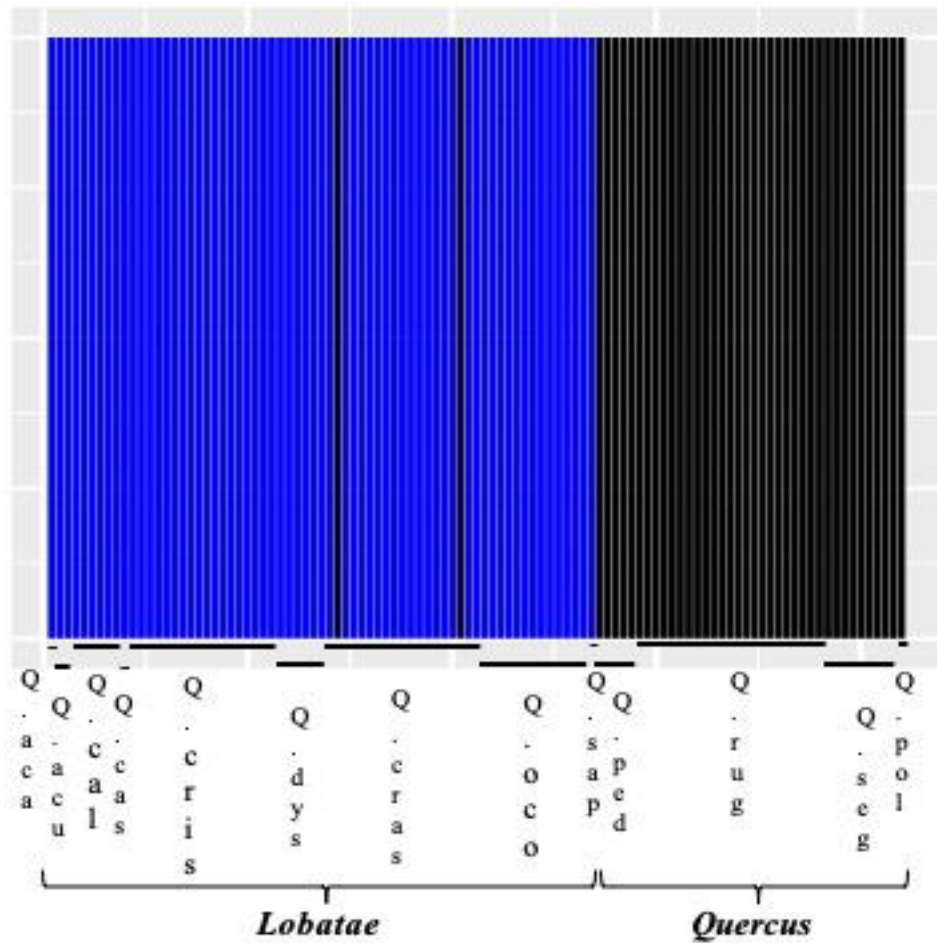


Figure 9: Results for the Bayesian analysis of population structure (BAPS) for $K = 2$, obtained for *Quercus* species present in Los Altos de Chiapas. Color bars represent the assignment of individuals to each genetic group. Q. acu = *Q. acutifolia*, Q. cal = *Q. calophylla*, Q. cris = *Q. crispipilis*, Q. dys = *Q. dysophylla*, Q. cras = *Q. crassifolia*, Q. oco = *Q. ocoteifolia*, Q. ped = *Q. peduncularis*, Q. rug = *Q. rugosa*, Q. seg = *Q. segoviensis*, Q. sap = *Q. sapotiiifolia*, Q. aca = *Q. acatenangensis*, Q. cas = *Q. castanea*, Q. pol = *Q. polymorpha*.

Relationship between Morphometric and Genetic Variation

The UPGMA built from Nei's genetic distance yields two basal groups that include the species of the sections *Lobatae* and *Quercus*. The section *Lobatae* is split into two groups, one including *Q. crassifolia* and the second *Q. dysophylla*, *Q. acutifolia*, *Q. crispipilis*, *Q. castanea*, *Q. acatenangensis*, *Q. ocoteifolia*, and *Q. sapotiiifolia*; *Q. calophylla* is bound at a greater distance.

The section *Quercus* clusters *Q. segoviensis* and *Q. rugosa*, with *Q. peduncularis* and *Q. polymorpha* joining this group at a greater distance (Fig. 10 A).

On the other hand, the dendrogram based on Mahalanobis distances obtained from the CVA of the MG analysis showed a relationship between species that differs from the cluster analysis based on genetic distances. The species were grouped into three basal groups. The first group includes *Q. acutifolia* and the second maintains the grouping of *Q. segoviensis* and *Q. rugosa* (section *Quercus*). In turn, the third cluster is split into two subgroups where *Q. ocoteifolia* and *Q. acatenangensis* remain as a group (Fig. 10 B).

According to the Mantel test, no significant correlation was found between genetic distance and phenotypic distance ($r = 0.072$, $p = 0.30$).

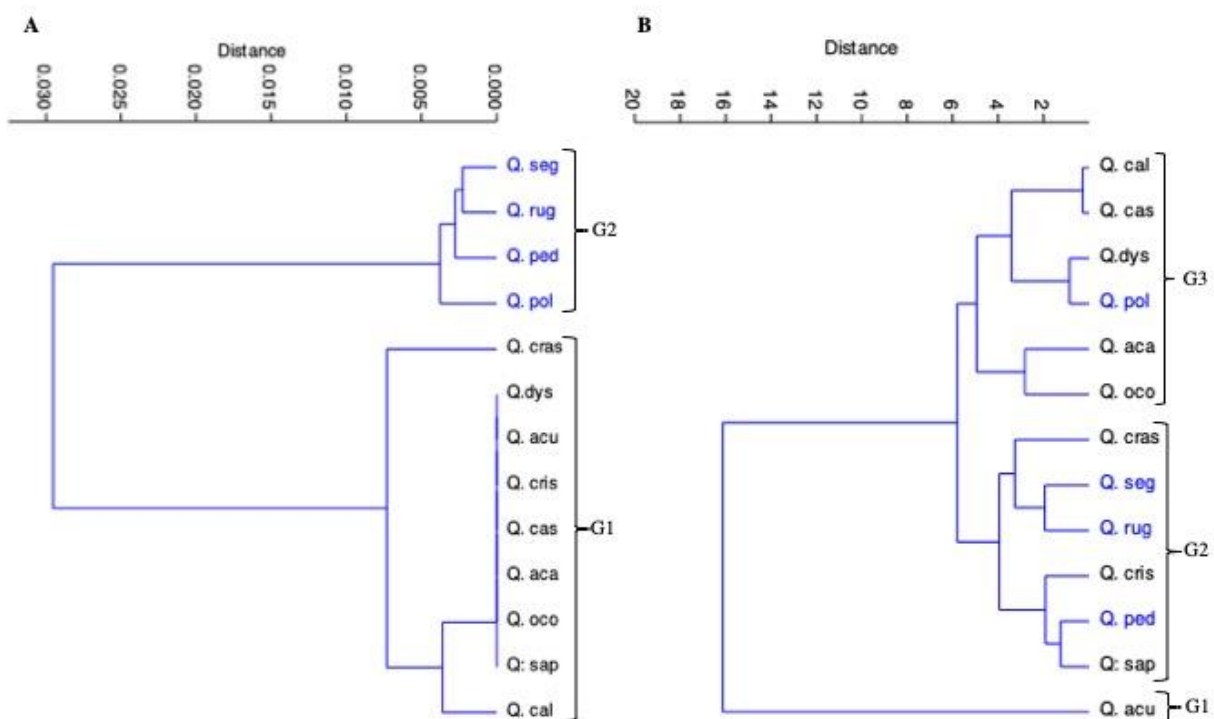


Figure 10: Dendrograms constructed with the UPGMA algorithm with Nei's genetic distances (A) and Mahalanobis distance (B) for *Quercus* species. Names in blue correspond to species in the section *Quercus*; names in black correspond to species in the section *Lobatae*. *Q. aca* = *Q. acatenangensis*, *Q. acu* = *Q.*

acutifolia, Q. cal = *Q. calophylla*, Q. cas = *Q. castanea*, Q. cris = *Q. crispipilis*, Q. dys = *Q. dysophylla*, Q. cras = *Q. crassifolia*, Q. oco = *Q. ocoteifolia*, Q. ped = *Q. peduncularis*, Q. rug = *Q. rugosa*, Q. seg = *Q. segoviensis*, Q. sap = *Q. sapotifolia*, Q. pol = *Q. polymorpha*; **G1–G3** = Group 1–3.

Discussion

The results of the present study suggest low levels of genetic and morphological differentiation among the 13 *Quercus* species present in Los Altos de Chiapas; consequently, identifying some species is a complex task. Genetic data clearly distinguished the two sections, i.e., *Lobatae* and *Quercus*, with the former including two genetic groups. On the other hand, the analyses based on geometric morphometrics and the molecular marker *matK* (cDNA) were consistent in separating seven of the 13 species included in the analysis. However, there was no correlation between genetic and morphological information.

The linear characters that were most important for separating species in both the linear and geometric analyses were leaf width, leaf length, and petiole width. These results were consistent with those obtained by Fortini et al. (2014) for *Q. frainetto*, *Q. petrae* and *Q. pubescens*. This congruence suggests that these characters may be considered for future revisions of the genus *Quercus*, or to deepen the delimitation of some species, as in the studies conducted by Curtu et al. (2007) for *Q. robur* and *Q. frainetto*. Villar and Merino (2001) mention that the specific leaf area is an attribute that can help characterize the species, however, as it is an attribute that varies depending on various environmental factors such as the availability of light, water and nutrients and the age of the individuals (De la Vega et al., 2010), it was not considered for this study.

The deformation grids (geometric morphometrics) showed that the middle part, base, apex, and petiole are the aspects showing the greatest variation in leaf shape that support species differentiation. These results are similar to those reported by Viscosi et al. (2009) in their study on

Q. frainetto, *Q. robur*, *Q. petrae*, and *Q. pubescens*. Fortini et al. (2007) also indicated that the leaf apex, petiole length, and lobe depth concentrate the morphological traits that allow differentiating between *Q. pubescens*, *Q. virgiliana*, and *Q. dalechampii*. Although the geometric morphometry analysis allows us to detect differences in leaf shape in the oaks of Los Altos de Chiapas, the differences are insufficient to completely separate the 13 species according to the sections *Quercus* and *Lobatae*, as well as to distinguish some species within the sections. The lack of separation in some of the species could be associated with the elimination of the effect of leaf size on shape, since according to Viscosi et al. (2012) the effect of size on the total variability of oak leaf shape is significant. However, given that leaf size varied significantly in only four (*Q. calophylla*, *Q. acutifolia*, *Q. crassifolia* and *Q. rugosa*) of the 13 species, it is necessary to consider other attributes that can contribute to the taxonomic delimitation of species such as seeds or trichomes, since they are considered as diagnostic characters (Acedo, 2004).

The low phenotypic or morphological separation of six of the 13 species can be attributed to the fact that leaf traits vary in response to environmental changes, which can lead to phenotypic similarity, particularly under similar environmental conditions. Los Altos de Chiapas is considered a relatively uniform physiographic region, with variations in temperature and humidity likely related to the exposure of slopes where oak trees grow (Álvarez-Moctezuma, 1999). These environmental variations may favor a similar leaf morphology across species of different sections; consequently, neither the sections nor some of the species in them could be differentiated based on leaf morphology. Several species in the section *Lobatae* were morphologically overlapped with species in the section *Quercus* (see Fig. 3 and 4). Morphological modifications associated with environmental changes frequently occur in the genus *Quercus*, and this has been a limitation to classify and determine species in the genus (Hernández, 2014; Valencia-Ávalos, 2020). Morphological changes can be observed even in leaves of the same tree under different exposure

to shade or direct solar radiation (Bruschi et al., 2003, Niinemets et al., 2004, Núñez-Castillo et al., 2011). It has also been observed that although some characters related to leaf support (petiole length and diameter) are genetically determined, the variation largely results from phenotypic plasticity (Tzukaya, 2005; Ackerly et al., 2000; Cordell et al. 1998). Therefore, studies addressing phenotypic plasticity in *Quercus* trees growing in Los Altos de Chiapas are required to determine whether the similarity between some species is driven by phenotypic plasticity. In other words, phylogenetically distant lineages may exhibit morphological similarities when growing under similar environmental conditions (Wake et al., 2011; Valencia-Ávalos, 2020).

Previous studies have indicated that *Q. ocoteifolia*, *Q. acutifolia*, and *Q. acatenangensis* may present both whole and dentate leaves in the same individual, which has led to an inaccurate specific determination (Valencia-Ávalos, 2020). Based on this possible presence of leaves with differentiated morphology in the same individual, it has been suggested that *Q. ocoteifolia* and *Q. acatenangensis* are synonyms (Valencia and Flores-Franco, 2006; WFO, 2021); however, there is a lack of detailed taxonomic studies for these species to confirm this potential synonymy. Our study shows that *Q. ocoteifolia* and *Q. acatenangensis* are morphologically similar and genetically identical; these findings support the synonymy between *Q. ocoteifolia* and *Q. acatenangensis*. Therefore, taxonomic studies at the genetic and morphological levels are needed to counterpart the taxonomic studies of *Quercus* based on macroscopic and microscopic morphology of leaves to improve the delimitation of species (Valencia-Ávalos, 2020; Peterson and Navarro-Sigüenza, 2001).

Studies of *Quercus* species in Los Altos de Chiapas and their areas of distribution should also analyze hybridization and introgression, which are common within the genus *Quercus* (Ellstrand et al., 1996), especially between species in the same section (Curtu et al., 2007; Ortego et al., 2017). These events are often favored by environmental disturbances and promote processes

leading to the rapid adaptation of species to changing environments (Rieserberg, 1997; Ortego et al., 2017; Cannon and Petit, 2019). Hybridization events may also favor the fixation of advantageous mutations in a genetic group different from the one in which these mutations appeared, producing a certain degree of genetic similarity (Leroy et al., 2017).

The hybridization phenomenon can be studied in Los Altos de Chiapas with *Q. crassifolia* and *Q. crispipilis*, which can result in *Q. dysophylla*. Morphological and genetic studies have determined that *Q. dysophylla* is the result of hybridization between *Q. crassifolia* and *Q. crassipes* (Vázquez, 1992; Tovar-Sánchez and Oyama, 2004; Vázquez and Nixon, 2013). Because reproductive barriers between oak species involved in hybridization events change between parent species, according to the species acting as maternal and paternal (Curtu et al., 2007, Jensen et al., 2009, Lepais et al. 2009). Especially, among species of section Lobatae (Kashani and Dood, 2002). Our results suggest that *Q. crassifolia* and *Q. crispipilis* could be the parental species of *Q. dysophylla* in Los Altos de Chiapas. Morphologically *Q. dysophylla* presented a leaf shape intermediate between *Q. crassifolia* and *Q. crispipilis*, and genetically they share at least one haplotype between the three species. These results are consistent with those reported by Vázquez (1992), Tovar-Sánchez and Oyama (2004) and Vázquez and Nixon (2013). Geometric morphometrics analyses are also useful to distinguish hybrid individuals, as reported by Liu et al. (2018) for *Q. aliena* and *Q. dentata*, and by Viscosi et al. (2012) and Stephan et al. (2018) for *Q. frainetto* and *Q. petrae*. To note, in these studies, parental species were separated along a canonical variable, and hybrids were grouped at the center of the variation. These observations are consistent with our findings in the present study between *Q. crassifolia*, *Q. crispipilis* and *Q. dysophylla* (Fig. 7).

Genetic diversity indices for the 13 *Quercus* species obtained for the *matK* chloroplast region could be considered as low ($H = 12$, $H_d = 0.674$). These values are lower than those recorded

by Ruiz-Domínguez (2016) for 11 *Quercus* species in Chiapas ($H = 10$, $H_d = 0.875$, $\pi = 0.014$, $S = 30$), based on analysis of two cDNA markers (*trnH-psbA* and *psbk-trnSO*). The value of π for the group of species present in Los Altos de Chiapas ($\pi = 0.0047$) is similar to the value reported by Yan et al. (2019) and Yang et al. (2018) for the section *Quercus* in Asia and the Mediterranean ($\pi = 0.0041$) when combining four chloroplast regions (*atpl-atpH*, *matK*, *PSBA-trnH*, and *ycf1*). Yang et al. (2018) also noted that the four cDNA markers differ in discriminating power, with *psbA-trnH* and *ycf1* being the markers with the best discriminating power at the species level. It has also been observed that the combination of multiple molecular markers provides better phylogenetic resolution and discrimination between species in the genus *Quercus*, as achieved by Binh et al. (2018) within the *Q. langbianensis* complex by combining three DNA regions (*rbcL*, *matK* and *ITS*) and by Pang et al. (2019) by combining four chloroplast regions (*matK-trnK-rps16*, *trnR-atpA*, *ndhF*, *ycf1b*). The low genetic differentiation of *Quercus* species from the analysis of the *matK* region in the present study is consistent with the differentiation obtained for the European white oak (Petit et al., 2004) and the American red oak (Zhang et al., 2015) using various chloroplast markers. The low genetic differentiation observed in the present study may be reflecting a high degree of conservation of the chloroplast genome in the genus *Quercus*, which, together with its maternal inheritance (Mogensen, 1996; Yang et al., 2016, Pang et al. 2019), may be limiting the separation of species. In the future, it would be desirable to explore other regions of the chloroplast, such as *psbA-trnH* and *ycf1*, and nuclear markers, to identify sites with interspecific variation that allow for a definite identification of *Quercus* species, as well as phylogeographic studies to gain a better understanding of their evolution (Rodríguez-Correa et al., 2017).

In our study, seven of the 13 analyzed species were genetically and morphologically separated. The recent divergence of *Quercus* species, characterized by the retention of ancestral

polymorphisms and interspecific genetic flow (Manos et al., 1999; Hipp et al., 2018), has likely produced the genetic similarity observed across most species within each section. For example, haplotypes H1 and H3 are shared across species within the sections *Quercus* and *Lobatae*, respectively. We unexpectedly found that H3 is also present in a couple of individuals of *Q. crassifolia*, a species in the section *Lobatae*. This may be the result of the retention of ancestral polymorphisms since, according to Hipp et al. (2018), both sections diverged from a common ancestor, and our finding is consistent with the one obtained with the Bayesian genetic cluster analysis.

It was also found that *Q. acatenangensis*, and *Q. ocoteifolia*, *Q. segoviensis*, and *Q. rugosa* are grouped together based on genetic and geometric morphometrics data. This group of species shared the same genetic characteristics, probably also leading to a high phenotypic similarity. These species probably diverged recently, so species-specific characters allowing a clear differentiation are not yet developed (Valencia-Ávalos, 2020). In contrast, *Q. calophylla* and *Q. crassifolia* (section *Lobatae*) and *Q. polymorpha* (section *Quercus*) show greater genetic and morphological differentiation, which may be related to their divergence time. For *Q. calophylla*, *Q. crassifolia*, and *Q. polymorpha*, a greater divergence time (8 to 10 million years) is estimated relative to the remaining ten species (2 to 5 million years) (see Hipp et al., 2018). The low genetic and morphological differentiation in *Q. castanea*, *Q. sapotiifolia*, and *Q. acatenangensis* may also be a result of the low number of individuals analyzed.

The present study included 13 *Quercus* species in Los Altos de Chiapas; this figure may vary after solving the synonymies between *Q. laurina*, *Q. ocoteifolia*, and *Q. acatenangensis* (Valencia and Flores-Franco 2006), and by expanding the sampling to other localities of Los Altos de Chiapas. The Ecosur Herbarium has vouchers for 17 *Quercus* species for Los Altos de Chiapas, including *Q. conspersa*, *Q. xalapensis*, and *Q. tenuaristata*, species that were not found in the

present sampling effort despite an intense search for them during fieldwork. Other species that have been reported for Los Altos de Chiapas and that were also not found in this study are *Q. laurina* and *Q. skutchii* (Ramírez-Martínez et al., 1998). *Q. laurina* can be misidentified for *Q. ocoteifolia* (Valencia-Ávalos, 2004), while *Q. skutchii* has been proposed as a synonym of *Q. crispipilis* (Valencia and Flores-Franco, 2006).

Another factor that may explain the absence of these species is that deforestation has increased in the region in recent decades due to the change in land use to agriculture and livestock raising, which has favored the survival of pine species over oak trees (González-Espinosa et al., 1995; Ramírez-Martínez et al., 2001; Galindo-Jaimes et al. 2002). This may promote inbreeding and the small population sizes of the species mentioned above (Oyama et al., 2018).

Conclusions

The morphological and genetic differentiation among the 13 species studied was low. The genetic analysis separated the sections *Lobatae* and *Quercus*, but morphologically this differentiation was less clear. In *Lobatae*, we observed the separation of *Q. crassifolia*, *Q. calophylla*, *Q. ocoteifolia*, *Q. acutifolia*, and *Q. crispipilis*; in the section *Quercus*, we observed *Q. polymorpha* and *Q. rugosa*.

The combination of geometric morphometrics and molecular tools was useful for clearly determining *Q. calophylla*, *Q. crassifolia*, *Q. rugosa*, *Q. ocoteifolia*, *Q. crispipilis*, *Q. acutifolia*, and *Q. polymorpha*. The remaining six species were similar in both types of characters, likely due to phenotypic plasticity, recent divergence, or hybridization and introgression. These aspects should be investigated further in future studies. Our study highlights the importance of testing more variable molecular markers such as *ITS* and other chloroplast regions (e.g., *psbA-trnH*, *ycf1*) and

analyzing other morphological attributes that may contribute to delimit the species of the genus *Quercus* present in Los Altos de Chiapas.

Contributions of authors

ACRD and LRM designed the study, ACRD conducted the field and laboratory work and data analysis, LRM and AAGD helped in data analysis, LRM, AAGD, GCM advised on the interpretation of results. All authors contributed to the preparation, review, and approval of the final manuscript.

Financing

This project was partially funded by Project 11052/ECOSUR-Evolutionary Ecology and Conservation and by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (National Council of Science and Technology; CONACyT) through the Master's degree scholarship awarded to ACRD (6000276).

Acknowledgments

We thank Maricela García Bautista for his technical support in the laboratory work, Thanks also to Alfonso Luna Gómez and José Sántiz García for their support during the collection of oak samples. María Elena Sánchez-Salazar translated the manuscript into English.

References

- Ackerly, D. D., S. A. Dudley, S. E. Sultan, J. Schmitt, J. S. Coleman, C. R. Linder, D. R. Sandquist, M. A. Geber, A. S. Evans, T. E. Dawson and M. J. Lechowicz. 2000. Advanced and future directions: New research addresses natural selection, genetic constraints, and the adaptive evolution of plant ecophysiological traits. *BioScience* 50 (11): 979-995. DOI: [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2000\)050\[0979:TEOPET\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2000)050[0979:TEOPET]2.0.CO;2)

- Aguirre, W. and P. Jiménez-Prado. 2018. Guía práctica de morfometría geométrica. Aplicaciones en la ictiología. Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Esmeraldas (PUCESE). Esmeraldas, Ecuador. 104 pp.
- Alba-López, M. P., M. González-Espinosa, N. Ramírez-Marcial and M. A. Castillo-Santiago. 2003. Determinantes de la distribución de *Pinus spp.* en la altiplanicie central de Chiapas, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 73:7-15. DOI: 10.17129/botsoci.1675
- Álvarez-Moctezuma, J. G., S. Ochoa-Gaona, B. H. J. de Jong and M. L. Soto-Pinto. 1999. Hábitat y distribución de cinco especies de *Quercus* (Fagaceae) en la Meseta Central de Chiapas, México. *Revista de Biología Tropical* 47 (3): 351-358. DOI:10.15517/rbt.v47i3.19083
- Álvarez-Zúñiga, E., A. Sánchez-González and S. Valencia-Ávalos. 2010. Los encinos del Parque Nacional Los Mármoles, Hidalgo, México. *Madera y Bosques* 16 (4): 55-66. DOI:10.21829/myb.2010.1641160
- Bandelt, H., P. Foster and A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intra-specific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48. DOI: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Bell, A. and A. Bryan. 2008. Plant form: An illustrated guide to flowering plant morphology. Timber press, London. 432 pp.
- Benson, D. A., K. Clark, I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell and E. W. Sayers. 2015. GenBank. *Nucleic acids research* 43: D30-D35. DOI: 10.1093/nar/gku1216
- Binh, H. T., N. V. Ngoc, T. N. Bon, S. Tagane, Y. Suyama and T. Yahara. 2018. A new species and two records of *Quercus* (Fagaceae) from northern Vietnam. *PhytoKeys* 92: 1-15. DOI: <https://doi.org/10.3897/phytokeys.92.21831>
- Bruschi, P., G. Vendramin, F. G. Bussotti and P. Grossoni. 2003. Morphological and molecular diversity among Italian populations of *Quercus petraea* (Fagaceae). *Annals of Botany* 91: 707-716. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcg075>
- Cannon, C. H. and R. J. Petit. 2019. The oak syngameon: more than the sum of its parts. *New Phytologist* 226: 978-983. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.16091>
- CEIEG, 2020. Comité estatal de información estadística y geografía: Region V. Altos tsotsil tseltal. 11 pp.

- http://www.ceieg.chiapas.gob.mx/productos/files/MAPASTEMREG/REGION_V_ALTO_S_TSOTSIL_TSELTAL_post.pdf (consultado en marzo de 2021).
- Cheng, L., T. R. Connor, J. Sirén, D. M. Aanensen and J. Corander. 2013. Hierarchical and spatially explicit clustering of DNA sequences with BAPS software. *Molecular Biology and Evolution* 30(5):1224-1228.
- Cordell, S., G. Goldstein, D. Mueller-Dombois, D. Webb and P. M. Vitousek. 1998. Physiological and morphological variation in *Metrosideros polymorpha*, a dominant Hawaiian tree species, along an altitudinal gradient: the role of phenotypic plasticity. *Oecologia*, 113:188-196. DOI: <https://doi.org/10.1007/s004420050367>
- Curtu, A. L., O. Gailing and R. Finkeldey. 2007. Evidence for hybridization and introgression within a species-rich oak (*Quercus* spp.) community. *BMC Evolutionary Biology* 7: 218. DOI: 10.1186/1471-2148-7-218
- De la Vega, M., M. Pinazo, S. Barth. 2010. Variación del área foliar específica en *Pinus elliottii* var *elliottii* Engelm. X *Pinus caribaea* var *hondurensis* Morelet. Y su extrapolación al cálculo del área foliar proyectada. Facultad de Ciencias Forestales, UnaM-EEA Montecalo, INTA. 8 pp.
- De Luna, E. 2020. Integrando análisis morfométricos y filogenéticos: de la sistemática fenética a la morfometría filogenética. *Acta Botánica Mexicana* 127: e1640. DOI: 10.21829/abm127.2020.1640
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin* 19 (1): 11-15.
- Dryden, I. I. and K. V. Mardia. 1998. Statistical shape analysis. Wiley, Nueva York. 347 pp.
- Ellstrand, N. C., R. Whitkus and L. H. Rieserberg. 1996. Distribution spontaneous plant hybrids. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 93: 5090-5093. DOI: 10.1073 / pnas.93.10.5090
- Equipo Rstudio. 2020. RStudio: Desarrollo integrado para R. RStudio, PBC, Boston, M. A. <http://www.rstudio.com/>.
- Excoffier, L. and P. E. Smouse. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA Haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491. DOI: 10.1093 / genetics / 131.2.479

- Fortini, P., P. Di Marzio and R. Di Pietro. 2014. Differentiation and hybridization of *Quercus frainetto*, *Q. petrae* and *Q. pubescens* (Fagaceae): insights from macro-morphological leaf traits and molecular data. *Plant Systematics and Evolution* 301: 375-385. DOI: 10.1007/s00606-014-1080-2
- Fortini, P., V. Viscosi, A. Loy and C. Blasi. 2007. Applicazione delle tecniche di morfometria geometrica nello studio della morfologia fogliare del genere *Quercus* L. subgen *Quercus* (gr. *Robur* sensu Pignatti 1982. *Informatore Botanico Italiano* 39 (1): 143-149.
- Galindo-Jaimes, L., M. González-Espinosa, P. Quintana-Ascencio and L. García-Barrios. 2002. Tree composition and structure in disturbed stands with varying dominance by *Pinus spp.* In the highland of Chiapas, México. *Plant Ecology* 62: 259-272. DOI: 10.1023/A:1020309004233
- García, E. 1987. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen para Adaptarlo a condiciones de la República Mexicana. Instituto de Geografía. Universidad Nacional autónoma de Mexico. México, D. F. 71 pp.
- González-Espinosa, M., J. A. Meave, F. G. Lorea-Hernández, G. Ibarra-Manríquez and A. C. Newton. 2011. The red list of Mexican Cloud Forest Trees. *Fauna & Flora International*. Cambridge, UK. 148 pp. ISBN: 978903703281
- González-Espinosa, M., N. Ramírez-Marcial and L. Galindo-Jaimes. 2006. Secondary succession in montane pine-oak forests of Chiapas, México. En: Kapelle M. (eds) *Ecology and conservation of Neotropical Montane Oak Forests. Ecological Studies (Analysis and Synthesis)* 185: 209-221. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/3-540-28909-7_16
- González-Espinosa, M., N. Ramírez-Marcial, A. Camacho-Cruz, S. C. Holz, J. M. Rey-Benayas and M. R. Parra-Vázquez. 2007. Restauración de bosques en territorios indígenas de Chiapas: modelos ecológicos y estrategias de acción. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 80 (suplemento): 11-23. DOI: <https://doi.org/10.17129/botsci.1753>
- González-Espinosa, M., N. Ramírez-Marcial, L. Galindo-Jaimes, A. Camacho-Cruz, D. Golicher, L. Cayuela and J. M. Rey-Benayas. 2009. Tendencias y proyecciones del uso del suelo y la diversidad florística en Los Altos de Chiapas, México. *Investigación Ambiental* 1 (1): 40-53.

- González-Rodríguez, A. and K. Oyama. 2005. Leaf morphometric variation in *Quercus affinis* and *Q. laurina* (Fagaceae), two hybridizing Mexican red oaks. *Botanical Journal of the Linnean Society* 147: 427-435. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2004.00394.x>
- González-Rodríguez, A., D. M. Arias, S. Valencia and K. Oyama. 2004. Morphological and RAPD analysis of hybridization between *Quercus affinis* and *Q. laurina* (Fagaceae), two Mexican red oaks. *American Journal of Botany*. 91: 401-409. DOI: 10.3732/ajb.91.3.401
- Hammer, Ø., D. A. T. Harper and P. D. Ryan. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4 (1): 9 pp. http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm
- Henderson, A. 2006. Traditional morphometrics in plant systematics and its role in palm systematics. *Botanical Journal of the Linnean Society* 151: 103-111. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2006.00526.x>
- Hernández, R. M. 2014. Identificación de las subespecies de *Magnolia cubensis* (Magnoliaceae) mediante análisis digital de imágenes de las hojas. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas* 3 (2): 53-60. ISSN: 2307-695X
- Hipp A. L., P. S. Manos, A. González-Rodríguez, M. Hahn, M. Kaproth, J. D. McVay, S. Valencia A. and J. Cavender-Bares. 2018. Sympatric parallel diversification of major oak clades in the Americas and the origins of Mexican species diversity. *New Phytologist* 217: 439-452. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.14773>
- INEGI, 2010. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Principales resultados del censo de población y vivienda 2010: Chiapas. Censo de Población y Vivienda. México: INEGI. 122 pp.
- Jensen, J., A. Larsen, L. R. Nielsen and J. Cottrell. 2009. Hybridization between *Quercus robur* and *Q. petraea* in a mixed oak stand Denmark. *Annals of Forest Science* 66: 706. DOI: <https://doi.org/10.1051/forest/2009058>
- JSTOR. 2020. Global Plants. <http://plants.jstor.org> (consultado marzo-octubre de 2020).
- Kashani, N. and R. S. Dood. 2002. Genetic differentiation of two California red oak species, *Quercus parvula* var. *shreveii* and *Q. wislizeni*, based on AFLP genetic markers. *USDA For Serv Gen Tech Re* 184: 417-426.
- Klingenberg, C. P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11: 353–357. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x

- Klingenberg, C. P. and G. S. McIntyre. 1998. Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry. *Evolution* 56: 1909-1920. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1998.tb02018.x
- Kumar, S., G. Stecher and K. Tamura. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870-1874. DOI: 10.1093 / molbev / msw054
- Lattin, J., J. D. Carroll and P. E. Green. 2003. *Analyzing multivariate data*. Thomson Brooks and Cole. Pacific Grove, USA. 556 pp.
- Lepais, O., R. J. Petit, E. Guichoux, J. E. Lavabre, F. Alberto, U. Kremer and S. Gerber. 2009. Species abundance and direction of introgression in oaks. *Molecular Ecology* 18 (10): 2228–2242. DOI: 10.1111 / j.1365-294X.2009.04137.x
- Leroy, T., Q. Tougemont, J-L. Dupouey, C. Bodénès, C. Lalanne, C. Belser, K. Labadie, G. Le Provost, J-M. Aury and A. Kremer. 2019. Massive postglacial gene flow between European white oaks uncovered genes underlying species barriers. *New Phytologist* 226: 1183-1197. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.16039>
- Librado, P. and J. Rozas. 2009. DnaSP V5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25 (11): 1451-1452. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- Liu, Y., Y. Li, J. Song, R. Zhang, Y. Yan, Y. Wang and F. K. Du. 2018. Geometric morphometric analyses of leaf shapes in two sympatric Chinese oaks: *Quercus dentata* Thunberg and *Quercus aliena* Blume (Fagaceae). *Annals of Forest Science* 75: 90. DOI: <https://doi.org/10.1007/ s13595-018-0770-2>
- López-de-Heredia, U., P. Jiménez, P. Díaz-Fernández and L. Gil. 2005. Diversidad genética, origen y conservación de las especies esclerófilas del género *Quercus* en las Islas Baleares. *Bolletín Societat d'Història Natural de les Balears* 48: 43-60.
- Manly, B. F. J. 1986. *Multivariate Statistical Methods: A Primer*. Chapman and Hall. London, UK. 159 pp.
- Manos, S. P., J. J. Doyle and K. C. Nixon. 1999. Phylogeny, biogeography and processes of molecular differentiation in *Quercus* subgenus *Quercus* (Fagaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12: 333-349.

- Marcus, L. F. 1990. Traditional morphometrics. En: Rohlf F. J. y F. J. Bookstein (Eds.)
 Proceedings of the Michigan morphometrics workshop. Special publication number 2.
 University of Michigan press, Michigan. Ann Arbor. Pp.77-122 DOI:
<https://doi.org/10.2307/2992576>
- Martínez-Cabrera, D., F. Zavala-Chávez and T. terrazas. 2011. Estudio morfométrico de *Quercus sartotii* y *Q. xalapensis* (Fagaceae). Revista Mexicana de Biodiversidad 82: 551-568.
 DOI: <http://dx.doi.org/10.22201/ib.20078706e.2011.2.459>
- Martínez-Icó, M., W. Cetzal-Ix, E. Noguera-Savelli and R. Hernández-Juárez. 2015. Flora vascular de la comunidad de Bazon, Los Altos de Chiapas, México. Botanical Sciences 93 (1): 1-20. DOI: <https://doi.org/10.17129/botsoci.136>
- Martínez-Meléndez, N. and J. W. López-Santiago. 2019. Diversidad de encinos en un refugio de la Sierra madre de Chiapas. Herbario CICY 11: 102-107.
- Martínez, A. E. P. 2011. Condición genética de cuatro especies de *Quercus* (Fagaceae) en la Meseta Central de Chiapas. Tesis de Maestría. El Colegio de la Frontera Sur. 48 pp.
- Martínez, R. R., H. Azpiroz R., G. Rojo M., J. L. Rodríguez de la O. and B. Ramírez V. 2010. Biotecnología aplicada a los recursos forestales. Universidad Autónoma Indígena de México, Puebla, MX. 1-36 pp.
- McVaugh, R. 1974. Flora Novo-Galiciana. Contributions from the University of Michigan Herbarium 12(1): 1:93.
- Meade, C. and J. Parnell. 2003. Multivariate analysis of leaf shape pattern in Asian of the *Uvaria* group (Annonaceae). Botanical Journal of Linnaean Society 143: 231-242. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1095-8339.2003.00223.x>
- Mogensen, H.L., 1996. The hows and whys of cytoplasmic inheritance in seed plants. American Journal of Botany 83: 383–404. DOI: [10.1002/j.1537-2197.1996.tb12718.x](https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1996.tb12718.x)
- Muller, C. H. 1942. The central American species of *Quercus*. United State Department of Agriculture. Washington, D. C. 216 pp.
- Muller, C. H. and R. McVaugh. 1972. The oaks (*Quercus*) described by Née (1801), and by Humbolt and Bonpland (1809), with comments on related species. Contributions from the University of Michigan Herbarium 9:507-522.
- NCBI. 2020. National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (consultado en diciembre de 2020).

- Nei, M. 1972. Genetic Distance between populations. *The American Naturalist* 106: 283-292.
DOI: <https://www.jstor.org/stable/2459777>
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. *Genetics* 89:583-590.
- Niinemets, U., N. A. Afas, A. Cescatti, A. Pellis and R. Ceulmans. 2004. Petiole length and biomass investment in support modify light-interception efficiency in dense poplar plantations. *Tree Physiology* 24: 141–154. DOI: 10.1093 / treephys / 24.2.141
- Nixon, K. 1993. Infrageneric classification of *Quercus* (Fagaceae) and typification of sectional names. *Annales des science forestières, INTRA/EDp Sciences* 50 (1): 25-34.
- Nixon, K. C. 1998. El género *Quercus* en México. In: Ramamoorthy, T. P., R. Bye, A. Lot y J. Fa (eds.). *Diversidad Biológica de México: Orígenes y Distribución*. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., México. Pp. 435-447.
- Núñez-Castillo, S. M., J. G. Álvarez-Moctezuma, F. Zavala-Chávez and P. Espinosa-Robles. 2011. Análisis morfológico y habitat en el híbrido *Quercus glabrescens* x *Q. rugosa*. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 2 (3): 84-100.
- Oksanen, J., F. Guillaume B., M. Friendly, R. Kindt, P. Legendre, D. McGlinn, P. R. Minchin, R. B. O'Hara, G. L. Simpson, P. Solymos, M. Henry H. S., E. Szoecs and H. Wagner. 2020. *Community Ecology Package “vegan”*. Versión 2.5-7.
- Ortego J., P. F. Gugger and V. L. Sork. 2017. Impacts of human- induced environmental disturbances on hybridization between two ecologically differentiated Californian oak species. *New Phytologist* 213: 942-955. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.14182>
- Oyama, K., W. Ramírez-Toro, J. M. peñaloza-Ramírez, A. E. Pérez p., C. A. Torres-Miranda, E. Ruiz-Sánchez and A. González-Rodríguez. 2018. High genetic diversity and connectivity among populations of *Quercus candicans*, *Quercus crassifolia*, and *Quercus castanea* in a Heterogeneous Landscape in Mexico. *Tropical Conservation Science* 11: 1-14. DOI: 10.1177/1940082918766195
- Pang, X., H. Liu, S. Wu, Y. Yuan, H. Li, J. Dong, Z. Liu, Ch. An, Z. Su and B. Li. 2019. Species identification of oaks (*Quercus* L. Fagaceae) from gene to genome. *International Journal of Molecular Science* 20: 5940. DOI: 10.3390/ijms20235940
- Peterson, A. T. and A. G. Navarro-Sigüenza. 2001. Alternate species concepts as bases for determining priority conservation areas. *Conservation Biology* 13: 427 - 431.

- Petit, R. J., C. Bodénès, A. Ducousso, G. Roussel and A. Kremer. 2004. Hybridization as a mechanism of invasion in oaks. *New Phytologist* 161: 151-164. DOI: 10.1046/j.1469-8137.2003.00944.x.
- Petit, R. J., D. B. Wagner and A. Kremer. 1993. Ribosomal DNA and chloroplast DNA polymorphisms in a mixed stand of *Quercus robur* and *Q. petraea*. *Annales des Sciences Forestières*, 50:41-47.
- Quintana-Ascencio, P. F. and M. González-Espinosa. 1993. Afinidad fitogeográfica y papel sucesional de la flora leñosa de los bosques de pino-encino de Los Altos de Chiapas, México. *Acta Botánica Mexicana* 21: 43-57. DOI: <https://doi.org/10.21829/abm21.1993.667>
- R Core Team. 2020. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- Ramírez-Marcial, N., M. González-Espinosa and G. Williams-Linera. 2001. Anthropogenic disturbance and tree diversity in montane rain forest in Chiapas, Mexico. *Forest Ecology and Management* 154: 11-326. DOI: 10.1016/S0378-1127(00)00639-3
- Ramírez-Marcial, N., S. Ochoa, M. González and P. F. Quintana. 1998. Análisis florístico y sucesional en la estación biológica Cerro Huitepec, Chiapas, México. *Acta Botánica Mexicana* 44: 59-85. DOI: 10.21829/ABM44.1998.806
- Rieseberg, L. H. 1997. Hybrid origins of plant species. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28: 359-389. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.28.1.359>
- Rivas, R. M. B. 2017. Efecto de la calidad de sitio sobre el crecimiento inicial de tres especies de *Quercus* en Los Altos de Chiapas. Tesis de Maestría. El Colegio de La Frontera Sur. San Cristóbal de Las Casas, Chiapas. 40 pp.
- Rohlf, F. 2015. The Tps series of software. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy* 26(1): 9-12. DOI: <https://doi.org/10.4404/hystrix-26.1-11264>
- Romero, R. S. 2006. Revisión taxonómica del complejo *Acutifoliae* de *Quercus* (Fagaceae) con énfasis en su representación en México. *Acta Botánica Mexicana* 76: 1-45. DOI: <https://doi.org/10.21829/abm76.2006.1016>
- Ruiz-Domínguez, A. C. 2016. Variación genética y morfológica de *Quercus spp.* en Chiapas, México. Tesis de licenciatura. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. 85 pp.

- Rzedowski, J. 2006. Vegetación de México. 1ª edición digital, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. 504 pp.
- Sabás-Rosales, J. L. 2016. Encinos (*Quercus*: Fagaceae) de Zacatecas: taxonomía, diversidad y distribución. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México. 233 pp.
- Sack, L. and K. Frole. 2006. Leaf structural diversity is related to hydraulic capacity in tropical rain forest trees. *Ecology* 87: 483-491. DOI: 0.1890/05-0710
- Sheets, H. D. 2001. Software IMP © (Integrated Morphometric Package) Department of Physics, Canisius College, Buffalo, NY 1408, Department of Geology State University of New York at Buffalo, NY 14260. <http://www.canisius.edu/~sheets/morphsoft.html>
- Sheets, H. D. 2014. MakeFan8, Version 1. Canisius College: Department of physics, New York.
- Standley, P. C. and J. A. Steyermark. 1952. *Flora of Guatemala* 24 (3): 369-396.
- Stephan J.M, P. W. Teeny, F. Vessella and B. Schirone. 2018. Oak morphological traits: between taxa and environmental variability. *Flora* 243: 32–44. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.flora.2018.04.001>
- Swofford D. L. 1991. PAUP 3.0s: Phylogenetic analysis using parsimony. *User's Manual*. Illinois Natural History Survey, Champaign.
- Tonkin-Hill, G., Lees, J. A., Bentley, S. D., Frost, S. D. W. and J. Corander. 2018. RhierBAPS: an R implementation of the population clustering algorithm hierBPAS. *Wellcome Open Research* 3:93.
- Tovar-Sánchez, E. and K. Oyama. 2004. Natural hybridization and hybrid zones between *Quercus crassifolia* and *Quercus crassipes* (Fagaceae) in Mexico: morphological and molecular evidence. *American Journal of Botany* 91(9): 1352-1363. DOI: <https://doi.org/10.3732/ajb.91.9.1352>
- Trelease, W. 1924. The American Oaks. *Memoirs of the National academy of Science*. 20: 1-255.
- TROPICOS. 2020. Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org> (consultado junio de 2020).
- Tsukaya, H. 2005. Leaf shape: genetic controls and environmental factors. *International Journal Development Biology* 49: 547-555.
- Uribe-Salas, D., C. Sáenz-Romero, A. González-Rodríguez, O. Téllez-Valdéz and K. Oyama. 2008. Foliar morphological variation in the white oak *Quercus rugosa* Née (Fagaceae)

- along a latitudinal gradient in Mexico: Potential implications for management and conservation. *Forest Ecology and Management* 256: 2121-2126.
<https://doi.org/10.1016/j.foreco.2008.08.002>
- Valcárcel, V. and P. Vargas. 2010. Quantitative morphology and species delimitation under the general lineage concept: optimization for *Hedera* (Araliaceae). *American Journal of Botany* 97(9): 1555-1573. DOI: <https://doi.org/10.3732/ajb.1000115>
- Valencia-Ávalos, S. 2004. Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 75: 33-53. DOI: <https://doi.org/10.17129/botsoci.1692>
- Valencia-Ávalos, S. 2020. Species delimitation in the genus *Quercus* (Fagaceae). *Botanical Sciences* 99 (1): 01-12. DOI: 10.17129/botsoci.2658
- Valencia-Ávalos, S., A. Coombes and J. L. Villaseñor. 2018. *Quercus candicans* (Fagaceae) is not a *Quercus* but a *Roldana* (Asteraceae). *Phytotaxa* 333 (2): 251-258. DOI: <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.333.2.9>
- Valencia-Ávalos, S., M. Gómez C. and F. Becerra I. 2002. Catálogo de encinos del Estado de Guerrero. INIFAP, CONAFOR. México, D. F. 180 pp.
- Valencia-Cuevas, L., D. Pinero, P. Mussali-Galante, S. Valencia-Ávalos and E. Tovar- Sanchez. 2014. Effect of a red oak species gradient on genetic structure and diversity of *Quercus castanea* (Fagaceae) in Mexico. *Tree Genetics & Genomes* 10: 641–652. DOI: 10.1007/s11295-014-0710-8.
- Valencia, A. S. and G. Flores-Franco. 2006. Catálogo de autoridades taxonómicas de las fagáceas (Fagaceae: Magnoliopsida) de México. Facultad de Ciencias, UNAM. Base de datos SNIB-CONABIO, proyecto CS008. México.
- Vázquez, L. 1992. El género *Quercus* (Fagaceae) en el estado de Puebla. México. Tesis de licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales, Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F., México. 246 pp.
- Vázquez, M. L. and K. C. Nixon. 2013. Taxonomy of *Quercus crassifolia* (Fagaceae) and morphologically similar species in Mexico. *Brittonia* 65 (2): 208-227.
- Villar, R. and J. Merino. 2001. Comparison of leaf construction costs in woody species with differing leaf life-spans in contrasting ecosystems. *New Phytologist* 151: 213-226.
- Villaseñor, J. L. 2016. Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87: 559-902. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmb.2016.06.017>

- Viscosi, V., G. Antonecchia, O. Lepais, P. Fortini, P. S. Gerber and A. Loy. 2012. Leaf shape and size differentiation in white oaks: assessment of allometric relationships among three sympatric species and their hybrids. *International Journal Plant Science* 173: 875–884. <https://doi.org/10.1086/667234>
- Viscosi, V. and A. Cardini. 2011. Leaf morphology, Taxonomy and Geometric Morphometrics: A simplified protocol for beginners. *Plos One* 6 (10).
- Viscosi, V., P. Fortini, D. E. Slice, A. Loy and C. Blasi. 2009. Geometric morphometric analyses of leaf variation in four oak species of the subgenus *Quercus* (Fagaceae). *Plant Biosystems* 143 (3): 575-587. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/11263500902775277>
- Wake, D. B., M. H. Wake and C. D. Specht. 2011. Homoplasy: from detecting pattern to determining process and mechanism of evolution. *Science* 333: 1032-1035.
- WFO. 2021. Word Flora Online. <http://worldfloraonline.org> (consultado en abril de 2021).
- Whittemore, A. T. and B. A. Schaal. 1991. Interspecific gene flow in sympatric oaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88 (6): 2540-2544. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.88.6.2540>
- Wickham, H. 2016. *ggplot2: elegant graphics for data analysis*. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, <https://ggplot2.tidyverse.org>
- Yan, M., R. Liu, A. L. Hipp, M. Deng and Y. Xiong. 2019. Ancient events and climate adaptive capacity shaped distinct chloroplast genetic structure in the oak lineages. *BMC Evolutionary Biology* 19: 202. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12862-019-1523-z>
- Yan, M., Y. Xiong, R. Liu, M. Deng and J. Song. 2018. The application and limitation of universal chloroplast markers in discriminating east Asian evergreen oaks. *Frontiers in Plant Science*, 9: 569. DOI: [10.3389/fpls.2018.00569](https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00569)
- Yang, J., Vázquez L., X. Chen, H. Li, H. Zhang, Z. Liu and G. Zhao. 2017. Development of chloroplast and nuclear DNA markers of Chinese oaks (*Quercus* subgenus *Quercus*) as assessment of their utility as DNA barcodes. *Frontiers in Plant Science* 8: 1-17. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00816>
- Yang, Y., T. Zhou, D. Duan, J. Yang, L. Feng and G. Zhao. 2016. Comparative analysis of the complete chloroplast genomes of five *Quercus* species. *Frontiers in Plant Science* 7: 959. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00959>
- Zar, J. H. 1999. *Biostatistical analysis*, 4a ed., Prentice Hall, NJ, EUA.

- Zavala, Ch. F. 1998. Observaciones sobre la distribución de encinos en México. *Polibotánica* 8: 47-64.
- Zhang, R., A. L. Hipp and O. Gailing. 2015. Sharing of chloroplast haplotypes among red oak species suggest interspecific gene flow between neighboring populations. *Botany* 93: 691-700. DOI: [dx.doi.org/10.1139/cjb-2014-0261](https://doi.org/10.1139/cjb-2014-0261)
- Zuñiga, E. A., A. Sánchez-González and D. Granados-Sánchez. 2009. Análisis de la variación morfológica foliar en *Quercus laeta* Liebm. En el parque nacional Los mármoles, Hidalgo. *Revista Chapingo, Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 15 (2): 87-93.

Capítulo 3.

3.1 Discusión general

Los análisis morfométricos y genéticos indicaron que las 13 especies de *Quercus* analizadas presentan una diferenciación morfológica y genética baja. La similitud morfológica que presentan las especies limita la discriminación entre especies. Lo anterior, podría deberse a que la morfología y estructura de las hojas de los árboles varían significativamente de acuerdo a la posición en la que las ramas se encuentren y al efecto de la dicotomía sol-sombra (Bruschi et al. 2003, Niinemets et al. 2004, Núñez-Castillo et al. 2011). En algunos casos, las hojas expuestas al sol presentan un área foliar menor y son más gruesas y lobuladas que las que crecen en condiciones de sombra (Mitchell et al. 1999, Valladares et al., 2014). Algunos estudios sugieren que el tamaño de las hojas está relacionado con la capacidad fotosintética, uso del agua, tolerancia a la sequía y varía en función de las mismas (Ourcival y Rambal 1999, Bresse 2004).

Los Altos de Chiapas es una región que presenta condiciones ambientales relativamente homogéneas respecto a otras regiones fisográficas de Chiapas, lo que pudiera estar afectando la variación morfológica entre las especies presentes, ya que se ha documentado que la variación foliar en *Q. rugosa* y *Q. elliptica* están fuertemente correlacionada con la altitud, temperatura, precipitación, elevación y aridez (Uribe 2009, Maya-García et al. 2020).

Los caracteres lineales que resultaron importantes en la discriminación de siete de las 13 especies analizadas (*Q. calophylla*, *Q. crassifolia*, *Q. rugosa* y *Q. crispipilis*, *Q. ocoteifolia*, *Q. acutifolia* y *Q. polymorpha*) fueron: el ancho de la hoja, longitud total y longitud de la hoja. Estos resultados son consistentes con lo reportado por Tovar-Sánchez y Oyama (2004), González-Rodríguez y Oyama (2005) y Ruiz-Domínguez (2016) para *Q. crassifolia*, *Q. laurina*, *Q. benthamii*, *Q. rugosa* y *Q. sebifera*. Sin embargo, es importante continuar realizando estudios, donde se consideren otros atributos morfológicos p.e. área foliar específica, tallo, corteza, tricomas, entre otros que contribuyan a la delimitación taxonómica de las especies de *Quercus* en Los Altos de Chiapas.

Los análisis morfométricos mostraron diferencias significativas en la forma de las hojas de las especies, permitiendo separar a siete de las 13 especies analizadas. Estos

resultados indican que la forma de las hojas resultan útil en la separación de las mismas. Pues se considera que la forma de las hojas son menos variables a las condiciones ambientales debido a que esta depende en gran medida de los reguladores generales del meristemo apical y del ciclo celular en sus etapas de desarrollo (McDonald et al. 2003, Barkoulas et al. 2007 y López-De-Heredia et al. 2017). Las rejillas de deformación permitieron identificar que los rasgos de forma donde se presenta la mayor variación interespecífica se encuentran en el ápice, base, ancho y peciolo de las hojas. La alta variación observada en estos atributos podría estar relacionado a que son estructura susceptibles al ambiente (Parker 1982, Press 1999, Bruschi et al. 2003). Sin embargo, Viscosi et al. (2009, 2021) mencionan que estos atributos son útiles en la discriminación de *Q. petrae*, *Q. pubescens*, *Q. frainetto* y *Q. robur* (Viscosi et al. 2009, 2012).

En el gráfico de puntos del AVC (ver capítulo 2), las hojas de *Q. crassifolia* y *Q. crispipilis* formaron dos grupos claramente separados, mientras que las hojas de *Q. dysophylla*, una especie considerada como híbrida (*Q. crassifolia* y *Q. crassipes*) (Vázquez y Nixon 2013) se ubicó entre estas. Estos datos sugieren que *Q. crassifolia* y *Q. crispipilis* pudieran estar participando como especies parentales en la hibridación de *Q. dysophylla*. Esta hipótesis es apoyada por diversos estudios donde se reporta que las especies de encinos rojos (*Lobatae*) presentan una barrera reproductiva más débil que los encinos blancos (*Quercus*) (Kashani y Dodd 2002, Aldrich et al. 2003) y la hibridación puede darse entre múltiples especies cuando estas se encuentran en simpatria (Hardin 1975). Peñaloza-Ramírez et al. (2010) analizó que los híbridos de *Q. hypoleuroides*, *Q. scytophylla* y *Q. sideroxyla* son dominantes en las zonas de contacto donde se encuentran las tres especies. Por otra parte, el patrón de variación en el AVC es consistente al observado en los híbridos y especies parentales de *Q. frainetto* y *Q. petra* (Viscosi et al. 2012, Stephan et al. 2018).

López de Heredia et al (2018), Liu et al (2018) y Viscosi et al (2012) han señalado también que los análisis de morfometría geométrica permiten distinguir a individuos híbridos, tal como lo reportan para *Q. aliena* y *Q. dentata*, y *Q. suber* y *Q. ilex*. La frecuente hibridación entre especies del género *Quercus* dificulta la identificación taxonómica de las especies y el conocimiento exacto del número de especies a nivel regional, estatal y nacional (Valencia-Ávalos 2004). Por lo tanto, es necesario continuar realizando estudios

a nivel genético para corroborar la ocurrencia de dicho fenómeno entre las especies de *Quercus* en Los Altos de Chiapas. Así mismo, se observó que las hojas de *Q. ocoteifolia* y *Q. acatenangensis* son similares, estos resultados apoyan la hipótesis de considerarlos como sinónimos (Valencia y Flores-Franco 2006).

Los índices de diversidad genética de las 13 especies fueron relativamente bajos ($H_d = 0.67$) respecto a lo reportado por Ruiz-Domínguez (2016) para 11 especies de *Quercus* en Chiapas ($H_d = 0.87$), empleando dos regiones de cloroplasto (*trnH-psbA*, *psbk-plf-trnS0*), pero mayor al reportado por Lyu et al. (2018) para *Q. aliena*, *Q. dentata* y *Q. variabilis* ($H_d = 0.51$), empleando cinco regiones de cloroplastos (*accD-psaI-75R*, *trnH-psbA*, *rpS12-rpL20*, *rpS16* y *trnQ-trnS*).

La baja diferenciación genética obtenida entre las especies de *Quercus* a partir del análisis de la región *matK* es similar al reportado para los robles rojos norteamericanos por Zhang et al (2015). Sin embargo, muestra una alta diferenciación genética entre las dos secciones (*Quercus* y *Lobatae*), que corresponde a la clasificación taxonómica reportada por Hipp et al (2018). Dentro de la sección *Lobatae* se logró separar a *Q. calophylla* y *Q. crassifolia*, mientras que en la sección *Quercus* a *Q. polymorpha* y *Q. peduncularis*. La baja diferenciación interespecífica puede deberse a que gran proporción de los individuos de las especies que constituyen la sección *Quercus* comparten el haplotipo H3 y los de la sección *Lobatae* el H1, lo que sugiere un proceso de especiación reciente de las especies y secciones (Hipp et al. 2018, Lyu et al. 2018).

Los bajos niveles de diferenciación genética interespecífica podrían estar asociados también al alto grado de conservación que presenta el genoma del cloroplasto de los *Quercus* (Yang et al. 2016, Pang et al. 2019) y al bajo nivel de variación del marcador (Yang et al. 2018). Por lo que sería recomendable realizar pruebas con otros marcadores más variables como los *trnH-psbA*, *yfc1* e *ITS*.

Los datos geométricos y genéticos permitieron la diferenciación morfológica y genética de *Q. calophylla*, *Q. crassifolia*, *Q. rugosa*, *Q. crispipilis*, *Q. ocoteifolia*, *Q. acutifolia* y *Q. polymorpha*, aunque con bajos niveles de diferenciación interespecífica en ambos análisis. Esto es muy común en áreas de simpatría, y apoya la hipótesis de una ascendencia compartida debido a una divergencia reciente (Hipp et al. 2018) y es consistente con lo reportado por Albarrán-Lara (2018) para *Q. magnoliifolia* y *Q. resinosa*.

Sin embargo, la baja correlación obtenida de la prueba de Mantel entre la matriz de distancia genética y la distancia de Mahalanobis hace considerar que la alta variación morfológica observada en las especies de *Quercus* se debe principalmente a la plasticidad fenotípica y no al componente genético de estos.

Hasta el momento, estudios previos han registrado cerca de 23 especies para Los Altos de Chiapas (Alba-López et al. 2003), sin embargo, dentro del acervo botánico se tiene únicamente el registro de 17 especies, y en el presente estudio se lograron identificar a 13 especies, dos de las cuales han sido consideradas como sinónimos de las especies previamente reportadas. La falta de consistencia en el número de especies registradas podría deberse a la complejidad morfológica del género (Zavala, 1990), el cual presenta alta variación morfológica asociada a la plasticidad fenotípica que presentan las especies y la capacidad de hibridación entre ellas (Grant, 1989), que dificulta precisar el número de especies presente en Los Altos de Chiapas. Esto hace evidente que la delimitación de las especies de *Quercus* a partir del concepto taxonómico o biológico resulta insuficiente, pues la diferenciación genética a nivel de especies se restringe a unos pocos genes que dan una morfología similar e impiden el reconocimiento de una especie (Leroy et al. 2020). Por lo que, el concepto de especie unificado propuesto por De Queiroz (2007) puede considerarse apropiado para el estudio de las especies, ya que tanto los atributos morfológicos como genéticos evolucionan de manera independiente.

3.2 Conclusiones generales

El presente trabajo es la primera aproximación sobre la variación genética y morfológica de *Quercus* a nivel regional, y se suma a los pocos estudios realizados a nivel estatal, logrando identificar 13 especies de *Quercus*, 10 de las cuales habían sido previamente registradas para Los Altos de Chiapas.

El número de especies para Los Altos de Chiapas podría variar al resolver las posibles sinonimias entre *Q. ocoteifolia* - *Q. acatenangensis* y *Q. skutchii* - *Q. crispipilis*.

Quercus rugosa y *Q. crassifolia* fueron registradas en casi todas las localidades de colecta, mientras que, *Q. castanea* y *Q. polymorpha* fueron registradas en una sola localidad de Los Altos de Chiapas (Teopisca y Zinacantán respectivamente).

La alta variación morfológica intraespecífica limitó la discriminación entre especies dentro de la sección *Lobatae*.

Los caracteres morfológicos más importantes que contribuyeron a la separación relativa de *Q. calophylla*, *Q. crassifolia*, *Q. rugosa*, *Q. crispipilis*, *Q. ocoteifolia*, *Q. acutifolia* y *Q. polymorpha* fueron: longitud total de la hoja, largo de la hoja y ancho de la hoja. Sin embargo, en estudios futuros sería importante explorar otros atributos morfológicos (p. e. tricomas, corteza, etc) o el área foliar específica que contribuyan a la delimitación de las especies morfológicamente similares.

El análisis de la región *matK* muestra alta diferenciación entre las secciones (*Lobatae* y *Quercus*), pero morfológicamente esta separación fue menos clara. En la sección *Lobatae* se observó la separación de *Q. crassifolia* y *Q. calophylla*, mientras que, en la sección *Quercus* de *Q. peduncularis* y *Q. polymorpha*.

La baja diferenciación genética y morfológica entre especies se debe a la posible divergencia reciente de las secciones y especies, y a los eventos de convergencia, hibridación e introgresión que pudieran estar ocurriendo entre las especies que mantienen una distribución simpátrica.

El fenómeno de hibridación deberá ser analizados mediante el análisis de marcadores moleculares más variables como el *ITS* u otras regiones de cloroplasto (*psbA-trnH*, *ycf1*).

La combinación de herramientas de morfometría lineal, geométrica y molecular fueron útiles para reconocer claramente a siete de las trece especies analizadas (*Q. calophylla*, *Q. crassifolia*, *Q. rugosa*, *Q. ocoteifolia*, *Q. crispipilis*, *Q. acutifolia* y *Q. polymorpha*). Las seis especies restantes fueron similares en ambos tipos de análisis, debido a la probable divergencia reciente, al flujo génico interespecífico y a la presencia de fenómenos de hibridación e introgresión que se sugiere sean explorados en estudios futuros.

La baja diferenciación genética y morfológica entre especies denota la necesidad del uso de múltiples líneas de investigación que puedan contribuir a la delimitación de las misma, dado que el uso de la morfología por si sola es insuficiente.

El alto número de especies de encinos que conviven de forma natural en Los Altos de Chiapas, ofrece una oportunidad para investigar la dinámica de flujo génico entre las especies.

3.3 Literatura citada

- Acedo C. 2004. Taxonomía del género *Quercus* L. especies presentes en la Península ibérica. Universidad de León, Gto. 13 pp.
- Adams DC, Rohlf FJ, Slice DE. 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the “revolution”. *Italian Journal Zoology* 71: 5-16.
- Aguirre W, Jiménez-Prado P. 2018. Guía práctica de Morfometría Geométrica. Aplicaciones en la Ictiología. Pontificia Universidad Católica del Ecuador Sede Esmeraldas (PUCESE). Esmeraldas, Ecuador. 104 pp.
- Alba-López MP, González-Espinosa M, Ramírez-Marcial N, Castillo-Santiago MA. 2003. Determinantes de la distribución de *Pinus spp.* en la altiplanicie central de Chiapas, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 73:7-15. DOI: 10.17129/botsoci.1675
- Albarrán-Lara AL, Petit RJ, Kremer A, Caron H, Peñaloza-Ramírez JM, Gugger PF, Dávila-Aranda PD, Oyama K. 2018. Low genetic differentiation between two morphologically and ecologically distinct giant-leaved Mexican oaks. *Plant Systematics and Evolution* 305: 89-101. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00606-018-1554-8>
- Aldhebiani AY. 2018. Species concept and speciation. *Saudi Journal of Biological Sciences* 25: 437-440. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.04.013>
- Aldrich, PR., Jagtap M, Michler CH, Romero-Severson J. 2003. Amplification of north American red oak microsatellite markers in European white oaks and Chinese chestnut. *Silvae Genetica* 52 (3-4): 176-179.
- Álvarez-Zúñiga E, Sánchez-González A, Valencia-Ávalos S. 2010. Los encinos del Parque Nacional Los Mármoles, Hidalgo, México. *Madera y Bosques* 16(4): 55-66. DOI:10.21829/myb.2010.1641160
- Bacilieri R, Ducouso A, Kremer A. 1995. Genetic, morphological, ecological and phenological differentiation between *Quercus petrae* (Matt.) Liebl. and *Quercus robur* L. in mixed stand of northwest of France. *Silvae Genetica* 44: 1-10.

- Bacon CD, McKenna MJ, Simmons MP, Wagner WL. 2012. Evaluating multiple criteria for species delimitation: an empirical example using Hawaiian palms (Arecaceae: *Pritchardia*). *BMC Evolutionary Biology* 12: 23 DOI: <https://www.biomedcentral.com/1471-2148/12/23>
- Barkoulas M, Galinha C, Grigg SP, Tsiantis M (2007). From genes to shape: regulatory interactions in leaf development. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 660-666. - doi: 10.1016/j.pbi.2007.07.012
- Breedlove DE. 1981. Introduction to the flora of Chiapas. *Flora of Chiapas*, 1: 1-35.
- Breedlove DE. 1986. Listados florísticos de México IV. *Flora de Chiapas*. Instituto de Biología, UNAM. 245 pp.
- Bresee, M. K. (2004). Photosynthetic characteristics of the dominant tree species in two climatically different landscapes. Tesis de Maestría. Universidad de Toledo. 153 pp.
- Bruschi P, Vendramin G, Bussotti FG, Grossoni P. 2003. Morphological and molecular diversity among Italian populations of *Quercus petraea* (Fagaceae). *Annals of Botany* 91: 707-716. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcg075>
- Burger WC. 1975. The species concept in *Quercus*. *Taxon* 24: 45-50. DOI: <https://doi.org/10.2307/1218998>
- Canché-Delgado A, García-Jain SE, Vaca-Sánchez MS, Cuevas-Reyes P. 2011. Cambios en la morfología floral y foliar en *Crataegus tracyi*: importancia de la asimetría fluctuante como indicador de estrés ambiental. *Biológicas* 13(1): 44–49.
- Corander J, Waldmann P, Sillanpää MJ. 2003. Bayesian Analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics* 163(1): 367-374. DOI: <https://doi.org/10.1093/genetics/163.1.367>
- De Luna E. 2020. Integrando análisis morfométricos y filogenéticos: de la sistemática fenética a la morfometría filogenética. *Acta Botánica Mexicana* 127: e1640. DOI: [10.21829/abm127.2020.1640](https://doi.org/10.21829/abm127.2020.1640)
- De Queiroz K. 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology* 56: 879-886. DOI: <https://doi.org/10.1080/10635150701701083>
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin* 19 (1): 11-15.

- Gerber S, Chadoeuf J, Gugerli F, Lascoux M, Buiteveld J, Cottrell J, Goicoechea PG (2014) High rates of gene flow by pollen and seed in oak populations across Europe. PLoS One 9: e85130. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085130>
- González-Espinosa M, Ramírez-Marcial N, Camacho-Cruz A, Holz SC, Rey- Benayas JM, Parra-Vázquez MR. 2007. Restauración de bosques en territorios indígenas de Chiapas: modelos ecológicos y estrategias de acción. Boletín de la Sociedad Botánica de México 80 (suplemento): 11-23.
- González-Espinosa M, Ramírez-Marcial N, Ruiz-Montoya L (Eds.) 2005. Diversidad biológica en Chiapas. Plaza y Valdés, México. 484 pp.
- González-Rodríguez A, Arias DM, Valencia S, Oyama K. 2004. Morphological and RAPD analysis of hybridization between *Quercus affinis* and *Q. laurina* (Fagaceae), Two Mexican red oaks. American Journal of Botany 91(3): 401- 409.
- González-Rodríguez A, Oyama K. 2005. Leaf morphometric variation in *Quercus affinis* and *Q. laurina* (Fagaceae), two hybridizing Mexican red oaks. Botanical Journal Linnean Society 147: 427–435.
- Grant V. 1971. Plant Speciation. USA: Columbia University Press. 563 pp. ISBN-10: 0231051131
- Grant V. 1989. Especiación vegetal. Limusa. México, D.F. 587 pp.
- Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. Palaeontologia Electronica 4(1): 9 pp.
- Hardin, JW. 1975. Hybridization and introgression in *Quercu alba*. Journal of the Arnold arboretum 56: 336-363.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London 270(1512): 313–321. DOI: 10.1098 / rspb.2002.2218.
- Hipp AL, Manos PS, González-Rodríguez A, Hahn M, Kaproth M, McVay JD, Valencia AS, Cavender-Bares J. 2018. Sympatric parallel diversification of major oak clades in the Americas and the origins of Mexican species diversity. New Phytologist 217: 439-452. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.14773>

- Hollingsworth PM, Forrest LL, Spouge JL, Hajibabaei M, Ratnasingham S, Van Der Bank M, Chase MW, Cowan RS, Erickson DL, Fazekas AJ. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106: 12794–12797.
- Jaramillo-Ocampo N. 2011. *Morfometría geométrica: principios teóricos y métodos de empleo*. 24 pp.
- Juárez-Medina AK. 2013. *Diversidad alfa y beta de tres bosques mesófilos de monaña de México ubicados en diferentes provincias biogeográficas*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 58 pp.
- Kashani, N. y Dood RS. 2002. Genetic differentiation of two California red oak species, *Quercus parvula* var. *shreveii* and *Q. wislizeni*, based on AFLP genetic markers. *USDA For Serv Gen Tech Re* 184: 417-426.
- Klingenberg CP, Barluenga M y Meyer A. 2002. Shape analysis of symmetric structures: Quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution* 56(10):1909-20.
- Klingenberg CP, Duttke S, Whelan S, Kim M. 2012. Developmental plasticity, morphological variation and evolvability: a multilevel analysis of morphometric integration in the shape of compound leaves. *Journal of Evolutionary Biology* 25: 115–129.
- Klingenberg CP, McIntyre GS. 1998. Geometric morphometrics of developmental instability: analyzing patterns of fluctuating asymmetry. *Evolution* 56: 1909-1920. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1998.tb02018.x
- Klingenberg CP. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11: 353–357. DOI: 10.1111/j.1755-0998.2010.02924.x
- Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870-1874. DOI: 10.1093 / molbev / msw054
- Lahaye R, Van Der Bank M, Bogarin D, Warner J, Pupulin F, Gigot G, Maurin O, Duthoit S, Barraclough TG, Savolainen V. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105: 2923–2928.
- Leroy T, Tougemont Q, Dupouey J-L, Bodénès C, Lalanne C, Belser C, Labadie K, Le Provost G, Aury J-M, Kremer A, Plomion C. 2020. Massive postglacial gene flow

- between European white oaks uncovered genes underlying species barriers. *New Phytologist* 226: 1183-1197. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.16039>
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP V5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25 (11): 1451-1452. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>
- Liu J, Li Y, Song J, Zhang R, Yan Y, Wang Y, Du FK. 2018. Geometric morphometric analyses of leaf shapes in two sympatric Chinese oaks: *Quercus dentata* Thunberg and *Quercus aliena* Blume (Fagaceae). *Annals of Forest Science* 75: 90. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13595-018-0770-2>
- López de Heredia U, Duro-García MJ, Soto A. 2017. Leaf morphology of progenies in *Q. suber*, *Q. ilex*, and their hybrids using multivariate and geometric morphometric analysis. *iFores* 11: 90-98. DOI: 10.3832/for2577-010
- Lyu J, Song J, Liu Y, Wang Y, Li J, Du FK. 2018. Species boundaries between three sympatric oak species: *Quercus aliena*, *Q. dentata* and *Q. variabilis* at the Northern edge of their distribution in China. *Frontiers in Plant Science* 9: 414. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00414>
- Manos PS, Doyle JJ, Nixon KC. 1999. Phylogeny, biogeography, and processes of molecular differentiation in *Quercus* subgenus *Quercus* (Fagaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12(3): 333-349.
- Martínez-Cabrera D, Zavala-Chávez F, Terrazas T. 2011. Estudio morfométrico de *Quercus sartorii* y *Q. xalapensis* (Fagaceae). *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82: 551-568.
- Maya-García R, Torres-Miranda A, Cuevas-Reyes P, Oyama K. 2020. Morphological differentiation among populations of *Quercus elliptica* Née (Fagaceae) along an environmental gradient in Mexico and Central America. *Botanical Science* 98(1): 50-65. DOI: 10.17129/botsci.2395
- Mayden RL. 1997. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. In: Claridge MF, Dawah HA, Wilson M.R. eds. *Species: the Units of Biodiversity*. London: Chapman and Hall, pp. 381-424. ISBN 0 412 63120 2

- Mayer E. 1982. The growth of biological thought: diversity, evolution and inheritance. Cambridge, MA: Belknap Press of Harvard University Press. 992 pp. ISBN 9780674364462
- McDonald PG, Fonseca CR, Overton JM, Westoby M. 2003. Leaf-size divergence along rain- fall and soil-nutrient gradients: is the method of size reduction common among clades? *Functional Ecology* 17: 50-57. DOI: 10.1046/j.1365-2435.2003.00698.x
- McVaugh R. 1974. Flora Novo-Galiciana. Contr. University of Michigan Herbarium, 12(3): 1-93.
- Meade C, Parnell J. 2003. Multivariate analysis of leaf shape pattern in Asian of the *Uvaria* group (Annonaceae). *Botanical Journal of Linnean Society* 143: 231-242. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1095-8339.2003.00223.x>
- Miranda F. 1952. La vegetación de Chiapas. Ediciones del Gobierno del Estado. Tuxtla Gutiérrez chiapas, 2: 274-294.
- Mitchell KA, Bolstad PV, Vose JMC. 1999. Interspecific and environmentally induced variation in foliar dark respiration among eighteen southeastern deciduous tree species. *Tree physiology* 19: 861-870.
- Muller CH, McVaugh R. 1972. "The oaks (*Quercus*) described by Née (1801) and by Humboldt and Bonpland (1809) with comments on related species". *Contributions from the University of Michigan Herbarium* 9: 507-522.
- Mülleried FK. 1957. Geología de Chiapas. Publicaciones del Gobierno del estado. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.
- Nei M. 1972. Genetic Distance between populations. *The American Naturalist* 106: 283-292. DOI: <https://www.jstor.org/stable/2459777>
- Niinemets U, Afas NA, Cescatti A, Pellis A, Ceulmans R. 2004. Petiole length and biomass investment in support modify light-interception efficiency in dense poplar plantations. *Tree Physiology* 24: 141–154. DOI: 10.1093 / treephys / 24.2.141
- Nixon K. 1993. Infrageneric classification of *Quercus* (Fagaceae) and typification of sectional names. *Annales des science forestières, INTRA/EDp Sciences* 50 (1): 25-34.
- Nixon KC. 2006. Global and neotropical distribution and diversity of oak (genus *Quercus*) and oak forests. In: Kapelle M (eds). *Ecology and conservation of Neotropical*

- Montane oak forest. Ecological studies (Analysis and synthesis). Springer 185.
DOI: https://doi.org/10.1007/3-540-28909-7_1
- Núñez-Castillo SM, Álvarez-Moctezuma JG, Zavala-Chávez F, Espinosa-Robles P. 2011. Análisis morfológico y de hábitat en el híbrido *Quercus glabrescens* x *Q. rugosa*. Revista Mexicana de Ciencias Forestales 2 (3): 84-100.
- Ourcival JM y Rambal S. 1999. Exploring the relationship between reflectance and anatomical and biochemical properties in *Quercus ilex* leaves. New phytologist 143: 351-364.
- Palacio-Prieto JL, Bocco G, Velázquez A, Mas JF, Takaki-Takaki F, Victoria A, Luna-González L, Gómez-Rodríguez G, López-García J, Palma-Muñoz M, Trejo-Vázquez I, et al. 2000. La condición actual de los recursos forestales en México: resultados del Inventario Forestal Nacional 2000. Investigaciones Geográficas 43: 183-203.
- Pang X, Liu H, Wu S, Yuan Y, Li H, Dong J, Liu Z, An Ch, Su Z, Li B. 2019. Species identification of oaks (*Quercus* L., Fagaceae) from gene to genome. International Journal of Molecular Sciences 20: 5940. DOI: 10.3390/ijms20235940
- Pedroso HL, Rocha-Filho LC, Lomonaco C. 2010. Variación fenotípica de plantas del cerrado (Sabana brasileña) frente a la heterogeneidad ambiental. Revista ecosistemas 19(1): 24-36.
- Peñaloza-Ramírez JM, González-Rodríguez A, Mendoza-Cuenca L, Caron H, Kremer A, Oyama K. 2010. Interspecific gene flow in a multispecies oak hybrid zone in the Sierra Tarahumara of Mexico. Annals of Botany 105 (3): 389-399. DOI: 10.1093 / aob / mcp301
- Quintana-Ascencio PF, González-Espinosa M. 1993. Afinidad fotogeográfica y papel sucesional de la flora leñosa de los bosques húmedos de pino-encino de los Altos de Chiapas, México. Acta Botánica Mexicana (21): 43-57.
- Rocha-Loredo AG, Ramírez-Marcial N, González-Espinosa M. 2010. Riqueza y diversidad de árboles de bosque tropical caducifolio en la Depresión Central de Chiapas. Boletín de Sociedad Botánica Mexicana 87: 89-103.
- Rodríguez-Correa H, Oyama K, Quesada M, Fuchs EJ, González-Rodríguez A. 2018. Contrasting Patterns of Population History and Seed-mediated Gene flow in Two

- Endemic Costa Rican Oak Species. *Journal of Heredity* 109: 530-542. DOI: <https://doi.org/10.1093/jhered/esy011>
- Rohlf FJ, Slice DE. 1990. Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology* 39 (1): 40–59. DOI: 10.2307 / 2992207
- Romero RS. 2006. Revisión taxonómica del complejo *Acutifoliae* de *Quercus* (Fagaceae) con énfasis en su representación en México. *Acta Botánica* 76: 1-45.
- Rosell JA, Olson ME, Weeks A, De-Nova JA, Medina LR, Pérez CJ, Feria TP, Bómez-Bermejo R, Montero JC, Eguiarte LE. 2010. Diversification in species complexes: Test of species origin and delimitation in the *Bursera simarouba* clade of tropical trees (Burseraceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 57: 798-811. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2010.08.004>
- Rosenberg, A., 1985. *The Structure of Biological Science*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Ruiz-Domínguez AC. 2016. Variación genética y morfológica de *Quercus spp.* en Chiapas, México. Tesis de licenciatura. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. 85 pp.
- Rzedowski J. 1978. *Vegetación de México*. Limusa. México, D. F. 432 pp.
- Sheets HD. 2001. Software IMP © (Integrated Morphometric Package) Department of Physics, Canisius College, Buffalo, NY 1408, Department of Geology State University of New York at Buffalo, NY 14260. <http://www.canisius.edu/~sheets/morphsoft.html>
- Simeone MC, Piredda R, Papini A, Vesella F, Schirone B. 2013. Application of plastid and nuclear markers to DNA barcoding of Euro-Mediterranean oaks (*Quercus*, Fagaceae): problems, prospects and phylogenetic implications. *Botanical Journal of the Linnean Society* 172: 478-499. DOI: <https://doi.org/10.1111/boj.12059>
- Su X, Wu G, Li L, Liu J. 2015. Species delimitation in plants using the Qinghai-Tibet Plateau endemic *Orinus* (Poaceae: Tridentinae) as an example. *Annals of Botany* 116: 35-48. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcv062>

- Tovar-Sánchez E, Oyama K. 2004. Natural hybridization and hybrid zones between *Quercus crassifolia* and *Quercus crassipes* (Fagaceae) in Mexico: Morphological and molecular evidence. *American Journal of Botany* 91(9): 1352- 1363.
- Turland NJ, Wiersema JH, Barrie FR, Greuter W, et al. 2018. Código Internacional de Nomenclatura para algas, hongos y plantas (Código de Shenzhen). Berlín, International Association for Plant Taxonomy (Europe), 377 pp. ISBN: 978-3-946583-16-5.
- Uribe SMD. 2009. Variación morfológica y estructura genética en poblaciones naturales de *Quercus rugosa* Née (Fagaceae) en México. Tesis de doctorado. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacan. 83 pp.
- Uribe-Salas D, Sáenz-Romero C, González-Rodríguez A, Téllez-Valdéz O, Oyama K. 2008. Foliar morphological variation in the oak *Quercus rugosa* Née (Fagaceae) along a latitudinal gradient in Mexico: Potential implications for management and conservation. *Forest Ecology and Management* 256: 2121- 2126.
- Valencia AS, Flores-Franco G. 2006. Catálogo de autoridades taxonómicas de las fagáceas (Fagaceae: Magnoliopsida) de México. Facultad de Ciencias, UNAM. Base de datos SNIB-CONABIO, proyecto CS008. México. 13 pp.
- Valencia-Ávalos S, Flores-Franco G, Jiménez-Ramírez J. 2015. A nomenclatural revision of *Quercus acutifolia*, *Q. conspersa* and *Q. grahamii* (Lobatae, Fagaceae). *Phytotaxa* 218(3): 289-294.
- Valencia-Ávalos S. 2004. Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 75: 33-53.
- Valencia-Ávalos S. 2021. Species delimitation in the genus *Quercus* (Fagaceae). *Botanical Science* 99 (1): 01-12. DOI: 10.17129/botsci.2658
- Valladares F, Skillman JB, Pearcy RW. 2000. Convergence in light capture efficiencies among tropical forest understory plants with contrasting crown architectures: a case of morphological compensation. *American Journal of Botany* 89(8):1275-1284.
- Vázquez ML, Nixon KC. 2013. Taxonomy of *Quercus crassifolia* (Fagaceae) and morphologically similar species in Mexico. *Brittonia* 65 (2): 208-227.

- Villaseñor JL. 2016. Checklist of the native vascular plants of Mexico. Taxonomy and systematics. *Revista Mexicana de biodiversidad* 87: 559-902.
- Viscosi P, Slice DE, Loy A, Blasi C. 2009. Geometric morphometrics analyses of leaf variation in four oak species of the genus *Quercus* (Fagaceae). *Plan Biosystems* 143(3): 575-587. DOI: <https://doi.org/10.1080/11263500902775277>
- Viscosi V, Antonecchia G, Lepais O, Fortini P, Gerber S, Loy A. 2012. Leaf shape and size differentiation in white oaks: assessment of allometric relationships among three sympatric species and their hybrids. *International Journal of Plant Sciences* 173(8): 875-884. DOI: 10.1086/667234
- Yan M, Liu R, Hipp AL, Deng M, Xiong Y. 2019. Ancient events and climate adaptive capacity shaped distinct chloroplast genetic structure in the oak lineages. *BMC Evolutionary Biology* 19: 202. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12862-019-1523-z>
- Yan M, Xiong Y, Liu R, Deng M, Song J. 2018. The application and limitation of universal chloroplast markers in discriminating east Asian evergreen oaks. *Frontiers in Plant Science*, 9: 569. DOI: 10.3389/fpls.2018.00569
- Yang J, Vázquez L, Chen X, Li H, Zhang H, Liu Z, Zhao G. 2017. Development of chloroplast and nuclear DNA markers of Chinese oaks (*Quercus* subgenus *Quercus*) as assessment of their utility as DNA barcodes. *Frontiers in Plant Science* 8: 1-17. DOI: doi: 10.3389/fpls.2017.00816
- Yang Y, Zhou T, Duan D, Yang J, Feng L y Zhao G. 2016. Comparative analysis of the complete chloroplast genomes of five *Quercus* species. *Frontiers in Plant Science* 7: 959. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00959>
- Zavala ChF. 1990. Los encinos mexicanos: un recurso desaprovechado. *Ciencia y desarrollo* XVI 95: 43-51.
- Zavala ChF. 1995. Encinos hidalguenses. Universidad Autónoma de Chapingo, México. 133 pp.
- Zavala-Chávez F. 1998. Observaciones sobre la distribución de encinos en México. *Polibotánica* 8: 47-64.
- Zhang R, Hipp AL, Gailing O. 2015. Sharing of chloroplast haplotypes among red oak species suggest interspecific gene flow between neighboring populations. *Botany* 93: 691-700. DOI: [dx.doi.org/10.1139/cjb-2014-0261](https://doi.org/10.1139/cjb-2014-0261)