



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA**



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO**

**ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Liquidambar styraciflua*  
L. (ALTINGIACEAE): ESPECIE CLAVE DEL BOSQUE DE NIEBLA DE  
SAN LUIS POTOSÍ**

**Por:**

**Ing. Israel Cruz Jimenez**

**Tesis presentada como requisito parcial para obtener el título de  
Maestro en Ciencias Agropecuarias**

**Soledad de Graciano Sánchez, SLP.**

**Febrero de 2019**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA**



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO**

**ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *Liquidambar styraciflua*  
L. (ALTINGIACEAE): ESPECIE CLAVE DEL BOSQUE DE NIEBLA DE  
SAN LUIS POTOSÍ**

**Por:**

**Ing. Israel Cruz Jimenez**

**Co-directores**

**Dr. José Arturo de Nova Vázquez**

**Dr. Pablo Delgado Sánchez**

**Asesora**

**Dra. Laura Yáñez Espinosa**

**Tesis presentada como requisito parcial para obtener el título de  
Maestro en Ciencias Agropecuarias**

**Soledad de Graciano Sánchez, SLP.**

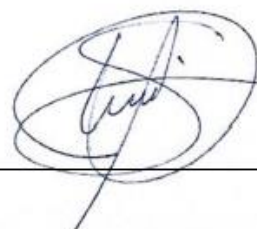
**Febrero de 2019**

El trabajo titulado “**Análisis de la diversidad genética de *Liquidambar styraciflua* L. (Altingiaceae): especie clave del bosque de niebla de San Luis Potosí**”, fue realizado por: **Israel Cruz Jimenez** como requisito parcial para obtener el grado de **Maestro en Ciencias Agropecuarias** en la LGAC “**Manejo de Recursos Bióticos**” fue revisado y aprobado por el suscrito Comité de Tesis.

Dr. José Arturo de Nova Vázquez  
Codirector



Dr. Pablo Delgado Sánchez  
Codirector



Dra. Laura Yáñez Espinosa  
Asesora



Ejido Palma de La Cruz, Soledad de Graciano Sánchez, San Luis Potosí, a 21 de febrero de 2019.

## **Dedicatoria**

*A mis padres: Constantino Cruz De La Rosa y Apolonia Jimenez Vasquez, por guiar mis pasos con sabiduría al enseñarme a amar a nuestro Señor Jesús de Nazaret.*

*A mis hermanos: Ulises, Edith, Esmeralda, Domitila, Esaú, Irma, Javier, Héctor, Elva y Rubén, por sus buenos consejos y apoyarme en las diferentes etapas de mi vida.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A Jehová, porque da la sabiduría y de su boca viene el conocimiento y la inteligencia (Proverbios 2:6).

A la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí por facilitarme las instalaciones y servicios para la realización mi proyecto de investigación de tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por autorizarme la beca para mis estudios de maestría (CVU: 786854, número de apoyo: 487959).

Al CONACyT, por el financiamiento de mi investigación de tesis bajo los proyectos de ciencia básica CB243454 y CB179982 otorgados a los Dres. José Arturo de Nova Vázquez y Pablo Delgado Sánchez.

Al Instituto de Investigación de Zonas Desérticas y su Herbario Isidro Palacios por la disponibilidad de infraestructura, equipos y herramientas, espacios y vehículos para el traslado a las comunidades.

Al Laboratorio de Biotecnología de la FAyV, por facilitarme la infraestructura y los equipos necesarios para realizar los experimentos del proyecto de investigación.

A los pobladores y autoridades de los ejidos y comunidades Coronel Castillo, La Trinidad, Copalillos, La Nueva Reforma, Maguey de Oriente y Cerro La Cruz de la Huasteca Potosina, por permitirme realizar el trabajo de investigación en sus áreas de bosque de niebla, y a los guías que nos acompañaron y cuidaron.

A los Doctores José Arturo De Nova Vázquez y Pablo Delgado Sánchez, por sus consejos y observaciones para la ejecución de la presente investigación de tesis.

A la Dra. Laura Yáñez Espinosa por sus valiosas observaciones para la afinación de este proyecto de tesis.

A la Dra. María de la Luz Guerrero González, por sus consejos y recomendaciones en los experimentos realizados.

A la M en C. Karen Lizbeth Reyes Barrera, por enseñarme las técnicas básicas de biología molecular, consejos y apoyo en la realización de la presente investigación.

Al Ing. Alejandro Durán Fernández director de la RPC Xilitla por parte de SEMARNAT-CONANP, por el apoyo y vinculación con los pobladores de la reserva.

Al Dr. Pedro Castillo Lara por su disponibilidad en las incansables salidas al campo rumbo a la Huasteca.

A mi amigo y compañero de proyecto el M en C. Guillermo Javier Sánchez Fuentes, por el apoyo reciproco en el trabajo de campo.

A la Dra. M. M. Salinas R. y al Dr. Ricardo González T. por su apoyo en el trabajo de campo.

Al M en C. Gabriel Rubio Méndez por su apoyo incondicional en los análisis estadísticos.

A mis compañeros del laboratorio de biotecnología por promover un ambiente agradable.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS.....	iii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iv
RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. <i>Liquidambar styraciflua</i> L. (Altingiaceae).....	2
1.3. Historia biogeográfica de la especie.....	4
1.4. Marcadores moleculares microsatélites.....	6
1.5. Justificación.....	6
II. HIPÓTESIS.....	8
III. OBJETIVOS.....	8
3.1. Objetivo general.....	8
3.2. Objetivos específicos.....	8
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
4.1. Ubicación de las poblaciones y colecta de muestras.....	9
4.2. Aislamiento de ADN.....	10
4.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y genotipificación.....	10
4.4. Análisis de los datos.....	12
4.5. Índice de disturbio crónico.....	13
V. RESULTADOS.....	16
5.1. Diversidad genética.....	16
5.2. Diferenciación y estructura genética de las poblaciones.....	17
5.3. Relaciones genéticas y patrones de variación geográfica.....	18
5.4. Índice de disturbio crónico y su correlación con los índices de diversidad genética.....	21
VI. DISCUSIÓN.....	24
6.1. Diversidad, estructura y flujo genético.....	24
6.2. Disturbio e indicadores de diversidad genética.....	25

VII.	IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN DE LOS RECURSOS GENÉTICOS DEL BOSQUE DE NIEBLA.....	28
VIII.	CONCLUSIONES.....	29
IX.	LITERATURA CITADA.....	30
X.	ANEXO.....	36
10.1.	Método de CTAB modificado para la extracción de ADN.....	36



## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción de las poblaciones de <i>Liquidambar styraciflua</i> .....	9
Cuadro 2. Loci microsatélite y secuencia de los primers.....	11
Cuadro 3. Análisis polimórfico de 15 Loci SSR.....	16
Cuadro 4. Diversidad genética de seis poblaciones de <i>Liquidambar styraciflua</i> mostrados por SSR.....	17
Cuadro 5. Análisis de varianza molecular (AMOVA) en seis poblaciones de <i>Liquidambar styraciflua</i> .....	18
Cuadro 6. Valores de los componentes principales 1 y 2 para los parámetros del disturbio crónico.....	21
Cuadro 7. Valores del índice de disturbio crónico para los sitios estudiados en los BN de San Luis Potosí.....	22
Cuadro 8. Niveles de disturbio a partir de la regla de Sturges.....	23
Cuadro 9. Correlación de Pearson entre el índice de disturbio crónico e índices diversidad genética.....	23

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Liquidambar styraciflua</i> L.....	3
Figura 2. Distribución geográfica de <i>Liquidambar styraciflua</i> en los BN del Este y Sur de México.....	4
Figura 3. Reconstrucción biogeográfica de Altingiaceae basada en registros fósiles.....	5
Figura 4. Distribución geográfica de las poblaciones de <i>Liquidambar styraciflua</i> en la Sierra Madre Oriental de San Luis Potosí.....	10
Figura 5. Estructura de poblaciones inferidas de <i>Liquidambar styraciflua</i> en San Luis Potosí con el programa STRUCTURE 2.3.3 ( $K=2$ ).....	19
Figura 6. Dendograma de UPGMA que muestra las relaciones de las poblaciones de <i>Liquidambar styraciflua</i> en San Luis Potosí, basado en distancia genética de <i>Nei</i> .....	19
Figura 7. Análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en estimaciones pareadas de distancia genética para todas las poblaciones.....	20
Figura 8. Relación entre distancia genética y distancia geográfica ( $r= 0.808$ ; $R^2= 0.653$ ; $p= 0.005$ ) para seis poblaciones.....	20

## RESUMEN

El bosque de niebla (BN) es uno de los ecosistemas más importantes del mundo, sin embargo, dada su fragilidad y fragmentación son de los más amenazados. En México el BN cubre menos del 1% del territorio, pero resguarda el 10% de sus especies vegetales. En el estado de San Luis Potosí se localizan algunos de sus relictos más importantes. *Liquidambar styraciflua* es una especie clave del BN por ser una especie pionera y con importantes funciones ecosistémicas. El objetivo de la presente investigación fue conocer la diversidad y estructura genética de poblaciones de *L. styraciflua* en los relictos de BN en San Luis Potosí. Se estudiaron seis poblaciones en los municipios de Xilitla, Rioverde, Tamasopo, El Rayón, El Naranjo y Alaquines analizando un total de 145 individuos. Se amplificaron regiones microsátélites utilizando 22 primers. Los amplicones de 15 primers mostraron polimorfismo que fue visualizado en geles de acrilamida. Los tamaños de las bandas fueron estimados y normalizados para su análisis que incluyó pruebas de diversidad, estructura genética y flujo genético. Asimismo, se determinó el índice de disturbio crónico en los fragmentos de BN donde se ubican las seis poblaciones de *L. styraciflua*, con el fin de estudiar su relación con la diversidad y estructura genética de la especie. Se emplearon 14 indicadores de tres agentes de disturbio crónico: 1) las actividades humanas, 2) la ganadería y 3) el deterioro del hábitat. Se recuperó un total de 142.66 alelos diferentes ( $N_a$ ) para los 15 *loci* SSR, con un número de alelos efectivos ( $N_e$ ) promedio de 6.32. La heterocigosis observada ( $H_o= 0.55$ ) fue menor a la esperada ( $H_e= 0.79$ ). Las poblaciones con mayor diversidad genética fueron Copalillos ( $I= 2.07$ ;  $H_e= 0.83$ ), Las Flores ( $I= 2.02$ ;  $H_e= 0.82$ ) y Nueva Reforma ( $I= 2.00$ ;  $H_e= 0.83$ ). El valor de  $F_{ST}= 0.10$  indicó un nivel moderado de diferenciación genética entre poblaciones, con mayor variación genética entre individuos (90.36%). Hay un alto grado de correlación ( $r= 0.81$ ) entre la distancia genética y la distancia geográfica, lo que indica que el aislamiento por distancia podría afectar la estructura genética. Las poblaciones quedaron agrupadas en dos grupos ( $K= 2$ ). Estos análisis sugieren una baja estructura genética y un alto flujo genético entre algunas de las poblaciones, con una dinámica similar al modelo de metapoblaciones. Los parámetros de disturbio crónico resaltan el efecto de las actividades humanas como la principal causa de disturbio en el BN. Sin embargo, no se encontró una correlación importante entre el IDC y los índices de diversidad y estructura genética. Es posible que la biología reproductiva y la dinámica ecológica de *L. styraciflua* le confiera resistencia al disturbio, debido a su crecimiento y madurez sexual acelerados y su polinización cruzada anemófila a largas distancias.

Palabras clave: bosque mesófilo de montaña, disturbio crónico, microsátélites, estructura genética.

## ABSTRACT

The cloud forest (CF) is one of the most important ecosystems in the world, however, given its fragility and fragmentation are one of the most threatened. In Mexico, the CF covers less than 1% of the territory, but holds 10% of its plant species. In the state of San Luis Potosí some of its most important relict are located. *Liquidambar styraciflua* is a key species of the CF since its important ecosystem functions and as a pioneer. The objective of this research was to analyze the genetic diversity and structure of populations of *L. styraciflua* in the CF relicts in San Luis Potosi. We studied six populations in the municipalities of Xilitla, Rioverde, Tamasopo, Rayón, El Naranjo and Alaquines, from a sample of 145 individuals. We amplified microsatellite regions using 22 primers. The amplicons of 15 primers showed polymorphism, visualized in polyacrylamide gels. The sizes of the bands were estimated and normalized, the analysis included tests of genetic diversity and structure, as well as gene flow. Additionally, we estimated the chronic disturbance index for the CF fragments where the six populations of *L. styraciflua* are located, in the order to study the relationship with diversity and genetic structure, using 14 indicators in three agents of disturbance: 1) human activities, 2) livestock and 3) the habitat degradation. We retrieved a total of 142.66 different alleles ( $N_a$ ) for the 15 SSR loci, with a number of allele effective ( $N_e$ ) average of 6.32. The observed heterozygosity ( $H_o= 0.55$ ) was lower than expected ( $H_e= 0.79$ ). Populations with the greatest genetic diversity were Copalillos ( $I= 2.07$ ;  $H_e= 0.83$ ), Las Flores ( $I= 2.02$ ;  $H_e= 0.82$ ) and La Nueva Reforma ( $I= 2.00$ ;  $H_e= 0.83$ ). The value of  $F_{ST}= 0.10$  indicated a moderate level of genetic differentiation between populations, with greater genetic variation among individuals (90.36%). There is a high degree of correlation ( $r= 0.80$ ) between genetic distance and geographical distance, indicating that distance isolation could affect genetic structure. The populations were grouped into two groups ( $K= 2$ ). These analyses suggest a low genetic structure and a high genetic flow between some of the populations, similar to the metapopulation model. Chronic disturbance parameters highlight the effect of human activities as the main threat to CF. However, no significant correlation was found between the IDC and the genetic diversity and structure. It is possible that the reproductive biology and ecological dynamics of *L. styraciflua* confer resistance to disturbance, due to its accelerated growth and sexual maturity, and anemophile cross-pollination over long distances.

Keywords: Cloud forest, chronic disturbance, microsatellites, genetic structure.

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Antecedentes

El bosque de niebla (BN) o bosque mesófilo de montaña es catalogado como uno de los ecosistemas más importantes del mundo, por los altos niveles de biodiversidad que resguarda en un área reducida, además de los servicios ecosistémicos que proporciona, tales como la captura de carbono, recarga de cuerpos de agua y conservación de la biodiversidad, entre otros (Bubb *et al.*, 2004). En la actualidad, los ecosistemas en México presenta alteraciones humanas importantes y las áreas con vegetación natural bien conservada han sido reducidas. Entre los ecosistemas más vulnerables se encuentra el BN, que se distribuye en 20 estados del país y es uno de los hábitat prioritarios para la conservación de la biodiversidad mexicana debido a su fragilidad y fragmentación (Villaseñor, 2010). Aunque el BN cubre menos del 1% de la superficie del país es el ecosistema con mayor número de especies de flora y fauna con relación al territorio que ocupa, constituyendo 10% de la riqueza vegetal del país (Rzedowski, 1996).

El BN se caracteriza por prosperar en lugares donde prevalece un clima húmedo y fresco (Rzedowski, 1996), con dominancia del clima templado húmedo con lluvias todo el año (Cf) (Köppen, 1948), con alta humedad por las frecuentes lluvias y la persistencia de niebla desde el nivel del suelo. En ellos convergen especies típicas de las selvas altas y medianas características de las zonas neotropicales húmedas de baja altitud, y además especies de los bosques templados característicos de las regiones montañosas y frías (Villaseñor, 2010). Su importancia biológica radica en la regulación de los ciclos hidrológicos, ya que gracias a ellos los mantos acuíferos mantienen agua, los sedimentos se retienen y se evita el riesgo de inundaciones debido a su capacidad de captación de agua (Toledo, 2009). Además los BN proveen de productos útiles para los habitantes locales, dentro de los que destacan el uso maderable, cercas vivas, medicinal y alimentario (CONABIO, 2010).

En México el BN se distribuye en laderas pronunciadas y en cañadas húmedas, al sur del paralelo 25° N, en altitudes que van desde 600 hasta 3,200 msnm (González *et al.*, 2011). Presenta mayores extensiones en la Sierra Madre del Sur, las montañas del norte de Chiapas y la Sierra Madre Oriental (González *et al.*, 2011). El BN incluye entre 2,500 (Rzedowski, 1996) y 2,822 especies vegetales, las cuales se distribuyen en 32 familias y 165 géneros (Villaseñor, 2010). En el estado de San Luis Potosí, Fortanelli *et al.* (2014) registran 199 especies de plantas vasculares para la localidad de Copalillos pertenecientes a 165 géneros y 91 familias. En el estado, este tipo de

vegetación se ha degradado aceleradamente, ya que en el año de 1973 cubría 6,107 ha y para el año 2007 su área se redujo a 3,239 ha (Leija *et al.*, 2011).

## 1.2. *Liquidambar styraciflua* L. (Altingiaceae)

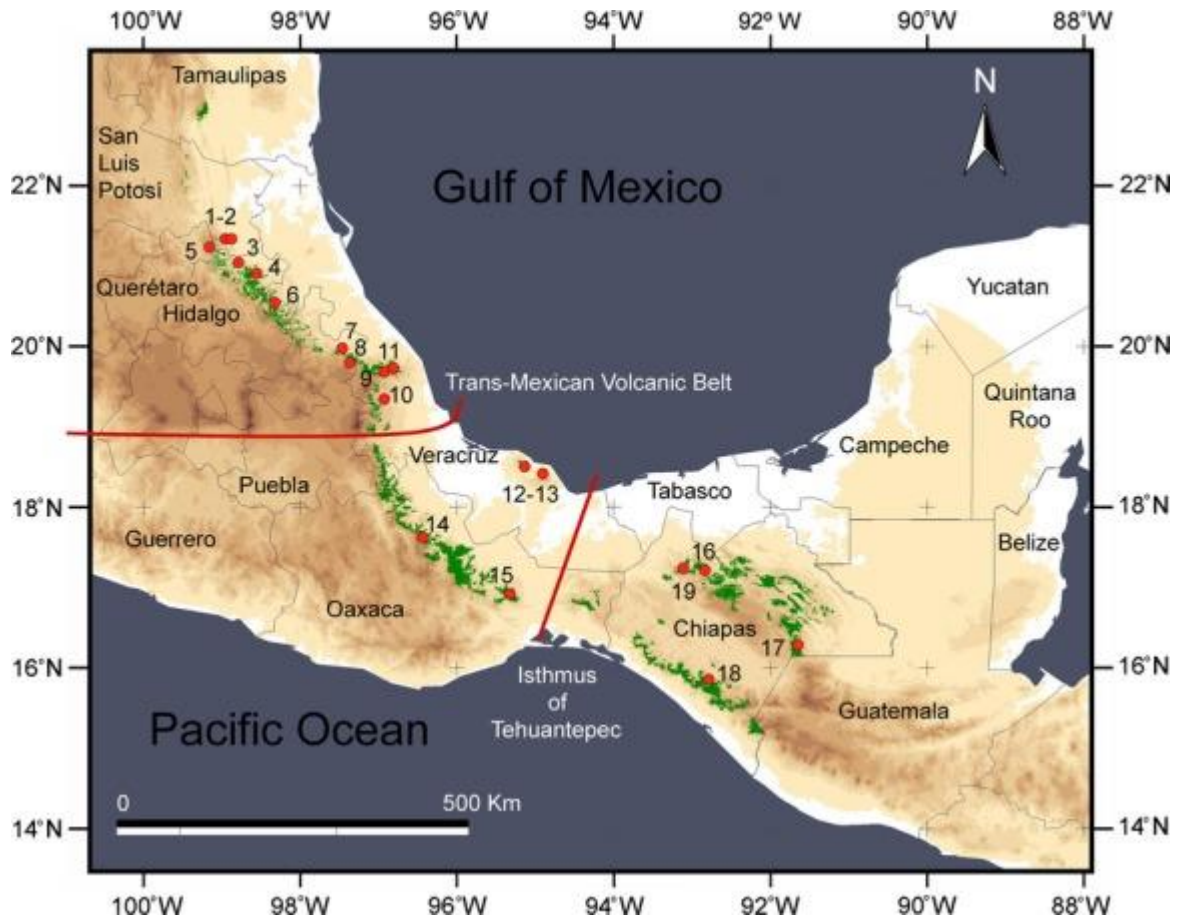
Dentro de las especies arbóreas de los relictos de BN en San Luis Potosí destaca *Liquidambar styraciflua* por su mayor distribución y abundancia. Es una especie arbórea caducifolia de rápido crecimiento (Figura 1). Tiene una vida media de 200 años y comienza su reproducción a los 20 años (Morris *et al.*, 2008). Los árboles llegan a medir hasta 60 m de alto y 1.5 m de diámetro a la altura de pecho; el tallo es recto, con ramas ascendentes, delgadas, copa alargada o piramidal y la corteza es estrechamente fisurada de color castaño (Pennington y Sarukhán, 2005). Sus hojas son simples y dispuestas en espiral, son más anchas que largas, de 4-5 cm de largo y 5-15 cm de ancho, con lóbulos triangulares y margen aserrado (Pennington y Sarukhán, 2005). Es una especie monoica y sus flores son polinizadas por el viento (anemófilia) al final de la primavera; la producción de frutos es al final de otoño (Sosa, 1978). Las flores están dispuestas en panículas terminales o axilares sobre las ramas laterales, de 5 a 10 cm de largo (Pennington y Sarukhán, 2005). Los frutos son capsulas pequeñas de 2.5 a 4.0 cm de diámetro en pedúnculos de 5.0 a 6.5 cm de largo; al madurar se abren y liberan las semillas, la cuales son dispersadas por el viento y consumidas por aves y ardillas (Morris *et al.*, 2009). Se caracteriza por el desarrollo de una inflorescencia separada por la maduración acropetala de las cabezas masculinas superiores en oposición al desarrollo basipetalo de las cabezas femeninas inferiores, las cuales se desarrollan a un ritmo más lento. Los tiempos de diferencia observada entre el grado de maduración de las cabezas masculinas y femeninas es muy marcada. Esta diferencia en las tasas ontogenéticas continúa a través de la antesis, y en el momento de la polinización, los óvulos y los megagametofitos dentro del gineceo están todavía en desarrollo. La variabilidad en la expresión y distribución sexual de los tipos florales puede atribuirse a un gradiente o cambio temporal de los factores morfogenéticos determinantes del sexo (Wisniewski y Bogle, 1982).



**Figura 1.** *Liquidambar styraciflua* L.

Es una especie originaria de Norteamérica, distribuida en la región cercana al Atlántico. Se distribuye desde Connecticut, EE.UU., hasta la zona central de Nicaragua. En México es una especie nativa y se encuentra desde los 378 a 2,100 m snm, en la vertiente del Golfo a lo largo de la Sierra Madre Oriental, desde el Sur de Nuevo León hasta el norte de Chiapas, y en la vertiente del Pacífico en la Sierra Madre del Sur en Oaxaca y en la sierra del Soconusco en Chiapas (Pennington y Sarukhán, 2005; Ruiz-Sanchez y Ornelas, 2014) (Figura 2). En San Luis Potosí se encuentra en los manchones bien conservados de BN con una extensión de 3,239 ha en las localidades: La Nueva Reforma, El Carrizalito de Moctezuma, Álamos de Arriba, Las Mesas, El Platanito, Colonia Díez Gutiérrez, Copalillos y La Silleta, perteneciente a los municipios de Alaquines, Ciudad del Maíz, El Naranjo, Rayón, Tamasopo y Xilitla, respectivamente (Leija *et al.*, 2011), y cerro La Cruz perteneciente al municipio de Rioverde (Salinas-Rodríguez y Cruzado-

Cortés, 2011). Esta especie tiene potencial para la restauración ecológica en terrenos degradados por causas agrícolas, ganaderas y mineras, por lo que se ha comenzado a utilizar en sistemas agrosilvopastoriles y para la captura de carbono en diferentes regiones del país (Pedraza y Williams, 2003).



**Figura 2.** Distribución geográfica de *Liquidambar styraciflua* en los BN del Este y Sur de México. Los puntos rojos indican la presencia de la especie. Tomado de Ruiz-Sanchez y Ornelas (2014).

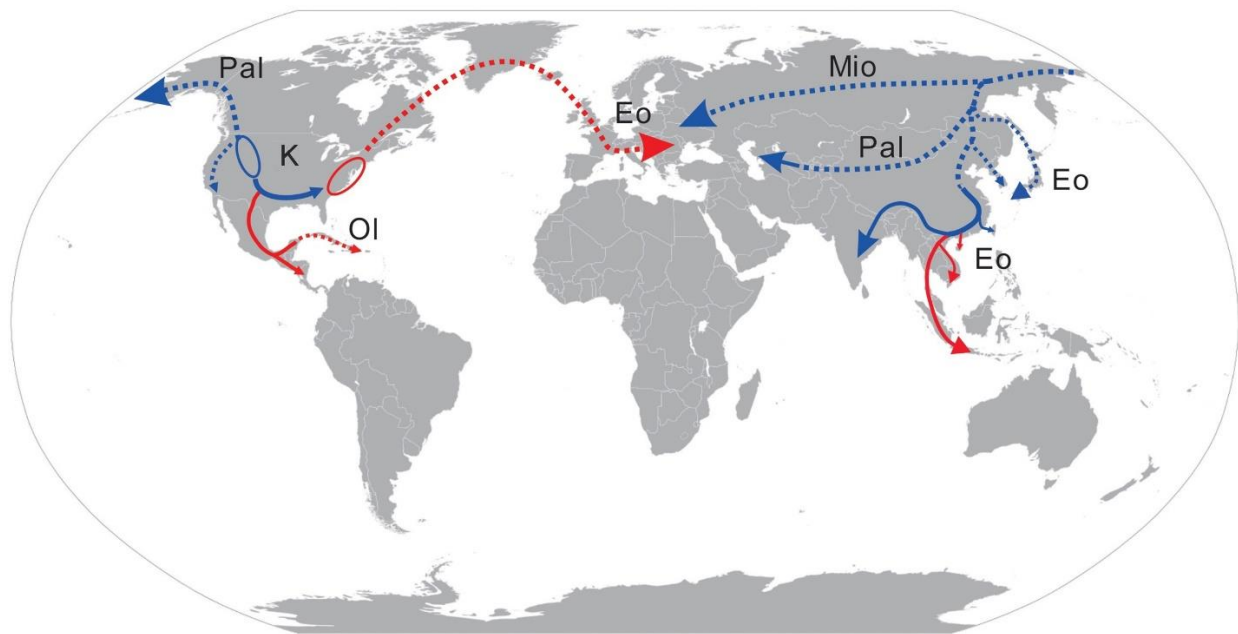
### 1.3. Historia biogeográfica de la especie

Altiaceae (conocida como gomas dulces) es una familia de 15 especies en los géneros *Liquidambar*, *Altingia* y *Semiliquidambar*, que tienen una disyunción biogeográfica intercontinental clásica entre Asia y Norte América, divergió hace 90 Ma en el periodo Cretácico. *Liquidambar* es un género parafilético, con cuatro especies, *Liquidambar styraciflua*, *L. orientalis* (especies hermanas), *L. formosana* y *L. acalycina*. Estas especies se dan Asia oriental, Asia



occidental, y este de Norte América a América Central (Ickert-Bond y Wen, 2006). La divergencia entre *L. styraciflua* del este de Norte América y *L. orientalis* de Asia occidental ocurrió hace  $23 \pm 10.2$  Ma. Las migraciones biogeográficas a lo largo de la historia de Altingiaceae desde el Cretácico ha sido a través de los puentes terrestres de Bering y Atlántico Norte (Ickert-Bond y Wen, 2006).

Graham (1999; 2011) propuso que la división de la población de *Liquidambar styraciflua* en América del Norte y América Central se debió al calentamiento climático y a la sequía durante el Mioceno tardío hasta el Pleistoceno temprano a partir del polen fósil. Por otra parte, Ruiz-Sanchez y Ornelas (2014) sugieren que las poblaciones mesoamericanas se originaron en el sureste de América del Norte, divididas por el Cinturón Volcánico Trans-Mexicano durante el Plioceno al Cuaternario. Con base en los registros microfósiles y palinológicos realizados por Yang-Jun *et al.* (2018) para la historia biogeográfica de Altingiaceae (Figura 3), los primeros registros fósiles son del oeste y este de América del Norte en el Cretácico Superior.



**Figura 3.** Reconstrucción biogeográfica de Altingiaceae basada en registros fósiles. Las líneas continuas se refieren a la distribución actual, mientras que las líneas discontinuas indican que Altingiaceae se ha extinguido en el área. Líneas rojas representan la ruta de migración del tipo tropical y las líneas azules representan el tipo de clima templado. K, Cretáceo; Pal, Paleoceno; Eo, Eoceno; Ol, Oligoceno; Mio, Mioceno. Tomado de Yang-Jun *et al.*, 2018.

La evidencia fósil de hoja e infrutescencia de Altingiaceae sugiere que esta familia probablemente se originó en América del Norte en el Cretácico Superior, lo cual corresponde con la edad estimada de 98.69 Ma (Tank *et al.*, 2015; Yang-Jun *et al.*, 2018). La evidencia fósil demostró que el tiempo para los linajes del este de Asia y Europa occidental divergieron en América del Norte, siendo más antiguas que las estimaciones previas (Yang-Jun *et al.*, 2018).

#### 1.4. Marcadores moleculares microsatélites

Los marcadores moleculares son una herramienta que se basa en el análisis de diferencias moleculares y nos permiten entender los campos de la biología como la evolución, ecología y estudios de diversidad (Eguiarte *et al.*, 2007; Cornejo *et al.*, 2014). Así mismo, han contribuido en el estudio de la variación genética entre individuos, poblaciones y especies para explicar patrones y procesos ecológico-evolutivos (Schlötterer, 2004).

Los microsatélites son secuencias de ADN constituidas por repeticiones de motivos de uno a seis pares de bases (Hancock, 1999); se caracterizan principalmente por distribuirse en regiones codificantes y no codificantes, ser altamente polimórficos y de herencia mendeliana; además, han sido empleados para estudiar la estructura genética en poblaciones de plantas (Palmieri *et al.*, 2007; Zane *et al.*, 2002; Sonah *et al.*, 2011), como *Liquidambar formosana* (Sun *et al.*, 2016), el género *Platanus* (Lang, 2010), *Oreopanax xalapensis* (Ruiz-Montoya *et al.*, 2011), entre otras. Estos marcadores han tomado ventaja sobre otros marcadores genéticos por su multiallelismo, codominancia y alta heterocigosidad, además utilizan poca cantidad de ADN. La presencia de un solo locus genético por microsatélite hace que la lectura de las bandas sea clara y fácil de interpretar (Becerra y Paredes, 2000). Se ha estimado que los microsatélites de ADN nuclear tienen tasas de mutación de  $1 \times 10^3$  a  $1 \times 10^6$  más altas que el ADN de cloroplastos, lo cual es importante para realizar análisis de la historia evolutiva de las especies (Eguiarte *et al.*, 2007).

#### 1.5. Justificación

La diversidad genética representa el nivel fundamental de la biodiversidad, pues a partir de ella los diferentes procesos evolutivos generan cambios y a la larga producen adaptación, especiación y extinción. Estudiar la diversidad y estructura genética permite evaluar el grado de conservación de una especie, así como su potencial evolutivo futuro. La perturbación ambiental afecta de forma negativa la dinámica ecológica y los niveles de diversidad en los ecosistemas. El disturbio puede

afectar la diversidad genética, la abundancia de especies y la composición de las comunidades bióticas. La reducción de la diversidad genética tiene consecuencias en la aptitud de los individuos de una especie, y por ende la viabilidad y adaptabilidad de sus poblaciones al cambio ambiental, la evolución de nuevas especies.

La alteración antropogénica es considerada una de las mayores amenazas para la biodiversidad. Conocer la influencia de la perturbación humana en los patrones de diversidad genética es fundamental para generar mejores propuestas de conservación y aprovechamiento de los recursos naturales, debido al impacto acelerado que el ser humano ha ocasionado en los últimos años. Es importante en este sentido estudiar la respuesta demográfica de las poblaciones a la perturbación y su efecto en la diversidad y estructura genética de especies clave en los ecosistemas. Una gran fracción de la diversidad genética es selectivamente neutral y por lo tanto su distribución está determinada por procesos microevolutivos como la mutación, la migración y la deriva genética. La variación genética se ve afectada por procesos demográficos como la reducción en el tamaño efectivo poblacional y los cuellos de botella de la población, que pueden causar una pérdida importante de potencial evolutivo (Banks *et al.*, 2013).

Por lo anterior, dada la importancia de *Liquidambar styraciflua* como especie clave del BN, en la presente investigación se analizó la diversidad y estructura genética de las poblaciones de los relictos de BN en San Luis Potosí mediante marcadores microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR). Se discuten las implicaciones de los niveles de diversidad genética encontrados y su relación con el disturbio crónico.

## **II. HIPÓTESIS**

Las poblaciones de *Liquidambar styraciflua* en la SMOr de San Luis Potosí presentan niveles saludables de diversidad genética dependientes del nivel de disturbio de las áreas donde se encuentran.

## **III. OBJETIVOS**

### 3.1. Objetivo general

Conocer la diversidad y estructura genética de las poblaciones de *Liquidambar styraciflua* en el bosque de niebla de la Sierra Madre Oriental en el estado de San Luis Potosí y su relación con el disturbio crónico.

### 3.2. Objetivos específicos

Evaluar la diversidad genética dentro y entre poblaciones de *Liquidambar styraciflua* en diferentes localidades de bosque de niebla en el estado de San Luis Potosí.

Determinar cuáles son las poblaciones con mayor diversidad genética y si está correlacionado con el nivel de disturbio crónico de los fragmentos de bosque de niebla y su conectividad.

Proponer poblaciones como posibles áreas semilleras para la producción de plántulas para restauración de áreas perturbadas.

## IV. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Ubicación de las poblaciones y colecta de muestras

Se eligieron seis poblaciones de *Liquidambar styraciflua* en fragmentos conservados de BN ubicados en los municipios de Xilitla, Tamasopo, El Rayón, Alaquines, El Naranjo y Rioverde (Cuadro 1, Figura 4). Cada muestra consistió de 22 a 25 individuos elegidos al azar por cada población, empleando el método del individuo más cercano con una distancia mínima de 50 m entre sí. De la sección media de la copa de cada árbol se colectó tejido foliar joven y en buen estado (ausente de plagas y herbivoría). Las muestras se preservaron con sílica gel como agente desecante y se transportaron al Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, donde fueron almacenados para su conservación en un ultracongelador a -80 °C.

**Cuadro 1.** Descripción de las poblaciones de *Liquidambar styraciflua*. NR: La Nueva Reforma; MO: Maguey de Oriente; CP: Copalillos; LF: Las Flores; MM: Miramar; CC: Cerro La Cruz.

<b>Municipio</b>	<b>Localidad</b>	<b>Precipitación (mm)</b>	<b>Latitud Norte (UTM)</b>	<b>Longitud Oeste (UTM)</b>	<b>Altitud (msnm)</b>
Alaquines	NR	1,000-1,200	447449.00	2448264.00	1,435
El Naranjo	MO	1,000-1,200	456719.00	2481920.00	1,000
Tamasopo y Rayón	CP	1,000-1,200	453387.00	2416524.00	1,273
Xilitla	LF	1,500-2,000	491816.00	2372065.00	1,538
	MM	1,500-2,000	494456.00	2365230.00	1,574
Rioverde	CC	1,000-1,200	376136.00	2424524.00	1,390



**Cuadro 2.** Loci microsatélite y secuencia de los primers. HWI: sin loci definido.

<b>Locus</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Repetición de motivos</b>	<b>Cita</b>
LF 3	Forward: 5'-TGCGAATCACTGGTCTGAATCA-3' Reverse: 5'-TCCAACAAGTCAACAACAGCA-3'	(TCT)8	
LF 17	Forward: 5'-TCTGGTTATCTCGGGGCAAC-3' Reverse: 5'-TGTCACCAATCTGCCGGAA-3'	(GCC)6	
LF 19	Forward: 5'-TAGAACGCCGACTCAAGTGG-3' Reverse: 5'-AAGTTGTTCTGGGCATGGCA-3'	(GCA)7	<i>Liquidambar formosana</i> (Sun et al., 2016)
LF 25	Forward: 5' ACGGACCCATCTTTACCTGC-3' Reverse: 5'-TGATACCTCCCTTCTGGCCA-3'	(TA)8 (GA)6	
LF 37	Forward: 5'-TCGCCTCTGTCCTCTCCTAC-3' Reverse: 5'-ATGTGCCAGATGTGTTCCGT-3'	(AAC)5	
LF 62	Forward: 5'-GGTTGCTCTTGTTGGGTCCT-3' Reverse: 5'-CAGCCTCACTCAGCCAAGAT-3'	(TGA)7	
HWI 1	Forward: 5'-CACTACTCTTCTTTAACCAGACG-3' Reverse: 5'-TCCTCTGTTCTGTAATTGGC-3'	TC	
HWI 2	Forward: 5'-GGAGATCCTTGGCTATGTGC-3' Reverse: 5'-TAGCCACCCATTCATAACCG-3'	AT	
HWI 3	Forward: 5'-AGATCACAAAGAAGGGTGGG-3' Reverse: 5'-CCTATATCCATCAACCTAGAGTCC-3'	AT	
HWI 4	Forward: 5'-CTCAAATTCTCCGCCATCG-3' Reverse: 5'-AACTCCCTGCTTCAACATCG-3'	CT	
HWI 5	Forward: 5'-TGCATTAGTGGGATGTGAGG-3' Reverse: 5'-CGTACTGATGGGAACATAACCG-3'	TA	<i>Liquidambar styraciflua</i> (Carlson, 2015)
HWI 6	Forward: 5'-CCCATATCTCTCAATCCAACC-3' Reverse: 5'-ACTCTCTGTCGGATCTTGGC-3'	CT	
HWI 7	Forward: 5'-CCCTTCAGCAAATAGATGGC-3' Reverse: 5'-CCAATGTGGAACAGCAAGC-3'	AG	
HWI 8	Forward: 5'-GAGGGCATTGGAGGATAGG-3' Reverse: 5'-GGATGGACCCAAGTTACAGC-3'	AG	
HWI 9	Forward: 5'-AAGTGTGTTGCCTCCAACG-3' Reverse: 5'-CACAATCACTCCTCCCAAGG-3'	GA	
HWI 10	Forward: 5'-TGGAAGCACAGAAGAGAACC-3' Reverse: 5'-GGTCAACTTCTCCGACAGC-3'	AG	
Plms 17	Forward: 5'-GGAGAAAGAGAAGAAGGAGAAAAA-3' Reverse: 5'-AGGGTCTTGCTCGTGATTTG-3'	(CA)8	
Plms 68	Forward: 5'-TGAATCCCAAAAGGCAAAAA-3' Reverse: 5'-AAACACCCAATCCGGTCTAC-3'	(GT)8 (AT)2 (GT)5	<i>Platanus</i> (Lang, 2010)

Plms 92	Forward: 5'-TCCTTACATCTTTGCCACA-3' Reverse: 5'-CCCATGAACCTCTCTGATCC-3'	(GA)4 (GT)5
Plms 109	Forward: 5'-TGATGACAAATACTCAGGGAAA-3' Reverse: 5'-CGATAGCCAAAAGCGAAAGA-3'	(CA)18
Plms 113	Forward: 5'-GGCAAGCCAGGATTTAGTTG-3' Reverse: 5'-CGGGATAAGAGTTTGTGAGTTG-3'	(CT)11(CA)16
Plms 176	Forward: 5'-AACAGCAAAACAGCCCACTC-3' Reverse: 5'-AAACCAGCCAATCCAATTCC-3'	(CA)9

---

Las amplificaciones de PCR se realizaron en volúmenes de reacción de 25  $\mu$ L como sigue: 50 ng de ADN genómico (1  $\mu$ L), buffer *Taq* DNA polimerasa con  $Mg^{2+}$  10x (2.5  $\mu$ L), desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) 10 mM (0.5  $\mu$ L), iniciador forward 10  $\mu$ M (0.5  $\mu$ L), iniciador reverse 10  $\mu$ M (0.5  $\mu$ L), *Taq* DNA polimerasa 5 unidades por  $\mu$ L (0.2  $\mu$ L) y al final se aforó a 25  $\mu$ L con H<sub>2</sub>O estéril (Sambrook y Russell, 2001). Todas las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador T100 de Bio-Rad<sup>TM</sup> bajo el siguiente programa: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineamiento por 30 s de 56 a 59 °C y extensión de 72 °C por 30 s y 72 °C por 5 min para la extensión final.

Los amplicones fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2%, corridos en TBE 1x (Buffer Tris, Boratos-EDTA) a 80 Volt/45 min y en geles de poliácridamida al 12% corridos en TBE 0.5% a 80 Volt/180 min. Las bandas fueron genotipadas por su presencia/ausencia en cada locus y los tamaños de los alelos fueron registrados usando el software GelAnalyzer 2010a (Lazar, 2010), dichos tamaños fueron estandarizados con el software Allelogram 2.2 (Manaster, 2009). De los 22 pares de iniciadores analizados tan solo 15 fueron seleccionados por ser específicos para la especie al mostrar los tamaños esperados y mayor polimorfismo.

#### 4.4. Análisis de los datos

Con los datos obtenidos se realizó un análisis polimórfico para todos los loci SSR, y se determinó el número de alelos observados por locus ( $N_a$ ), número de alelos efectivos por locus ( $N_e$ ), índice de información de Shannon ( $I$ ), heterocigosidad observada ( $H_o$ ), heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), alelos privados ( $A_p$ ), así como la estructura genética de la población empleando los parámetros estadísticos F de Wright, coeficiente de endogamia en el nivel de la población ( $F_{IS}$ ), coeficiente de endogamia en poblaciones totales ( $F_{IT}$ ), proporción de diferenciación entre poblaciones ( $F_{ST}$ ), tasa de migración ( $m$ ), usando el software GenAlEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2012).



La distancia genética entre poblaciones se calculó con el índice de distancia genética de *Nei* (1978), mediante una matriz realizada en el programa GenAlEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2012), posteriormente se realizó una agrupación por el método de UPGMA en el programa Mega versión 6.0 (Tamura *et al.* 2013) para visualizar la similitud entre poblaciones, así como un análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en estimaciones pareadas. La matriz de distancia para todas las poblaciones se calculó con el método de distancia estandarizada en GenAlEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2012). Se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) dentro y entre poblaciones para cuantificar de forma adicional el nivel de estructura genética con base en una matriz euclidiana en el programa Arlequin versión 3.5 con 10,100 permutaciones para garantizar la precisión de la estimación de los componentes de la varianza (Excoffier y Lischer, 2010).

La estructura genética de la población total de 145 individuos fue analizada con los alelos detectados por los 15 marcadores genéticos de SSR usando el software STRUCTURE 2.3.3. (Pritchard *et al.*, 2009) con información previa sobre las poblaciones (modelo LOCPRIOR) basado en un análisis de agrupamiento bayesiano ampliado. Las deltas K fueron desarrolladas para evaluar la estructura de la población bajo diferentes rutinas de simulación. Se usó un modelo con 10 interacciones por valor de K que variaba de 1 a 7 y asumiendo frecuencias alélicas correlacionadas de 10,000 repeticiones por el método de Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) y un periodo de 100,000 interacciones. Se consideró la altura del valor Delta K como un indicador de la intensidad de la señal detectada por el análisis estructural (Evanno *et al.* 2005). Para la visualización del gráfico de los resultados, se utilizó Cluster Markov Packager Across K (CLUMPAK). Se realizó una prueba de Mantel en XLSTAT 2018 para conocer la correlación entre la distancia genética (*Nei*) y la distancia geográfica (Km) entre poblaciones (Mantel, 1967).

#### 4.5. Índice de disturbio crónico

Con el fin de evaluar el impacto del disturbio sobre la diversidad genética de las poblaciones analizadas, se determinó el índice de disturbio crónico (IDC) antrópico en los fragmentos de BN donde se ubican las seis poblaciones de *Liquidambar styraciflua*, empleando el método de Martorell y Peters (2005; 2008) y Hernández-Oria *et al.* (2006). Este índice considera 14 indicadores de tres agentes de disturbio (actividades humanas, ganadería y deterioro del hábitat). Para calcular el IDC se realizaron cuatro transectos distribuidos al azar con dirección norte-sur, de 50 m de largo por uno de ancho por fragmento de bosque y se midieron los siguientes parámetros:

## A) Actividades humanas

Fracción de plantas macheteadas (MACH): número de árboles y arbustos con evidencia de haber sido cortados o talados en comparación con el total (plantas macheteadas/plantas totales).

Evidencia de incendio (INCE): evidencia de un incendio reciente, con “1” o “0” si existió o no existió respectivamente.

Cobertura de caminos humanos (CCHU): se midió y sumo el ancho de los caminos humanos que se interceptan con el transecto, la suma de la intercepción de los caminos se dividió entre la distancia del transecto.

Cercanía a poblaciones (POBL): se registró la distancia entre el centro de la zona de estudio y el borde de la población más cercana en kilómetros ( $1/\text{distancia}$ ). Cuando la distancia fue menor a un kilómetro el valor dado fue uno.

Adyacencia a núcleos de actividad (ADYA): número de sitios registrados a menos 200 m de distancia a actividades humanas tales como cultivos agrícolas, ganadería, carreteras asfaltadas o asentamientos humanos, dividido entre el número de sitios totales.

Cambio de uso del suelo (USOS): se registró la fracción de la superficie del bosque de niebla ocupada con agricultura, ganadería, minas y asentamientos humanos, la cual fue dividida entre el área total del bosque.

## B) Ganadería

Densidad de excretas de cabra u oveja (CBR): se registró la presencia o ausencia de excretas en 10 cuadros de  $1\text{ m}^2$  elegidos al azar a lo largo del transecto y se dividió entre el número total de cuadros del transecto.

Densidad de excretas de ganado mayor (GAN): se calculó igual que la anterior, pero se incluyeron excretas de vacas, caballos y burros.

Fracción de plantas ramoneadas (RAMO): Se consideraron evidencias de herbívora en plantas perenes, divididas entre el número total de plantas en el sitio.

Caminos ganaderos (CGAN): número de caminos hechos por el ganado a lo largo del transecto, sin considerar caminos menores a 5 m de largo, ni los realizados por la gente.

Compactación del suelo por ganado (COMP): este parámetro se evaluó mediante la medición de la velocidad de infiltración entre la intercepción del camino ganadero con el transecto y un área

sin compactación, en ambos lugares se enterró 4 cm de un tubo de PVC de 10 cm de diámetro y se vertió 250 ml de agua y registró el tiempo de infiltración.

### C) Deterioro del hábitat

Erosión (EROS): fueron seleccionados 20 puntos al azar sobre el transecto y registró la erosión debida a arrastre de material por el agua, cárcavas y exposición del material parental por casusas humanas.

Islas de vegetación (ISLA): los procesos erosivos severos ocasionan pequeños montículos de suelo cubierto por vegetación. Cuando la erosión se observó en más de la mitad de la superficie su valor fue de “1” y “0” si fue menos de la mitad.

Área de la superficie totalmente modificada (STOM): se midió en el transecto el área modificada por los humanos y se dividió entre la superficie del transecto.

Con los coeficientes de cada parámetro del IDC se realizó un análisis de componentes principales (ACP), posteriormente las cargas obtenidas por los parámetros de los componentes 1 y 2 se multiplicaron con sus respectivos porcentajes de variación y se sumó el producto de ambos componentes, para obtener los coeficientes que describen la fórmula del IDC. Así mismo, fue sustituida la incógnita de cada parámetro en la formula y se sumó para obtener el valor del IDC por localidad. Los parámetros que no presentaron variación fueron descartados como se sugiere en estudios previos (Martorell y Peters, 2005; Hernández-Oria *et al.*, 2006; Rubio-Méndez *et al.*, 2018). Para conocer los niveles de clases de disturbio de los fragmentos estudiados se utilizó la regla de Sturges (1926), mediante la fórmula:  $K = 1 + 3.322 \log n$ ; donde  $K$  es el número de clases y  $n$  es el número de fragmentos de bosques evaluados, posteriormente se calculó el rango total, mediante la diferencia entre el valor máximo y valor mínimo del disturbio crónico entre fragmentos, finalmente la amplitud fue calculada dividiendo el valor del rango entre el número de clases.

Con el índice de disturbio reportado para cada población se determinó la correlación de Pearson ( $r$ ) que existe con respecto al índice de información de Shannon ( $I$ ), heterocigosis observada ( $H_o$ ) y coeficiente de endogamia en el nivel de la población ( $F_{IS}$ ), para conocer el efecto del disturbio en los parámetros de diversidad y estructura genética.

## V. RESULTADOS

### 5.1. Diversidad genética

Un total de 142.667 alelos fueron generados por 15 loci SSR en todas las muestras. El número de alelos observados ( $N_a$ ) por locus varió de 4.5 (HWI 9) a 14.667 (HWI 2) con una media de 9.511, mientras que el número de alelos efectivos ( $N_e$ ) por locus varia de 3.107 (HWI 9) a 10.184 (HWI 2) con un valor promedio de 6.323. El índice de información de Shannon ( $I$ ) tuvo un promedio de 1.884 con un intervalo de 1.211 (HWI 9) a 2.463 (HWI 2). La heterocigosis observada ( $H_o$ ) y heterocigosis esperada ( $H_e$ ) fue de 0 (LF 17, LF 62 y HWI 9) a 0.979 (HWI 5 y HWI 6) y 0.633 (HWI 9) a 0.894 (HWI 2), con una media de 0.548 y 0.793, respectivamente. La  $H_o$  fue mayor que la  $H_e$  en los loci HWI 2, HWI 4, HWI 5, HWI 6 y HWI 10 (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Análisis polimórfico de 15 Loci SSR.  $N_a$ : número de alelos observados;  $N_e$ : número de alelos efectivos;  $I$ : índice de información de Shannon;  $H_o$ : heterocigosis observada;  $H_e$ : heterocigosis esperada;  $F_{IS}$ : coeficiente de endogamia en el nivel de la población;  $F_{IT}$ , coeficiente de endogamia en poblaciones totales;  $F_{ST}$ : proporción de diferenciación entre poblaciones;  $m$ : tasa de migración.

Locus	$N_a$	$N_e$	$I$	$H_o$	$H_e$	$F_{IS}$	$F_{IT}$	$F_{ST}$	$m$
LF 17	7.167	5.188	1.738	0.000	0.789	1.000	1.000	0.075	3.067
LF 19	12.167	7.672	2.176	0.548	0.855	0.359	0.402	0.067	3.488
LF 25	11.667	7.227	2.121	0.669	0.845	0.208	0.277	0.087	2.611
LF 37	5.333	3.767	1.386	0.028	0.698	0.961	0.966	0.143	1.496
LF 62	4.667	3.595	1.322	0.000	0.690	1.000	1.000	0.181	1.129
HWI 1	14.333	9.039	2.321	0.765	0.865	0.115	0.175	0.067	3.465
HWI 2	14.667	10.184	2.463	0.931	0.894	-0.042	-0.009	0.031	7.724
HWI 3	10.333	7.564	1.791	0.321	0.699	0.541	0.650	0.238	0.800
HWI 4	9.667	6.960	2.050	0.952	0.852	-0.117	-0.026	0.081	2.838
HWI 5	10.833	6.624	2.024	0.979	0.827	-0.184	-0.084	0.084	2.718
HWI 6	9.333	6.583	2.003	0.979	0.843	-0.161	-0.049	0.096	2.355
HWI 7	11.167	6.966	2.112	0.822	0.851	0.034	0.084	0.052	4.600
HWI 8	7.000	3.519	1.473	0.302	0.705	0.572	0.652	0.186	1.091
HWI 9	4.500	3.107	1.211	0.000	0.633	1.000	1.000	0.082	2.807
HWI 10	9.833	6.843	2.065	0.919	0.853	-0.077	-0.005	0.067	3.471
Media	9.511	6.323	1.884	0.548	0.793	0.349	0.402	0.103	2.911

Los resultados mostraron que el 100% de los loci fueron polimórficos para cinco poblaciones (LF, MM, CP, MO y NR) y un 93.33% para CC. El valor más bajo de  $N_a$  fue de 7.333 (CC) y el más alto fue de 11 (LF y CP), así mismo el valor más bajo de  $N_e$  fue de 5.127 (CC) y más alto de 7.367 (LF). El valor más alto de  $I$  se encontró en CP, seguido por LF y NR. El valor más bajo de  $H_o$  se registró en CC (0.405), a diferencia del resto de las poblaciones que mostraron valores similares de  $H_o$ . La  $H_e$  estuvo por arriba de la  $H_o$ , los valores más altos se encontraron en CP, NR y LF, mientras que el valor más bajo fue para CC. Los alelos privados en promedio de todas las poblaciones fueron de 1.552, siendo más alta en las poblaciones LF seguida por CP y más baja en MM (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Diversidad genética de seis poblaciones de *Liquidambar styraciflua* mostrados por SSR. % LP: porcentaje de loci polimórfico;  $N_a$ : número de alelos observados;  $N_e$ : número de alelos efectivos;  $I$ : índice de información de Shannon;  $H_o$ : heterocigosis observada;  $H_e$ : heterocigosis esperada;  $F_{IS}$ : coeficiente de endogamia en el nivel de la población;  $A_p$ : alelos privados.

Población	% LP	$N_a$	$N_e$	$I$	$H_o$	$H_e$	$F_{IS}$	$A_p$
LF	100	11.000	7.367	2.017	0.596	0.819	0.319	2.542
MM	100	8.667	5.492	1.715	0.547	0.745	0.351	0.583
CC	93.33	7.333	5.127	1.618	0.405	0.724	0.483	0.909
CP	100	11.000	7.334	2.073	0.570	0.834	0.344	2.160
MO	100	8.800	5.869	1.876	0.590	0.810	0.289	1.720
NR	100	10.267	6.747	2.003	0.578	0.828	0.317	1.400
Media	98.89	9.511	6.323	1.884	0.548	0.793	0.349	1.552

## 5.2. Diferenciación y estructura genética de las poblaciones

El coeficiente de endogamia dentro de las poblaciones ( $F_{IS}$ ) por locus varió de -0.042 (HWI 2) a 1.0 (LF 17, LF 62 y HWI 9) con una media de 0.349 (Cuadro 3), mientras que entre poblaciones presentaron valores similares de  $F_{IS}$  que variaron de 0.483 a 0.289 para CC y MO, respectivamente (Cuadro 4), lo que muestra una moderada heterocigosidad dentro de las poblaciones. Sin embargo, resalta una alta heterocigosidad en cinco loci: HWI 2, HWI 4, HWI 5, HWI 6 y HWI 10. Además, el coeficiente de endogamia en las poblaciones totales ( $F_{IT}$ ) varió de -0.005 (HWI 10) a 1.0 (LF 17,

LF62 y HWI 9) con un promedio de 0.402. Por otra parte, la diferenciación genética entre las poblaciones ( $F_{ST}$ ) varió de 0.031 (HWI 2) a 0.238 (HWI 3) con una media de 0.103, lo cual indica un nivel moderado de diferenciación genética entre las poblaciones de *Liquidambar styraciflua*, la migración de alelos varió de 0.8 (HWI 3) a 7.724 (HWI 2) con una media de 2.911 (Cuadro 3).

El análisis de varianza molecular (AMOVA) para cuantificar la diversidad genética entre y dentro de las poblaciones mostró que el 90.36% de la variación genética total se ubica entre individuos dentro de la población, mientras que solo el 9.64% se ubica entre poblaciones (Cuadro 5).

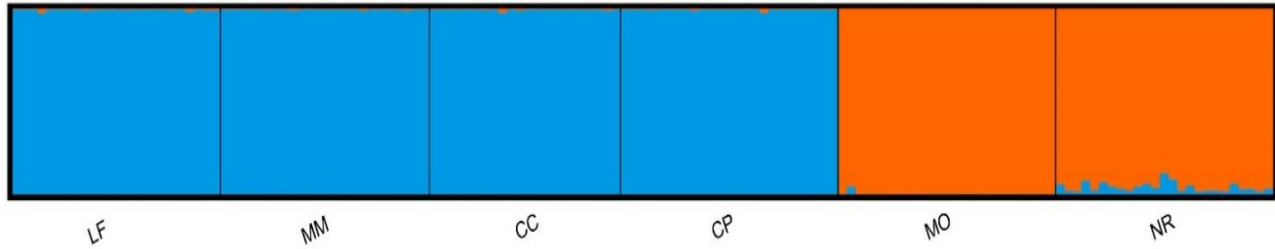
**Cuadro 5.** Análisis de varianza molecular (AMOVA) en seis poblaciones de *Liquidambar styraciflua*

<b>Fuente de variación</b>	<b>d.f.</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Varianza de componentes</b>	<b>Porcentaje de variación (%)</b>	<b>P</b>
Entre poblaciones	5	144.908	0.50235	9.64	<0.001
Dentro de poblaciones	139	1337.830	4.7167	90.36	<0.001
Total	144	1482.738	5.21302		

Los marcadores moleculares SSR en las seis poblaciones sugieren la existencia de un alto grado de variabilidad genética entre individuos dentro de las poblaciones, y un moderado nivel de diferenciación genética entre las seis poblaciones estudiadas.

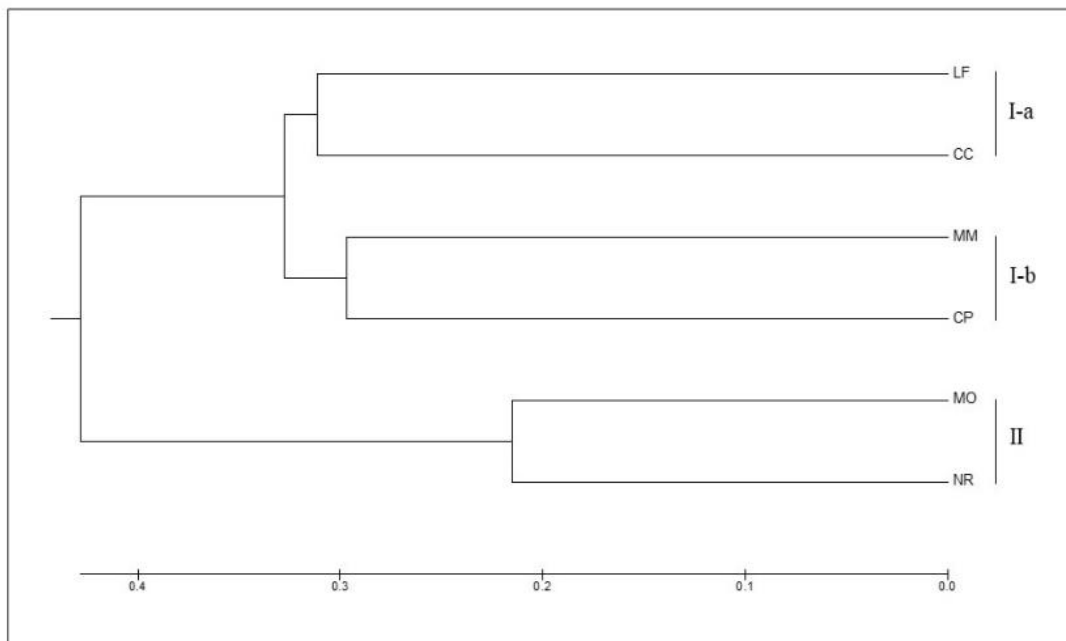
### 5.3. Relaciones genéticas y patrones de variación geográfica

El análisis de estructura genética de la población, determinada a través del programa STRUCTURE 2.3.3 mostró que el pico más alto (Delta  $K= 94.992$ ) está en el valor  $K= 2$ , con dos grupos genéticos en las seis poblaciones (Figura 5), lo que indica diferentes grados de introgresión entre las poblaciones.

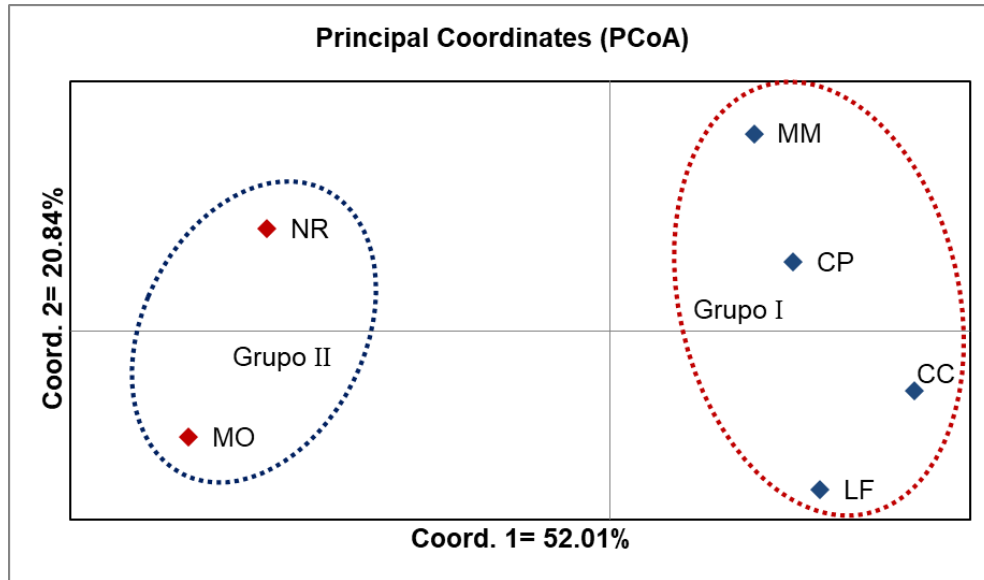


**Figura 5.** Estructura de poblaciones inferidas de *Liquidambar styraciflua* en San Luis Potosí con el programa STRUCTURE 2.3.3 ( $K=2$ ). Cada individuo es representado por una sola línea vertical, dividido en segmentos de colores en proporción al grupo que pertenece: azul para el grupo 1 y naranja para el grupo 2.

El dendograma resultado del UPGMA muestra la similitud genética entre las poblaciones analizadas basado en la distancia genética de *Nei* (Figura 6). Las seis poblaciones fueron agrupadas en dos ramas, las cuales son esencialmente idénticos a los determinados por el análisis de STRUCTURE (Figura 5) y el de coordenadas principales (PCoA) (Figura 7). La rama I comprende a dos sub-ramas, la sub-rama I-a comprende a las poblaciones LF y CC, la sub-rama I-b comprende a las poblaciones MM y CP, mientras que la rama II integra a las poblaciones MO y NR.

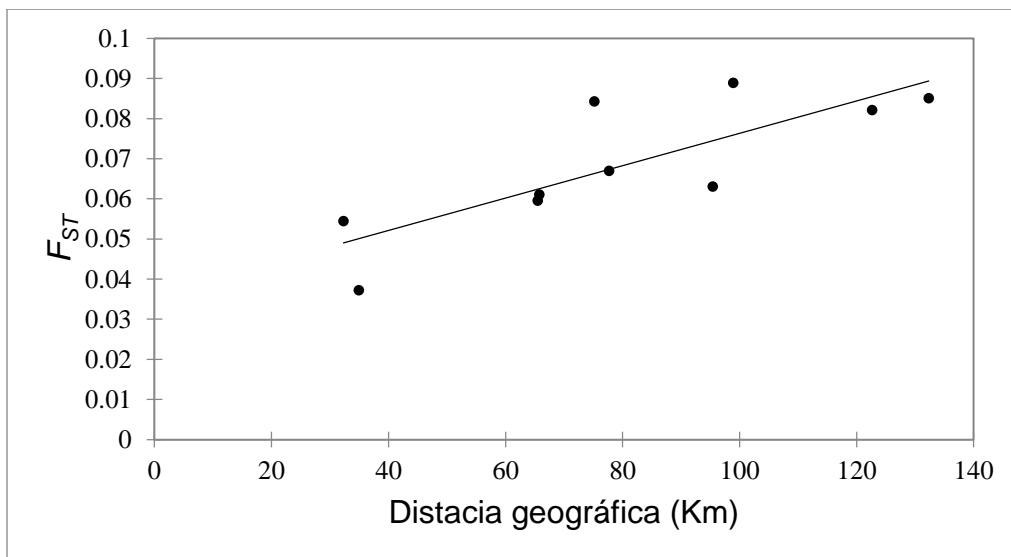


**Figura 6.** Dendograma de UPGMA que muestra las relaciones de las poblaciones de *Liquidambar styraciflua* en San Luis Potosí, basado en distancia genética de *Nei*.



**Figura 7.** Análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en estimaciones pareadas de distancia genética para todas las poblaciones. Porcentajes de la varianza total explicada por las coordenadas 1 y 2 con valores de 52.01% y 20.84%, respectivamente.

La prueba de Mantel reveló que existe correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica en *Liquidambar styraciflua* ( $r= 0.808$ ,  $p= 0.005$ ; Figura 8), con índices de  $F_{ST}$  menores entre poblaciones geográficamente cercanas.



**Figura 8.** Relación entre distancia genética y distancia geográfica ( $r= 0.808$ ;  $R^2= 0.653$ ;  $p= 0.005$ ) para seis poblaciones.



#### 5.4. Índice de disturbio crónico y su correlación con los índices de diversidad genética

El análisis de componentes principales (ACP) descartó la frecuencia de incendio (INCE), el cambio de uso de suelo (USOS), la fracción de plantas ramoneadas (RAMO) y la presencia de islas (ISLA), debido a que no mostraron variación en los sitios muestreados. Los componentes 1 y 2 explicaron el 76 y 10% de la variación de todos los parámetros respectivamente. Los parámetros que tuvieron mayor impacto en el componente 1 fueron POBL, ADYA, EROS y STOM, mientras que en el componente 2 fueron ADYA y STOM (Cuadro 6).

**Cuadro 6.** Valores de los componentes principales 1 y 2 para los parámetros del disturbio crónico. RAMO: fracción de plantas ramoneadas; GAN: densidad de excretas de ganado mayor; CGAN: caminos ganaderos; COMP: compactación del suelo por ganado; MACH: fracción de plantas macheteadas; CCHU: cobertura de caminos humanos; POBL: cercanía a poblaciones; ADYA: adyacencia a núcleos de actividad; EROS: erosión; STOM: superficie totalmente modificada.

	CP 1	CP 2
Ganadería		
RAMO	0.016	-0.012
GAN	0.138	0.116
CGAN	0.021	-0.014
COMP	0.144	-0.003
Actividades humanas		
MACH	0.120	0.122
CCHU	0.022	-0.032
POBL	0.627	-0.723
ADYA	0.654	0.619
Deterioro del hábitat		
EROS	0.283	-0.101
STOM	0.209	0.231

El IDC obtenido a partir del ACP, se calculó en base a la fórmula,  $IDC = 1.13RAMO + 11.64GAN + 1.47CGA + 10.93COMP + 10.33MACH + 1.31CCHU + 40.34 POBL + 55.97ADYA$

+ 20.44 EROS + 18.18STOM. Con lo que se logró obtener el valor de contribución de cada parámetro de disturbio por localidad.

De acuerdo con el análisis de IDC los parámetros con el más alto efecto en el disturbio crónico total fueron la adyacencia a núcleos de actividad (ADYA), la cercanía a poblaciones (POBL), erosión (EROS) y la superficie totalmente modificada (STOM). Estos parámetros corresponden a actividades humanas, que resaltan de las actividades ganaderas y el deterioro del hábitat. Los sitios con los valores más altos de IDC son Copalillos, Maguey de Oriente y Miramar (Cuadro 7).

En orden decreciente, los parámetros más importantes son la adyacencia a núcleos de actividad (ADYA), la cercanía a poblaciones (POBL), la erosión (EROS), la superficie totalmente modificada (STOM), la presencia de caminos ganaderos (CGAN), la fracción de plantas macheteadas (MACH), la cobertura de caminos humanos (CCHU), la compactación del suelo por ganado (COMP), la densidad de excretas de ganado mayor (GAN) y la fracción de plantas ramoneadas (RAMO).

**Cuadro 7.** Valores del índice de disturbio crónico para los sitios estudiados en los BN de San Luis Potosí. POB: población; RAMO: fracción de plantas ramoneadas; MACH: fracción de plantas macheteadas; GAN: densidad de excretas de ganado mayor; CGAN: caminos ganaderos; CCHU: cobertura de caminos humanos; COMP: compactación del suelo por ganado; POBL: cercanía a poblaciones; ADYA: adyacencia a núcleos de actividad; EROS: erosión; STOM: superficie totalmente modificada.

	POB	RAMO	MACH	GAN	CGAN	CCHU	COMP	POBL	ADYA	EROS	STOM	Disturbio total
LF	0.000	0.000	0.000	0.352	0.133	0.020	0.578	0.000	0.000	0.000	0.000	28.777
MM	0.000	0.000	0.000	0.439	0.150	0.040	1.000	0.333	0.350	0.350	0.040	73.495
CC	0.000	0.100	0.020	0.301	0.000	0.040	0.840	0.000	0.000	0.000	0.000	38.643
CP	0.000	0.200	0.020	0.380	0.160	0.040	1.000	0.667	0.200	0.200	0.200	93.809
MO	0.050	0.100	0.040	0.637	0.150	0.040	0.971	0.333	0.100	0.100	0.200	73.556
NR	0.000	0.000	0.000	0.368	0.040	0.020	0.353	0.000	0.000	0.000	0.000	18.920

Los niveles de disturbio generados mediante la regla de Sturges tuvieron una amplitud de rango de 19 (18.722), lo que generó cuatro niveles de disturbio (Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Niveles de disturbio a partir de la regla de Sturges. I: bajo (18-37); II: medio (38-57); III: alto (58-77) y IV: muy alto (78-97).

<b>Población</b>	<b>Índice de disturbio</b>	<b>Nivel de disturbio</b>
LF	28.777	I: bajo
MM	73.495	III: alto
CC	38.643	II: medio
CP	93.809	IV: muy alto
MO	73.556	III: alto
NR	18.920	I: bajo

La prueba de correlación de Pearson ( $r$ ) mostró que no existe correlación entre  $I$ ,  $H_o$ ,  $He$  y  $F_{IS}$  y el índice de disturbio crónico por presentar valores de  $r$  muy bajos e incluso negativos (Cuadro 9). Esto indica que el disturbio crónico no afecta ni a la diversidad ni a la estructura genética de las poblaciones de *Liquidambar styraciflua* en los relictos de BN analizados.

**Cuadro 9.** Correlación de Pearson entre el índice de disturbio crónico e índices diversidad genética

<b>Parámetros</b>	<b><math>I</math></b>	<b><math>H_o</math></b>	<b><math>He</math></b>	<b><math>F_{IS}</math></b>
Pearson ( $r$ )	0.023105	0.15015	0.029225	-0.21593
$R^2$	0.00053385	0.022545	0.00085412	0.046624

## VI. DISCUSIÓN

### 6.1. Diversidad, estructura y flujo genético

*Liquidambar styraciflua* es una especie con una distribución amplia en el BN dentro de la SMOr, tiene un desarrollo rápido que le permite alcanzar la madurez sexual a los 20 años y su polinización es anemófila cruzada (Sosa, 1978; Morris *et al.*, 2009). Dichas características propias de la especie pueden promover un alto flujo genético que incrementa la diversidad genética y reduce la estructura genética de las subpoblaciones. Los resultados aquí presentados revelan una alta diversidad genética en las poblaciones analizadas para la especie ( $I= 1.884$  y  $H_o=$  de 0.548), mucho mayor a lo reportado para *L. formosana* en China ( $I= 0.8178$ ;  $H_o= 0.409$ ; Sun *et al.*, 2016) y otras especies arbóreas de BN como *Oreopanax xalapensis* en los Altos de Chiapas ( $I= 0.567$ ;  $H_o= 0.382$ ; Ruiz-Montoya *et al.*, 2011), en las que también se utilizaron marcadores SSR. Morris *et al.* (2008) indican, basados en el registro de polen fósil, que las poblaciones de *L. styraciflua* se establecieron en el territorio mexicano desde el Mioceno (ca. 8.34 Ma); sus poblaciones quedaron divididas por el Cinturón Volcánico Trans-Mexicano durante el Plioceno al Cuaternario (ca. 3.6 Ma) (Ruiz-Sanchez y Ornelas; 2014) lo que pudo generar estructura genética a gran escala pero no a nivel regional como lo reportado aquí. Previamente, se ha considerado que las poblaciones mexicanas de *L. styraciflua* han resguardado una alta diversidad genética a nivel regional debido al bajo impacto de las contracciones y expansiones glaciares durante el Pleistoceno (Morris *et al.*, 2008).

La distribución de *Liquidambar styraciflua*, aunque aislada por parches fragmentados, es continua a nivel regional y puede ser maximizada por la polinización anemófila cruzada que incrementa el flujo genético entre dichos parches. Esto concuerda con el modelo de aislamiento por distancia descrito por Aguirre (2007), en donde la probabilidad de flujo génico disminuye al incrementarse la distancia. En general el cruzamiento aleatorio y un sistema de apareamiento autoincompatible ocasionado por la diferenciación en las tasas de maduración del gineceo y androceo, producen un nivel notable de variación genética dentro de la población (Wisniewski y Bogle, 1982). En el presente estudio el valor promedio de  $F_{ST}$  fue 0.103, esto indica un valor moderado de diferenciación genética entre poblaciones, lo cual fue sustentado por el AMOVA el cual indica que existe una variación entre poblaciones de 9.64% y de 90.36% entre individuos. Esto contrasta con lo reportado para poblaciones de *L. formosana* en China con  $F_{ST}= 0.075$  donde se encontró 5.98% de variación entre poblaciones y 94.02% entre individuos dentro de la población

(Sun *et al.*, 2016), y lo reportado para *L. orientalis* con una alta similitud genética entre poblaciones (83.1%) mediante marcadores RAPD (Albayrak y Arican, 2009). Un valor moderado de diferenciación genética entre poblaciones de especies de bosques templados fue reportado por Lang (2010) para tres especies del genero *Platanus* con  $F_{ST}= 0.203$  (*Platanus orientalis*, *P. occidentalis* y *P. racemosa*). La moderada diferenciación genética en especies arbóreas como *L. styraciflua* parece ser un efecto del alto flujo de genes, el cual puede ser resultado del tipo de polinización anemófila y la dispersión de semillas por aves y ardillas (Morris *et al.*, 2008), misma que puede ser también congruente con la historia de la fragmentación y perturbación de los bosques en que crecen.

Las seis poblaciones de *Liquidambar styraciflua* analizadas en el presente estudio forman dos grupos genéticos bien definidos (Figura 4). El grupo I presentó valores altos de diversidad genética y se distribuye en el sureste del Estado de San Luis Potosí donde se encuentran los BN mejor conservados. En este grupo se encuentran las poblaciones LF ( $Ne=7.367$ ;  $Ap= 2.542$ ) y CP ( $Ne= 7.334$ ;  $Ap= 2.160$ ) que poseen el mayor número de alelos efectivos y privados. Las poblaciones de LF y CC, a pesar de separarse por una distancia geográfica mayor, forman el grupo genético (Ia) con un número importante de alelos compartidos y un alto flujo genético.

## 6.2. Disturbio e indicadores de diversidad genética

Se ha estimado que para México se han perdido entre 189,000 y 501,000 ha de bosques tropicales y entre 127,000 y 167,000 ha de bosques templados (Mesera *et al.*, 1997). La transformación de las vegetaciones naturales de México a zonas agrícolas ocurrió entre las décadas de 1970 y 1990 (Challenger, 1998). En 1973 el BN en San Luis Potosí se extendía sobre una superficie de 6,107 ha, misma que se redujo a 3,239 ha para el 2007; esto significa que en los últimos 34 años se deforestaron 2,868 ha (ca. 46%). De todos los relictos de bosque analizados, únicamente cinco conservan menos del 50% de la superficie registrada en 1973, y solo el relictos de la Nueva Reforma en Alaquines mantiene más del 80% de su extensión original. Las principales causas de su reducción y fragmentación son el disturbio generado por la conversión a potreros, el incremento de áreas agrícolas y la tala ilegal de árboles (Leija *et al.*, 2011). Esta fragmentación provoca el aislamiento de las metapoblaciones, lo que afecta la biodiversidad y por ende a los servicios ambientales que estos ecosistemas proporcionan.

Los resultados aquí presentados demuestran que los parámetros de disturbio crónico con mayor impacto en el disturbio total de los sitios estudiados corresponden principalmente a las actividades humanas (ADYA, POBL, EROS, STOM, CGAN, MACH, CCHU, COMP, GAN y RAMO). Los sitios de las poblaciones nivel bajo de IDC (NR y LF) presentan una actividad antropogénica casi nula a diferencia del resto de las poblaciones. En el sitio con un valor medio de IDC (CC), el disturbio está asociado con el macheteo de plantas y la ganadería. En los sitios con IDC alto (MM y MO) y muy alto (CP), el disturbio se asocia con actividades humanas como la ganadería, la construcción de caminos, y la erosión. A pesar de que todos los relictos de BN analizados aquí presentan un nivel de disturbio que incrementa el efecto de la fragmentación, el disturbio de baja y media intensidad pueden beneficiar el establecimiento de especies pioneras como es el caso de *Liquidambar styraciflua*. El aseguramiento de buenos niveles de diversidad genética en este tipo de especies incrementa su potencial para la restauración ecológica en terrenos degradados (Martorell y Peters, 2008; Pedraza y Willians, 2003).

Las pruebas de correlación de Pearson realizadas no detectaron un efecto del nivel de disturbio (IDC) sobre los índices de diversidad y estructura genética ( $I$ ,  $H_o$ ,  $H_e$  y  $F_{IS}$ ) de las poblaciones de *Liquidambar styraciflua* analizadas. Es posible que en este caso una fracción de la diversidad genética permanezca selectivamente neutra a los cambios generados por el disturbio, mientras que otros procesos evolutivos como la mutación, la migración y deriva genética tengan mayor efecto en el mantenimiento de la diversidad genética frente al disturbio, como previamente ha sido sugerido (ej. Banks *et al.*, 2013). Por otro lado, Wei y Jiang (2012) sugieren que aunque el disturbio antropogénico relacionado con la fragmentación del hábitat reduce la diversidad genética como resultado de la disminución de la abundancia de la población y sus tasas de inmigración, si dicho disturbio no alcanza un umbral alto su impacto es insignificante. Incluso, si la fragmentación ya ha pasado dicho umbral, el efecto puede retrasarse cientos de años, dependiendo de la longevidad de la especie, hasta un nivel detectable en las poblaciones (Bacles y Jum, 2011), por su parte Fahrig *et al.* (2017; 2019) encontraron que la fragmentación del hábitat (independientemente de su tamaño) genera respuestas ecológicas positivas como la reducción de la competencia intra e interespecífica, estabilidad en las interacciones depredador-presa y parasito-hospedero, mayor complementación del paisaje y mayor diversidad del hábitat, lo que incrementa la abundancia y riqueza de especies. Farwig *et al.* (2008) reportaron poca diferenciación genética entre poblaciones de *Prunus africana* ( $F_{st}$  = 0.032), especie monoica y dominante en el Kakamega Forest, donde el

disturbio comenzó hace 100 años, cuando el bosque era contiguo y podría producirse un amplio flujo de genes. Otro caso es el reportado por Hall *et al.* (1996) en *Pithecellobium elegans* con una diferenciación poblacional moderada ( $F_{ST}= 0.101$ ), asociada a la fragmentación y aislamiento de sus poblaciones que comenzó aproximadamente desde 1950, pero que parece ser contrarrestada por la alta tasa de polinización cruzada de la especie. Es así que la diversidad y estructura genética de las población de *Liquidambar styraciflua* en los relictos de BN del estado de San Luis Potosí parecen no ser tan afectadas por el disturbio, tal resistencia podría ser resultado de su crecimiento y madurez sexual acelerados y su polinización cruzada anemófila a largas distancias, además de su dinámica ecológica pues es una especie de sucesión primaria que aprovecha los espacios abiertos para su distribución.

## VII. IMPLICACIONES PARA LA CONSERVACIÓN DE LOS RECURSOS GENÉTICOS DEL BOSQUE DE NIEBLA

El conocimiento y comprensión de la variabilidad genética de las especies silvestres es de suma importancia tanto para la conservación como para el manejo y aprovechamiento de los recursos naturales con que cuenta el país. La presente investigación demuestra la utilidad de los marcadores moleculares SSR para entender los niveles de polimorfismo, diversidad y estructura genética de una de las especies arbóreas clave más importante dentro de los BN de la SMOr, *Liquidambar styraciflua*. Las poblaciones analizadas incluyen niveles de diversidad genética adecuada y una baja diferenciación genética, por lo que pueden ser utilizadas como fuentes semilleras para futuras estrategias de conservación genéticas *in-situ* y *ex-situ*, y planes de restauración ecológica. Las poblaciones más adecuadas para esto son Las Flores, Copalillos y la Nueva Reforma debido a la presencia de alelos efectivos y alelos privados que incrementan las oportunidades de una mayor adaptación y resistencia a entornos cambiantes. Debido a que la mayor diversidad genética está a nivel de individuos, la selección de árboles individuales sería una forma efectiva para los programas de restauración ecológica.



## VIII. CONCLUSIONES

Los marcadores moleculares microsatélites (SSR) utilizados demostraron ser adecuados para caracterizar la diversidad y estructura genética de *Liquidambar styraciflua*. Se reportan valores adecuados de diversidad genética y una moderada diferenciación genética entre poblaciones, con una mayor variación genética entre individuos dentro de la población. La dinámica de flujo génico en las seis poblaciones tiene un comportamiento similar al modelo de las metapoblaciones, en la cual a mayor distancia geográfica disminuye el flujo genético. Los parámetros de disturbio con un mayor efecto en la perturbación del BN en los sitios analizados corresponden a las actividades humanas, sin embargo, no afectan directamente a la diversidad y estructura genética de las poblaciones de *Liquidambar styraciflua*. Las poblaciones con mayor diversidad genética fueron Copalillos, Las Flores y La Nueva Reforma, por lo que son idóneas como fuentes semilleras para estrategias de conservación de recursos fitogenéticos tanto *in-situ* como *ex-situ*.

## IX. LITERATURA CITADA

- Aguirre P., E. 2007. Flujo génico: métodos para estimarlo y marcadores moleculares. *En*: Eguiarte L., E., Souza V., y Aguirre X (eds). Ecología molecular. México. pp. 49-61.
- Albayrak, G., and E. Arican. 2009. Determination of similarity among Turkish sweet gum (*Liquidambar orientalis* Mill.) populations using RAPD markers. *African Journal of Biotechnology*. 8(2): 142-147.
- Bacles, C. F. E., and A. S. Jump. 2011. Taking a tree's perspective on forest fragmentation genetics. *Trends in Plant Science*. 16: 13-18.
- Banks, S. C., G. J. Cary, A. L. Smith, I. D. Davies, D. A. Driscoll, A. M. Gill, D. B. Lindenmayer, and R. Peakall. 2013. How does ecological disturbance influence genetic diversity?. *Trends in Ecology & Evolution*. 28(11): 670-679.
- Becerra V., V., y M. Paredes C. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica*. 60(3): 270-281.
- Bubb, P., I. May, L. Miles, and J. Sayer. 2004. *Cloud forest agenda*. UNEP-WCMC, Cambridge, UK. 36 p.
- Carlson, J. 2015. The Hardwood Genomics Project. Intitute of Agriculture The University of Tennessee. <http://www.hardwoodgenomics.org/organism/Liquidambar/styraciflua>.
- Challenger, A. 1998. Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México, pasado, presente y futuro. CONABIO, Instituto de Biología, UNAM; Agrupación Sierra Madre. México, D.F., México.
- CONABIO. 2010. El bosque mesófilo de montaña en México: Amenazas y oportunidades para su conservación y manejo sostenible. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F. 196 p.
- Cornejo R., A., A. Serrato D., B. Rendón A., y M., G. Rocha M. 2014. Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos. México. 256 p.
- Doyle, J. J., and J. L. Doyle. 1990. *Focus*. 12: 13-15.
- Eguiarte L., E., V. Souza, y X. Aguirre. 2007. Ecología molecular. 1a ed. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. UNAM. México. 592 p.
- Evanno, G., S. Regnaut, and J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. 14: 2611-2620. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x

- Excoffier, L., and H. E. Lischer. 2010. Arlequin version 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 10: 564-567. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x
- Fahrig, L., 2017. Ecological responses to habitat fragmentation per se. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*. 48: 1-23.
- Fahrig, L., V. Arroyo-Rodríguez, J. R. Bennett, V. Boucher-Lalonde, E. Cazetta, D. J. Currie, F. Eigenbrod, A. T. Ford, S. P. Harrison, J. A. G. Jaeger, N. Koper, A. E. Martin, J. L. Martin, J. P. Metzger, P. Morrison, J. R. Rhodes, D. A. Saunders, D. Simberloff, A. C. Smith, M. L. Tischendorf, M. Vellend, J. I. Watling. 2019. Is habitat fragmentation bad for biodiversity?. *Biological Conservation*. 230: 179-186. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.12.026>.
- Farwig, N., C. Braun, and K. Böhning-Gaese. 2008. Human disturbance reduces genetic diversity of an endangered tropical tree, *Prunus africana* (Rosaceae). *Conservation Genetics*. 9: 317. <https://doi.org/10.1007/s10592-007-9343-x>.
- Fortanelli M. J., P. J. García, y L. P. Castillo. 2014. Estructura y composición de la vegetación del bosque de niebla de copalillos, San Luis Potosí, México. *Acta Botánica Mexicana*. 106: 161-186.
- González, E. M., J. A. Meave, F. G. Lorea H., G. Ibarra M., A. C. Newton (eds.). 2011. The red list of Mexican cloud forest trees. *Fauna y Flora International*. Cambridge, UK. 148 p.
- Graham, A. 1999. Studies in neotropical paleobotany. XIII. An Oligo-Miocene palynoflora from simojovel (Chiapas, Mexico). *American Journal of Botany*. 86: 17-31.
- Graham, A. 2011. A natural history of the new world: The ecology and evolution of plants in the Americas. The University of Chicago Press. 387 p.
- Hall, P., S. Walker, and K. Bawa. 1996. Effect of forest fragmentation on genetic diversity and mating system in a tropical tree, *Pithecellobium elagans*. *Conservation Biology*. 10(3): 757-768.
- Hancock, J. M. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. *In*: D. B. Goldstein y C. Schlötte (eds). *Microsatellites, evolution and applications*. Oxford University Press. Oxford, New York. USA. pp. 1-10.

- Hernández-Oria J., G., R. Chávez, y E. Sánchez. 2006. Efecto del disturbio crónico en *Echinocereus schmolli* (Weing.) N. P. Taylor, una cactácea en peligro de extinción en el semidesierto Queretano, México. *Zonas Áridas* No. 10: 59-73. ISSN 1013-445X (VI).
- Ickert-Bond, S. M., and J. Wen. 2006. Phylogeny and biogeography of Altingiaceae: evidence from combined analysis of five non-coding chloroplast regions. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 39: 512-528.
- Köeppen, W. 1948. *Climatología*. Fondo de Cultura Económica. México. 478 p.
- Lang, K. R. 2010. Microsatellite development in *Platanus* for documenting gene flow among species. Thesis. Master of Sciences in Biological Sciences. Faculty California State University. Chico, California. USA. 43 p.
- Lazar, I. 2010. GelAnalyzer versión 2010a. freeware
- Leija L., E., G., H. Reyes H., J. Fortanelli M., y G. Palacio A. 2011. Situación actual del bosque de niebla en el estado de San Luis Potosí, México. *Investigación y Ciencia*. 19(53): 3-11.
- Manaster, C. 2009. Allelogram ReadMe. Versión 2.2.
- Mantel, N. 1967. Ranking procedures for arbitrarily restricted observation. *Biometrics*. 23: 65-78. doi:10.2307/2528282
- Martorell, C., and E. M. Peters. 2005. The measurement of chronic disturbance and its effects on the threatened cactus *Mammillaria pectinifera*. *Biological Conservation*. 124: 199-207.
- Martorell, C., and Peters, E. M. 2008. Disturbance-response analysis: A method for rapid assessment of the threat to species in disturbed areas. *Conservation Biology*. 23: 377-387.
- Mesera, O. R., M. K. Ordóñez, R. Dirzo. 1997. Carbon emissions from mexican forests: current situation and long-term scenarios. *Climatic change*. 35: 265-295.
- Morris, A. B., S. M. Ickert-Bond, B. D. Brunson, D. E. Soltis, and P. S. Soltis. 2008. Phylogeographical structure and temporal complexity in American sweetgum (*Liquidambar styraciflua*; Altingiaceae). *Molecular Ecology*. 17: 3889-3900.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual. *Genetics*. 89:583-590.
- Palmieri, D. A., V. M. Novelli, M. Bastianel, C. M. Yaly, M. G. Astúa, F. E. Carlos, C. A. Oliveira, and A. M. Marcos. 2007. Frequency and distribution of microsatellites from ESTs of citrus. *Genetics and Molecular Biology*. 30: 1009-1018.

- Peakall, R., and P. E. Smouse. 2012. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*. 28: 2537-2539
- Pedraza, R. A., and G. Williams L. 2003. Evaluation of native tree species for the rehabilitation of deforested areas in a Mexican cloud forest. *New Forests*. 26: 83-99.
- Pennington T., D., y J. Sarukhán. 2005. Árboles tropicales de México. Manual para la identificación de las principales especies. 2da ed. Universidad Nacional Autónoma de México y Fondo de Cultura Económica. México, D.F. 521 p.
- Pritchard, J. K., X. Wen, and D. Falush. 2009. STRUCTURE version 2.3. Chicago, IL: University of Chicago. Available on line at: <http://pritch.bsd.uchicago.edu>
- Rubio-Méndez, G., H. A. Castillo-Gómez, L. Hernández-Sandoval, G. Espinosa-reyes, and J. A. De-Nova. 2018. Chronic disturbance affects the demography and population structure of *Beaucarnea inermis*, a threatened species endemic to Mexico. *Tropical conservation science*. 11: 1-12.
- Ruiz-Montoya L., V. Correa-Vera, y C. Alfaro-González F. 2011. Diversidad genética de *Oreopanax xalapensis* (Araliaceae) en Los Altos de Chiapas. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 88: 15-25).
- Ruiz-Sanchez, E., and J. F. Ornelas. 2014. Phylogeography of *Liquidambar styraciflua* (Altingiaceae) in Mesoamerica: survivors of a Neogene widespread temperate forest (or cloud forest) in North America?. *Ecology and Evolution*. 4(4): 311-328.
- Rzedowski J. 1996. Análisis preliminar de la flora vascular de los bosques mesófilos de montaña de México. *Acta Botánica Mexicana*. 35: 25-44.
- Salinas-Rodríguez M., M., y J. Cruzado-Cortés. 2011. Nota sobre un fragmento de bosque mesófilo de montaña del municipio de Rioverde, San Luis Potosí. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 89: 126-128.
- Sambrook, J. and W. D. Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Vol. 2. 3a ed. CHSL PRESS. New York, USA.
- Schlötterer, C. 2004. The evolution of molecular markers-just a matter of fashion?. *Nature Reviews Genetics*. 5:63-69.
- Sonah, H., R.K. Deshmukh, A. Sharma, V. P. Singh, D. K. Gupta, R. N. Gacche, J. C. Rana, N. K. Singh, and T. R. Sharma. 2011. Genome-wide distribution and organization of

microsatellites in plants: an insight into marker development in *Brachypodium*. PLoS ONE. 6 (6): e21298.

- Sosa, V. 1978. Hamamelidaceae. *In*: Flora de Veracruz. Fascículo 1. A. Gómez-Pompa (ed). Instituto de Investigaciones de Recursos Bióticos, AC (INIREB). Xalapa, Veracruz. pp: 1-6.
- Sturges, H., A. 1926. The choice of a class interval. Journal of the American Statistical Association. 21: 65-66.
- Sullivan, J., and L. M. Lagrimini. 1993. Transformation of *Liquidambar styraciflua* using *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports. 12: 303-306
- Sun, R., F. Lin, P. Huang, and Y. Zheng. 2016. Moderate genetic diversity and genetic differentiation in the relict tree *Liquidambar formosana* Hance revealed by genic simple sequence repeat markers. Frontiers in Plant Science. 7: 1411.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar. 2013. Mega6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Oxford University. Molecular Biology and Evolution. 30(12): 2725-2729. doi:10.1093/molbev/mst197
- Tank, D. C., J. M. Eastman, M. W. Pennell, P. S Soltis, D. E. Soltis, C. E. Hinchliff, J. W. Brown, E. B. Sessa, L. J. Harmon. 2015. Nested radiations and the pulse of angiosperm diversification: increased diversification rates often follow whole genome duplications. New Phytologist. 207: 454-467.
- Toledo T. 2009. El bosque de niebla. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Biodiversitas. 83: 1-6.
- Villaseñor J., L. 2010. El bosque húmedo de montaña en México y sus plantas vasculares: catálogo florístico-taxonómico. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad-Universidad Nacional Autónoma de México. México. 40 p.
- Wei, X., and M. Jiang. 2012. Contrasting relationships between species diversity and genetic diversity in natural and disturbed forest tree communities. New Phytologist. 193: 779-786.
- Wisniewski, M., and A. L. Bogle. 1982. The ontogeny of the inflorescence and flower of *Liquidambar styraciflua* L. (Hamamelidaceae). American journal of botany. 69(10): 1612-1624.
- XLSTAT. 2018. Xlstat. exeCopyright (c) Addinsoft. All rig.

- Yang-Jun, L., L. Shu-Jie, and W. Wei-Ming. 2018. Evolutionary trends in leaf morphology and biogeography of Altingiaceae based on fossil evidence. *Palaeoworld*. 8 p.
- Zane, L., L. Bargelloni, and T. Patarnello. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*. 11: 1-16.

## X. ANEXO

10.1. Método de CTAB modificado para la extracción de ADN (Doyle y Doyle, 1990; Sullivan y Lagrimini, 1993)

1. Precalentar de 5-7.5 ml de CTAB a 65 °C en baño maría, adicionar pvp al 1%.
2. Macerar de 0.017 a 0.020 g de hoja con 1 ml de CTAB precalentado, colocar en vortex. por 50 seg, incubar por 30 min a 65 °C, agitando la muestra cada 4 min.
3. Colocar la muestra en hielo y centrifugar a 13 000 rpm a 4 °C, por 10 min.
4. Agregar 1 µL de RNAsa, mezclar por inversión e incubar por 20 min a 37 °C.
5. Agregar de 500-600 µL de cloroformo:alcohol isoamilico (24:1), agitar por inversión y centrifugar a 13000 rpm a 4°C, por 10 min.
6. Recuperar el entre 400 y 500 µl del sobrenadante y poner en un tubo de 1.5 ml.
7. Agregar un volumen igual (500 µL) de isopropanol frío (-20 °C) y mezclar por inversión.
8. Mantener la mezcla a -20 °C durante 30 min o más tiempo (toda la noche).
9. Centrifugar a 13000 rpm a 4 °C por 10 min.
10. Eliminar el sobrenadante cuidadosamente y agregar 1 ml de buffer de lavado frio (-20 °C) y mezclar por inversión.
11. Centrifugar a 13000 rpm a 4 °C por 5 min.
12. Eliminar el sobrenadante, dejando la pastilla.
13. Agregar 1 ml de etanol al 70% frio (-20 °C) y mezclar por inversión.
14. Centrifugar a 13000 rpm a 4 °C por 5 min.
15. Eliminar el sobrenadante dejando la pastilla secar el ADN.
16. Agregar de 35 a 50 µL de agua destilada estéril y conservar a -20 °C.