



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA**

**BIOLOGÍA FLORAL Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE
SAGITTARIA DEMERSA (ALISMATACEAE) EN TRES
CHARCOS DE HUIMILPAN**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

ALEJANDRO ARTURO DOMÍNGUEZ MONROY

DIRECTORA:

DRA. MAHINDA MARTÍNEZ Y DÍAZ DE SALAS

ASESORES:

DR. JOSÉ LUIS BLASCO CABAL

DRA. TERESA GARCÍA GASCA

Santiago de Querétaro, Qro.

Agosto de 2003

No. Adq. H68356

No. Título _____

Clas TS

635.9674

D671b

Dedicada a todos los que tuvieron
algo que ver con mi formación
y a todos los que se interesaron
en leer aunque sea el título de
este trabajo.

“...ante quienes me pongo de pie
y me quito la montera.”

(Dr. Goodface, 2000)

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. **Mahinda** por aguantarme más de 1.5 años en su laboratorio y financiar mis salidas de campo, por supuesto también a **Luis Hernández** por su apoyo en la elaboración de este trabajo (aunque no dejara de toser).

A mis compañeras de laboratorio (**Yolanda, Bertha y Fabiola**) por saber escuchar y a veces leer mi trabajo (entre mujeres me vi).

A **Fernando, Efrén, Yolanda** (again), por acompañarme a los charcos de Huimilpan, que por cierto, si yo fuera azteca agradecería a **Tlaloc** por la lluvia, ya que sin ella no habría charcos. También a **Laura Leiva** que me presto su casa en Huimilpan.

A todas las secretarías de la licenciatura que son super eficientes (**Miriam, Laura y Silvia**).

A mis compañeros de generación (**Carlos, Juan, Julieta, Kruskaia, Ruth, Mary, Eugenia, Kalina, Lucero y La China**), que aunque a veces hubo rencillas, siempre fueron quienes me ayudaron a madurar. Muy en especial a **Juan López Saucedo** por haber sido el único en brindarme la mano el día que llegué a Querétaro y conseguirme un sitio donde hospedarme por unos días (estaré eternamente agradecido).

A **J. Blasco** y a **E. Espinoza** por echarme siempre la mano en el rollo molecular y siempre tener un "saco lleno de artilugios" muy útiles e innovadores, además de ser mis asesores y amigos. A **Jacinto Treviño** por ayudarme con la acetólisis.

A la Dra. **Tere García** por prestarme su tanque de nitrógeno, y por siempre estar dispuesta a ayudar, también gracias por la revisión de tesis.

A **Bertha Cid** y **María Rojas** por ayudarme con el cartel que ganó en el verano de la ciencia, ¡quedó de lujo!

A los miembros del laboratorio y al doctor **Ken Oyama (Xochitl y Toño González)**, por la semana de la estancia en Morelia, y por echarme la mano con los RAPDs. Gracias doc por la revisión.

Bertha "energizer" Zúñiga por apresurarme con los trámites de titulación y por la "palanquita" en servicios escolares. Y a **Ariadna "Timón" Martínez**, por todo su apoyo y amistad, gracias.

Aunque no tuvo nada que ver en la tesis, quiero agradecer a **Juan Malda Barrera** (Dr. Goodface) simplemente por los buenos momentos, musicales, de discusión y de risas que pasamos

Y quise dejar al último este agradecimiento para sellar con broche de oro, dedicado a mis papás que nunca dejaron de apoyarme y que me dieron dos hermanas a las cuales adoro, gracias a ustedes (**Alex, Coty, Sony y Sandy**) por existir. A **Martha Arriaga**, por ser uno de los motivos por el cual quise seguirle con todo esto de estudiar (por cierto: te amo).

ÍNDICE

Sección	Página
Resumen	1
1. Introducción	2
2. Antecedentes	
2.1. <i>Sagittaria demersa</i>	6
2.2. Descripción de la planta	6
2.3. Polinización	8
2.4. RAPDs y diversidad genética	10
2.5. Zona de estudio	11
2.5.1. Fisiografía	12
2.5.2. Suelo	12
2.5.3. Clima	13
3. Hipótesis	13
4. Objetivos	
4.1. Objetivo general	14
4.2. Objetivos particulares	14
5. Metodología	
5.1. Biología floral	15
5.2. Visitadores y polinizadores	15
5.3. Diversidad genética	15
6. Resultados	
6.1. Biología floral	19
6.2. Visitadores y polinizadores	21
6.3. Diversidad genética	25
7. Discusión	31
8. Conclusiones	35
9. Literatura citada	37
Anexo I	40
Anexo II	41
Anexo III	43

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Sección	Página
<i>Sagittaria demersa</i> (Figura 1)	8
Zona de estudio (Figura 2)	13
Oligonucleótidos utilizados (Cuadro 1)	18
Granos de polen de <i>S. demersa</i> (Figura 3)	20
<i>Stratiomys</i> sp. (Figura 4)	21
Polinizador (Figura 5)	22
Polen adherido al polinizador (Figuras 6 – 8)	23
Visualización de bandas de ADN genómico (Figura 9)	25
Valores de absorbancia (Cuadro 2)	26
Pruebas de oligonucleótidos (Figura 10)	27
Geles del producto de PCR (Figuras 12 y 13)	28
Fenograma (Figura 14)	30

RESUMEN

Se estudiaron algunos aspectos de la biología floral de *Sagittaria demersa* (Alismataceae), una hidrófita estricta, endémica de México; además de analizar la diversidad genética de tres poblaciones en el municipio de Huimilpan, Qro. Se encontró, a través de las observaciones en campo que *S. demersa* tiene sólo un visitador floral, aunque haya más insectos relacionados a los charcos estudiados. Se comprobó mediante microscopía electrónica de barrido que el polen de *S. demersa* se encuentra pegado en el cuerpo del visitador (un díptero que no fue determinado taxonómicamente), por lo que se le considera el polinizador de la planta, porque su comportamiento es el típico de un polinizador, ya que se posa directamente en las estructuras sexuales de las flores. Con un análisis tipo RAPD y con un fenograma tipo UPGMA, se comparó la diversidad genética de las tres poblaciones estudiadas de *S. demersa*, encontrando que los individuos de cada población son parecidos genéticamente y que son diferentes respecto a las otras poblaciones. Sin embargo, se encontraron algunas similitudes entre poblaciones, debido al flujo genético que se da por medio de dos vías: 1) estructuras vegetativas (frutos, semillas y/o cormos) a través de aves migratorias o ganado y 2) a través del polen llevado por los polinizadores de población a población.

1. INTRODUCCIÓN

Sagittaria demersa Smith, es una planta endémica de México, habita sólo en lagos y pozas de las zonas montañosas, formando poblaciones densas (Lot y Novelo, 1978). Su distribución no se restringe al estado de Querétaro, también se distribuye en los estados de Aguascalientes, Chihuahua, Durango, Hidalgo y Jalisco (Lot y col., 1999). Es una hidrófita estricta, según la delimitación de "planta acuática" de Lot y col. (1993), y su forma de vida es enraizada sumergida o enraizada emergente (Lot y col., 1999). A diferencia de otras especies de los géneros *Sagittaria* y *Echinodorus* (ambos pertenecientes a la familia Alismataceae), las inflorescencias de *S. demersa* no sobrepasan el nivel del agua sino que se encuentran flotando. Esto la hace candidata a ser polinizada, además de los insectos aéreos, por aquellos que son acuáticos o que estén asociados con este tipo de ambientes.

En el municipio de Huimilpan, Qro., existen charcos temporales que duran entre seis y nueve meses con agua. Pueden llegar a formarse algunos años en el mes de mayo, otros en junio o no llenarse. En años lluviosos hay alrededor de 40 charcos de diferentes tamaños, los más grandes tienen una superficie de 1.5 hectáreas y los más pequeños son de alrededor de 4 m² con profundidades promedio de 90 cm. Se secan entre diciembre y febrero (Martínez y García, 2001). Se localizan en lugares de escaso relieve y drenaje deficiente con sustrato de andesitas y riolitas del Terciario Superior (Zamudio y col., 1992). Desafortunadamente, los tres sitios de estudio se encuentran bajo una intensa presión humana, debido a que se ubican muy cerca de los poblados, y se usan como abrevaderos de animales, quienes pisotean estructuras de perennación

(cormos) causándoles daño, por lo que es frecuente encontrar plantas rotas. Los charcos están fragmentados por caminos y carreteras y tienen construcciones de casas muy cercanas (Martínez y García, 2001). La relación existente entre la densidad humana y la densidad de los humedales, está determinada por la pérdida de área agregada del humedal mientras la densidad humana aumenta (Gibbs, 2000). Al mismo tiempo en que la densidad de los humedales descende, lo hacen las áreas en las cuales está distribuida la vegetación.

La vegetación suele distribuirse en franjas bien delimitadas de manera continua a lo largo de una región, por lo que es fácil que el flujo genético se presente. Por el contrario, los humedales ocurren típicamente en parches discretos y de manera discontinua (no se conectan entre sí) en lugares altos, de tal manera que muchas de las poblaciones locales de las especies de los humedales son pequeñas, aisladas y por lo tanto, vulnerables a la extinción (Dodd, 1990). Al estar aisladas geográficamente, son genéticamente homogéneas (Bernardello y col., 1999), además de que procesos como la consanguinidad o deriva génica están presentes, lo cual reduce la diversidad genética dentro de cada población (Elam, 1996).

Actualmente, existen varios métodos para conocer la variación genética en las comunidades vegetales. Entre los más usados se encuentra el de los marcadores moleculares RAPDs (pronunciado "rapids"; por sus siglas en inglés "Random Amplified Polymorphic DNA"; su traducción al español es: Polimorfismos de ADN Amplificados al Azar).

Los RAPDs son marcadores moleculares generados por la amplificación de segmentos aleatorios de ADN, por medio de la reacción en cadena de la

polimerasa (PCR: "Polymerase Chain Reaction"), descrita por Saiki y col. (1988). La técnica es una variación de la PCR. Lo que se necesita para que se lleve a cabo la reacción es: el ADN que se desea amplificar, una enzima termoestable conocida como *Taq* ADN polimerasa (aislada de la bacteria *Thermus aquaticus*), magnesio como cofactor de la enzima, oligonucleótidos (secuencias de 10 bases nitrogenadas o decámeros) conocidos como "primers", y desoxinucleótidos libres (Otero y col., 1997). La reacción se lleva a cabo debido a cambios de temperatura según las condiciones de amplificación descritas por Williams y col. (1990). En un análisis tipo RAPD, se genera un producto de amplificación de ADN por cada región genómica que esté flanqueada por un par de sitios de anillamiento de 10 bases (en la orientación adecuada). El ADN genómico de dos individuos diferentes produce frecuentemente distintos patrones de amplificación. Un fragmento de ADN particular que se genere para un individuo pero no para otro, representa un polimorfismo de ADN y puede ser utilizado como un marcador genético.

Se ha demostrado que los RAPDs, como marcadores moleculares, son útiles en problemas de estimación de la diversidad genética, a pesar de que se ha cuestionado su uso en sistemática en la resolución de relaciones filogenéticas. Además, los RAPDs son útiles para estimar el tamaño efectivo de una población, dilucidar si existe aislamiento reproductivo entre poblaciones, estimar los niveles de entrecruzamiento, estudiar relaciones de parentesco y para relacionar las distancias genéticas con características geográficas. También se sabe que el utilizar isoenzimas ayuda en el análisis de la estructura genética poblacional, ya que se pueden apreciar loci codominantes y heterocigóticos, sin embargo, en los casos en los que la variabilidad genética es poca, los RAPDs son más adecuados

debido a que detectan mayor variación que las enzimas (Otero y col., 1997). Otra ventaja que los RAPDs ofrecen, es que no se necesita conocimiento previo del genoma del organismo que se vaya a estudiar (Hadrys y col., 1992) y que el análisis de las bandas generadas es fácil, además de que las bandas se comparan directamente y pueden permitir determinación de estirpes para poder elaborar estudios intra o interpoblacionales; por otra parte, el método es aleatorio respecto al genoma. Es muy probable que en un amplio número de productos de amplificación diferentes haya alguno que amplificó una sección de cada cromosoma. Por consiguiente, el análisis tipo RAPD puede generar marcadores moleculares que pueden ser correlacionados con rasgos fenotípicos de interés (Blasco, com. pers.).

Como se mencionó anteriormente, el análisis tipo RAPD, es de utilidad para estudiar el flujo genético intra e interpoblacional. Se sabe que el flujo genético ocurre durante dos etapas del ciclo de vida de una planta: la dispersión del polen antes de la fertilización (ej. por abejas o moscas) y la dispersión de los frutos o semillas en algunas etapas después de la fertilización y desarrollo del embrión (ej. por aves migratorias), además de la capacidad limitada de los polinizadores por las distancias geográficas (Huang y col., 2001).

2. ANTECEDENTES

2.1 *Sagittaria demersa*

Son pocos los trabajos acerca de *S. demersa*, no obstante, se sabe que es una planta asociada a tipos de vegetación acuática y subacuática, que se le puede encontrar en bosques de *Quercus* o en vegetación secundaria (pastizal inducido), que florece y fructifica de julio a octubre, además de que las flores perfectas sólo en ocasiones se presentan (Domínguez, 2001). Según Lot y col. (1999), la polinización de *S. demersa* es entomófila, sin embargo, no indican quién es el polinizador. *Sagittaria demersa* es una especie endémica de México cuya distribución se restringe a los estados de Aguascalientes, Chihuahua, Durango, Hidalgo, Jalisco y Querétaro (Lot y col., 1999). Cuando se encuentra a esta planta en alguna localidad, las poblaciones son muy densas, formando grandes masas (Lot y Novelo, 1978).

2.2 Descripción de la planta

Sagittaria demersa J. G. Sm. (Figura 1).

Hierbas anuales de cormos, glabras, de más de 60 cm de alto; cormos de 1-1.8 cm de largo y de 1-1.5 cm de diámetro: hojas sumergidas, sésiles, verde pálido, filodiales, porción basal redondeada, la apical aplanada, 12-53 cm de largo, 0.3-0.7 cm de ancho, las venas (3-) 9-11, el ápice acuminado a redondo-acuminado, lóbulos basales ausentes, inflorescencias de un solo escapo de 2-7 verticilos, flotantes o emergentes, más de 16 cm de largo y 4 cm de ancho, los verticilos con tres flores; pedúnculos redondeados arriba de 28 cm de largo, 0.2-

0.3 cm de ancho; brácteas masculinas unidas basalmente, ampliamente lanceoladas, delicadas, aproximadamente 2 mm de largo, el ápice obtuso; pedicelos masculinos extendidos, cilíndricos, aproximadamente 1.5 cm de largo, 0.6-1 mm de diámetro; flores masculinas con carpelos estériles centrales, los sépalos extendidos, aproximadamente 3 mm de longitud y 2.5 mm de ancho, los pétalos aproximadamente 1.2 cm de largo y 0.9 cm de ancho, sin ganchos, estambres aproximadamente 11, filamentos glabros, dilatados, aproximadamente 1.5 mm de largo y 0.7 mm de ancho, las anteras elípticas aproximadamente 1.2 mm de largo y 1 mm de ancho, obtuso en el ápice; brácteas femeninas separadas, ampliamente lanceoladas, delicadas, aproximadamente 0.2 cm de largo, ápice redondeado, pedicelos femeninos de expandidos a reflejos en flor y fruto, 1.5-6.5 cm de largo, 1.2 mm de diámetro; flores femeninas sin anillo de estambres estériles; los sépalos adpresos a expandidos en flor y fruto, aproximadamente 6 mm de largo y aproximadamente 3 mm de ancho, los pétalos aproximadamente 8 mm de largo y aproximadamente 6 mm de ancho, sin ganchos; frutos agregados de aproximadamente 6 mm de diámetro; aquenios oblanceolados a obovados, picudos, aproximadamente 1.5 mm de largo y 1 mm de ancho, las caras sin tubérculos o glándulas, los picos laterales, erectos, aproximadamente 1.1 mm de largo. Habita arroyos, depresiones de pastizales inundables, pozas, y pequeños lagos, mayormente o enteramente sumergida (Haynes y Holm – Nielsen, 1993).



Figura 1. *S. demersa* en una de las poblaciones estudiadas (La Ceja). Las flores blancas y las hojas emergentes, son las correspondientes a la especie.

2.3 Polinización

Se ha estudiado la respuesta de los polinizadores dependiendo del tamaño de las flores masculinas de dos especies de *Sagittaria* (*S. latifolia* y *S. australis*). Las flores de la especie dioica (*S. latifolia*) son de mayor tamaño que en la especie monoica (*S. australis*). En este estudio se observó que no existe relación directa entre el tamaño de las flores y una mayor respuesta de los polinizadores, encontrando que quienes polinizan a estas especies son insectos generalistas como abejas y moscas (Muenchow y Delesalle, 1994). Se ha encontrado que en especies acuáticas, cuyas flores flotan o sobrepasan el nivel del agua, los polinizadores pueden ser moscas, abejas o escarabajos (Lippok y col., 2000).

Se estudió la polinización de *Echinodorus grandiflorus* (Cham. y Schldl.) M. Micheli, una planta perteneciente a la misma familia, cuyas inflorescencias, a diferencia de *S. demersa*, no flotan en la superficie del agua, sino que emerge de la superficie hasta 2 m de altura (Domínguez, 2001). La polinización en *E. grandiflorus* se lleva a cabo por una abeja: *Protodiscelis echinodori* (Colletidae) (Vieira y de Souza Lima, 1997). En las poblaciones estudiadas por estos autores, hay dos subespecies de *E. grandiflorus* y cada una de ellas se restringe a diferentes cuerpos de agua. *E. grandiflorus* spp. *grandiflorus* es autoincompatible, produce pocos frutos, pero muchas plántulas adventicias. Por otra parte, *E. grandiflorus* spp. *aureus* es autocompatible, produce muchos frutos y forma pocas plántulas adventicias.

Philbrick y Les (1996) discuten que la forma y naturaleza floral tan conservada de las plantas acuáticas predice que dichas plantas podrían tener polinizadores similares a los de las plantas terrestres. Dichos autores, encontraron que uno de los polinizadores en plantas acuáticas son los insectos acuáticos, los cuales son muy diversos biológicamente y tienen historias de vida relacionadas directamente con las plantas acuáticas. La mayoría de los polinizadores de las plantas terrestres visitan a las flores para coleccionar polen y/o néctar. En contraste, los insectos acuáticos usan las flores de las plantas acuáticas para aparearse, descansar, protegerse de los depredadores y también como posibles escondites para capturar presas.

2.4 RAPDs y diversidad genética

Una técnica recientemente utilizada para el estudio de la interacción de las poblaciones en cuanto a la distribución de la variación genética, es la de el análisis tipo RAPD (Williams y col. 1990; Tingey y col., 1994).

Koppitz (1999) y Keller (2000) estudiaron la relación genética dentro y entre las poblaciones de *Phragmites australis* (Cav.) Trin. ex Steudel (Poaceae), encontrando por medio de RAPDs que las poblaciones no presentaron gran diversidad genética debido a que están cercanamente relacionadas y que la variación es pequeña. Una de las poblaciones estudiadas presentó mayor diversidad que las demás, debido a que tiene una diferente fuente de propágulos. Es importante mencionar que el análisis de "cluster" agrupó a las poblaciones geográficamente a lo largo del río Charles (MA, E.U.). Esto sugiere que las poblaciones se habían establecido principalmente vía propágulos vegetativos, o que la expansión del rango de las plantas se dio durante un corto tiempo (Keller, 2000). En contraste, el trabajo de Koppitz (1999) encuentra una gran cantidad de clones y gran diversidad entre las poblaciones de *P. australis* a lo largo del mundo, argumentando que la diversidad genética aumenta mientras más grande sea la distancia geográfica.

Elam (1996) estudió varios factores que influyen en los niveles y distribución de la variación genética, como el de flujo genético. Concluyó que el flujo genético entre las poblaciones de plantas ocurre por la interacción de poblaciones en cuanto a su apareamiento, o por migración de semillas o propágulos vegetativos.

Hygrophila pogonocalyx Hayata (Acanthaceae), es una especie en peligro de extinción en Taiwán. Huang y col. (2001) estudiaron ocho poblaciones de esta

2.5.1 Fisiografía

El municipio de Huimilpan se localiza en la provincia fisiográfica del Eje Volcánico Transversal, que se extiende en la parte Central y Sur del estado de Querétaro (46 % del territorio). Se caracteriza por formar una cadena montañosa que presenta gran cantidad de aparatos volcánicos bien conservados, y estructuras tipo caldera de composición riolítica y andesítica, así como mesetas ignimbríticas, y derrame de lava basáltica y andesítica, cuyas edades varían del Neogeno al Pleistoceno. Esta provincia presenta una gran diversificación de topoformas, entre las que se encuentran sierras de pendientes suaves, moderadas y abruptas, escudos volcánicos, lomeríos con cañadas, llanuras, mesetas y valles, que en algunas regiones se combinan entre sí (Caballero, 1995).

Litológicamente la provincia está conformada por rocas de origen ígneo extrusivo y sedimentos continentales del Terciario, además de depósitos Cuaternarios. Las altitudes en los valles son de 2,400 msnm, las sierras tienen elevaciones hasta de 2,900 msnm, los lomeríos fluctúan de 2,000 a 2,350 m, las llanuras se observan de 1,900 a 2,400 msnm, y las mesetas tienen elevaciones promedio de 2,200 msnm (Caballero, 1995).

2.5.2 Suelo

En Huimilpan, el tipo de suelo es feozem háplico. La zona se caracteriza por un lecho rocoso entre los diez y cincuenta cm de profundidad, con una textura media. Su topografía es un terreno plano a ligeramente ondulado con pendientes menores del 8 % (INEGI, 1974).

2.5.3 Clima

La zona se caracteriza por tener climas templados y subhúmedos. Estos son estables en cuanto a temperatura, ya que durante el año varían de 12 a 18 °C. Las lluvias son favorecidas por la altura y por la presencia de algunas serranías, en la estación de verano (de junio a agosto) llueve abundantemente y en el invierno (de diciembre a febrero) se presentan granizadas y heladas frecuentes (INEGI, 1986).



Figura 2. Ubicación de los 3 charcos en los cuales se encuentra *S. demersa*.

3. HIPÓTESIS

1. Las inflorescencias de *S. demersa* flotan sobre la superficie del agua, por lo que la polinización puede estar mediada por un insecto acuático confinado a cuerpos de agua; por lo tanto, la variación genética dentro de cada población será mínima, los individuos de cada población serán

genéticamente parecidos entre sí pero diferentes a los de otras poblaciones.

2. Si el polinizador es volador, la polinización dependerá de su capacidad de vuelo, debido a que la distancia que separa a los charcos representa una barrera para que haya flujo genético entre poblaciones, por lo que el flujo de genes vía polen, podría darse solamente dentro de cada población. En caso de que haya flujo genético entre las poblaciones, se espera que el análisis de los resultados, muestre patrones de marcadores RAPD similares en las tres poblaciones.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Estudiar la biología floral de *S. demersa* y determinar por medio de un análisis tipo RAPD, si hay flujo genético entre las tres poblaciones.

4.2 Objetivos particulares

1. Caracterizar la biología floral de la planta.
2. Determinar cuáles son los visitantes y posibles polinizadores de *S. demersa*.
3. Determinar la diversidad genética de las tres poblaciones estudiadas.
4. Comparar la diversidad genética entre las tres poblaciones y determinar si existe un patrón geográfico.

5. METODOLOGÍA

5.1 Biología floral

Durante 24 horas se observaron flores abiertas de *S. demersa* para determinar el momento en el cual cerraban. Se colectaron algunas inflorescencias (10 por cada población) para describirlas. La acetólisis del polen se llevó a cabo mediante la técnica señalada por Martínez y Hernández (1997) (Anexo I) para describir su morfología, haciendo uso de microscopía óptica. Posteriormente, utilizando microscopía electrónica de barrido, se comparó el polen encontrado en el cuerpo del visitador floral con el de *S. demersa*.

5.2 Visitadores y polinizadores

Se hicieron salidas de campo a los tres sitios de estudio y se observaron los visitadores florales durante las 24 horas del día, en intervalos de 6 horas con duración aproximada de 1 – 2 horas cada uno. Mediante una red para mariposas, se colectaron dos especies de dípteros, un visitador floral y otro que sólo volaba cerca de las flores, los cuales se fijaron en etanol al 70%. En laboratorio, se examinaron los insectos para encontrar el polen de *S. demersa* pegado a sus cuerpos.

5.3 Diversidad genética

Se colectaron hojas de plantas de cada población (Figura 2), las cuales fueron congeladas en el laboratorio a -70°C en un ultracongelador. De cada población, se colectaron 15 individuos de *S. demersa* separadas entre sí por

aproximadamente 2 m de distancia para evitar que las plantas colectadas fueran clones (Martínez, com. pers.). De las 15 plantas de cada población, sólo se usaron 5 (el resto permaneció congelado). La extracción de ADN se hizo siguiendo el protocolo establecido por Doyle y Doyle (1987), y algunas recomendaciones hechas por Antonio González – Rodríguez (com. pers.) del laboratorio del Dr. Ken Oyama en el Instituto de Ecología de la UNAM campus Morelia (Anexo II). La integridad de las muestras de ADN se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8% p/v (peso / volumen) (Sambrook y Russell, 2001).

Se utilizaron voltajes de 60 v para los geles de visualización de ADN (0.8%) y de 120 v para los geles de RAPDs (2%), y se corrieron de ánodo a cátodo (polo – a polo +) en cubetas horizontales en las que el gel se sumergió en TAE 1X (Tris – acetato 40 mM, EDTA 1 mM pH 8.0) como solución amortiguadora. Ambos tipos de geles fueron cargados en una razón de 5:1 v/v (volumen / volumen) con el siguiente tampón de carga: azul de bromofenol 0.25% p/v, xilén cianol FF 0.25% p/v, y ficol tipo 400 15% p/v; siempre utilizando para ambos casos 15 μ l de la solución correspondiente de ADN de cada individuo y 3 μ l del tampón de carga. El gel también fue cargado con un “ladder” de 100 pares de bases de la casa Invitrogen (1 μ g/ μ l), para estimar el tamaño de las bandas generadas en cada PCR. El proceso de electroforesis concluyó hasta que el gel fuera segmentado en tres partes por dos bandas transversales de coloración azul (la más cercana al ánodo, xilén cianol, siempre más clara que la del azul de bromofenol) (Sambrook y Russell, 2001).

Se cuantificó el ADN por medio de espectrofotometría, midiendo absorbancia de las soluciones a los 260, 280 y 350 nm de longitud de onda (los valores de los 260 y 280 nm de longitud de onda son de utilidad para conocer la pureza del ADN, la cual se obtiene al dividir el valor de los 260 nm entre el de los 280 nm. El valor de los 350 nm sirve para conocer la cantidad de glúcidos en la solución), considerando que una unidad de absorbancia a los 260 nm es equivalente a 50 $\mu\text{g/ml}$ de ADN. Una vez cuantificado, el ADN se diluyó a una concentración de 6.25 $\text{ng}/\mu\text{l}$ (a partir de la solución "stock"), y así, al tomar 4 μl tener 25 ng de ADN en cada PCR (Sambrook y Russell, 2001). De las muestras más concentradas de ADN, se diluyó 1 ml en 699 ml de agua tridestilada (factor de dilución = 700), de las restantes se diluyeron 2 ml en 698 ml (factor de dilución = 350). Se utilizó un kit "Ready-to-go PCR beads" de Amersham Pharmacia Biotech Inc., conteniendo una perla liofilizada que incluye Tris-HCl, KCl, MgCl_2 , la *Taq* ADN polimerasa y los cuatro dNTP's que quedan a la concentración adecuada cuando la perla se hidrata a un volumen final de 25 μl . Posteriormente se siguió el procedimiento de Williams y col. (1990) para hacer RAPDs con las siguientes condiciones de PCR: 5 minutos a 95°C para que la molécula de ADN se separe por completo en sus dos hebras; 36 ciclos que comprendían: 95°C por 1 minuto de desnaturalización, 40°C por 1 minuto de anillamiento y 72°C por 2 minutos de extensión; 72°C por 5 minutos de extensión final para asegurarse de que las moléculas de ADN fueran bicatenarias; por último las muestras se pusieron a 4°C. Cada reacción de amplificación tuvo un volumen final de 25 μl (incluida la perla),

siendo: 1 μ l del decámero a 5 pmoles/ μ l (5 μ M), 4 μ l de la dilución de ADN y 20 μ l de agua tridestilada estéril.

Se probaron 70 oligonucleótidos al azar (de los kits "RAPD 10mer" Technologies, Inc.), utilizando como molde ADN genómico de *S. demersa* de los tres sitios de estudio, para observar cuáles de ellos generaban mayor cantidad de marcadores RAPD, 19 de los cuales, generaron marcadores. Se seleccionaron los 15 que generaron mayor número de bandas. El cuadro 1 indica la clave de cada oligonucleótido y su secuencia de nucleótidos de 5' a 3'. La prueba de oligonucleótidos se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. Ken Oyama del Instituto de Ecología campus Morelia, Mich.

Marca	Clave	Secuencia de 5' a 3'
Operon	OPA 1	CAGGCCCTTC
Operon	OPA 3	AGTCAGCCAC
Operon	OPA 5	AGGGGTCTTG
Operon	OPA 10	GTCATCGCAG
Operon	OPA 11	CAATCGCCGT
Operon	OPA 18	AGGTGACCGT
Operon	OPB 10	CTGCTGGGAC
Operon	OPB 11	GTAGACCCGT
Operon	OPB 12	CCTTGACGCA
Operon	OPB 18	CCACAGCAGT
Operon	OPB 20	GGACCCTTAC
Operon	OPC 2	GTGAGGCGTC
Operon	OPC 5	GATGACCGCC
Operon	OPC 8	TGGACCGGTG
Operon	OPC 9	CTCACCGTCC

Cuadro 1. Oligonucleótidos de 10 bases (decámeros) que generaron mayor cantidad de marcadores tipo RAPD, probados en el laboratorio del Dr. Ken Oyama del Instituto de Ecología de la UNAM, campus Morelia, Mich.

El número de plantas utilizadas por población fue de cinco, cada uno de los ADN fue probado con los 15 oligonucleótidos seleccionados (Blasco y Martínez, com. pers.). Los fragmentos obtenidos en las amplificaciones mediante PCR se observaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% p/v, teñidos en bromuro de etidio 0.5 $\mu\text{g/ml}$ en TAE 1X. El bromuro de etidio se intercala entre las bases nitrogenadas y permite visualizar los fragmentos de ADN al iluminar el gel con luz U. V. Los geles fueron fotografiados mediante una cámara digital con filtro para luz U. V., y las imágenes fueron analizadas mediante el programa Kodak 1D versión 3.5.4. A partir del análisis de las imágenes de los geles, se generó una matriz de datos (anexo III) de presencia (se indica con 1) o ausencia (se indica con 0) de las bandas amplificadas por cada uno de los decámetros, que se analizó por medio del programa JMP versión 3.2.2, bajo la opción de “hierarchical clustering” con el método de UPGMA (“Unweighted Pair-Group Method using arithmetic Averages”) obteniéndose un fenograma (Excoffier y col., 1992).

6. RESULTADOS

6.1 Biología floral

Las flores de *S. demersa*, una vez que han abierto, permanecen así hasta que se produce el fruto y la flor muere. Las 30 inflorescencias que se colectaron (10 por población), presentaron escapos simples, con 3 – 5 verticilos, cada verticilo con 3 flores. Todas las inflorescencias que se colectaron presentaron frutos en los dos primeros verticilos basales, por lo que se considera que las flores de las partes bajas de las inflorescencias necesariamente son bisexuales o

femeninas. Los verticilos apicales, siempre presentaron 3 flores masculinas y nunca frutos, por lo que se descarta la posibilidad de que en los verticilos apicales se encuentren flores bisexuales.

De la acetólisis que se hizo al polen de *S. demersa* se pudo hacer una descripción, la cual se presenta a continuación:

Granos esféricos, polipantoporados, con ambos diámetros (polar y ecuatorial) de $20\mu\text{m}$ ($24\mu\text{m}$ considerando las ornamentaciones). Ornamentación equinada cónica de aproximadamente $2\mu\text{m}$ de altura, dispuestas en grupos irregulares alrededor de todo el grano (Figura 3).

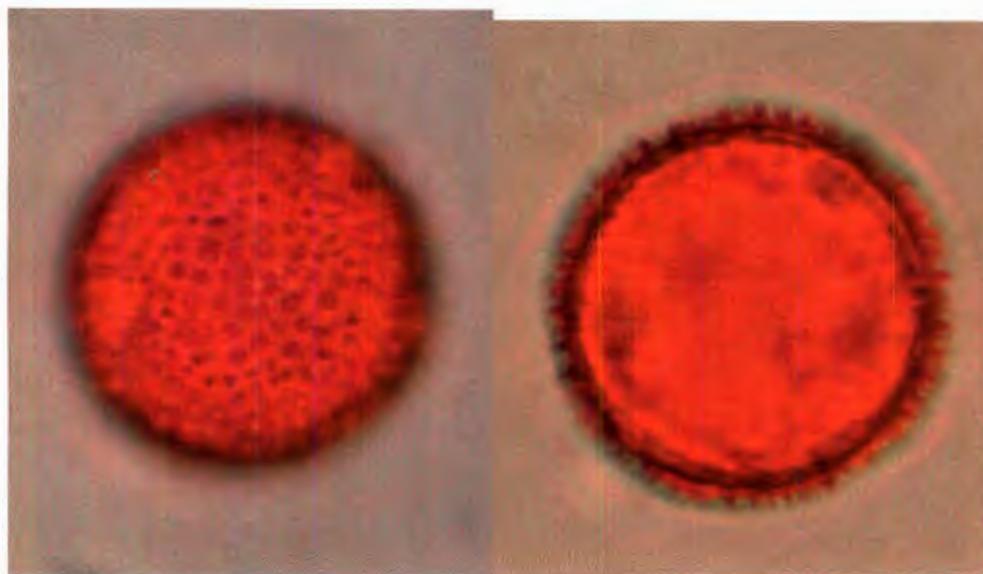


Figura 3. Grano de polen acetolizado, de *S. demersa* visto al microscopio óptico (100 X).

Las micrografías de barrido (Figuras 6 – 8) , demuestran la presencia de polen perteneciente a *S. demersa* pegado al cuerpo del visitador floral, por lo cual se le considera el polinizador de la planta.

6.2 Visitadores y polinizadores

A un insecto se le considera visitador floral, si se posa directamente sobre las estructuras florales de una planta. Las observaciones hechas en campo de los visitantes florales, indicaron que *S. demersa* es visitada a partir de las 11:00 a.m. hasta las 06:00 p.m. (aprox.) por dos especies de dípteros (moscas), uno perteneciente al género *Stratiomys* (Stratiomyiidae) (Figura 4) y el otro aun sin determinar (Figura 5). Las moscas pertenecientes a la familia Stratiomyiidae, están siempre asociadas a los humedales, donde se alimentan y reproducen. *Stratiomys* sp., a pesar de que se encuentra cerca de las flores de *S. demersa* no se posa sobre ellas, únicamente vuela cerca de la superficie del agua para ovopositar en la superficie del agua, por esa misma razón, no se le puede considerar como un visitador de la planta.

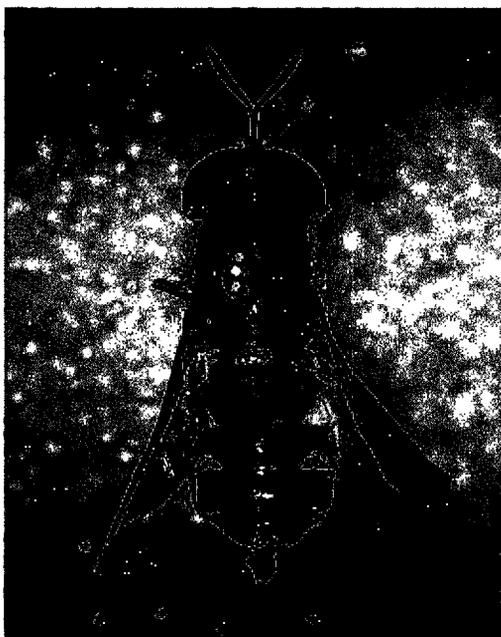


Figura 4. *Stratiomys* sp. (Stratiomyiidae): uno de los insectos que vuelan cerca de *Sagittaria demersa*. Este díptero, no se posa sobre las flores de *S. demersa*, por lo tanto, no se le considera un visitador floral.

La especie que no se determinó, es difícil de coleccionar debido a su rápido vuelo y a sus dimensiones tan pequeñas, sin embargo, se pudieron capturar algunas y con una de ellas se hicieron las micrografías en la Unidad de Microscopía Electrónica, del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. La mosca no pudo ser determinada debido a la falta de claves taxonómicas del grupo.

Según las observaciones del comportamiento de los visitantes sobre las flores, la especie de esta mosca es el polinizador de la planta ya que ésta se para directamente sobre las estructuras sexuales de las flores, llevándose con ella el polen a otras flores. Lo anterior, se puede comprobar observando el polen de *S. demersa* pegado en su cuerpo (Figuras 6 – 8).



Figura 5. La especie de díptero que no fue determinada. Como se observa, el comportamiento de la mosca es posarse sobre las estructuras sexuales de las flores de *S. demersa*, lo que ocasiona que el polen se pegue a sus cuerpos

Se aprecian los granos de polen de *S. demersa* adheridos al cuerpo del polinizador. En el cuerpo de la mosca que se preparó para microscopía electrónica de barrido, se encontraron tres granos de polen, uno de los cuales no se fotografió debido a que no se distinguía entre las patas traseras de la mosca. Las figuras 6 y 7 se tratan de la misma micrografía, pero con diferente aumento. La flecha señala al grano de polen, el cual se encuentra entre los ojos y la región bucal. La figura 8 muestra un grano de polen pegado a la pata izquierda delantera.

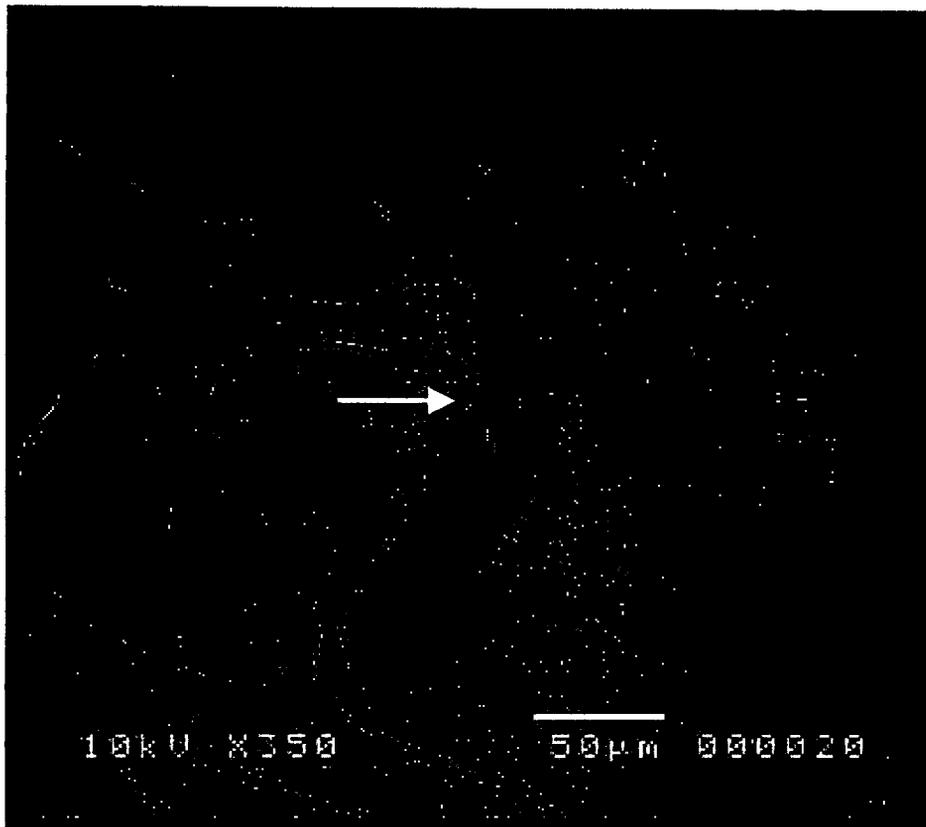


Figura 6. Grano de polen de *S. demersa* pegado cerca de la boca y de los ojos del polinizador.

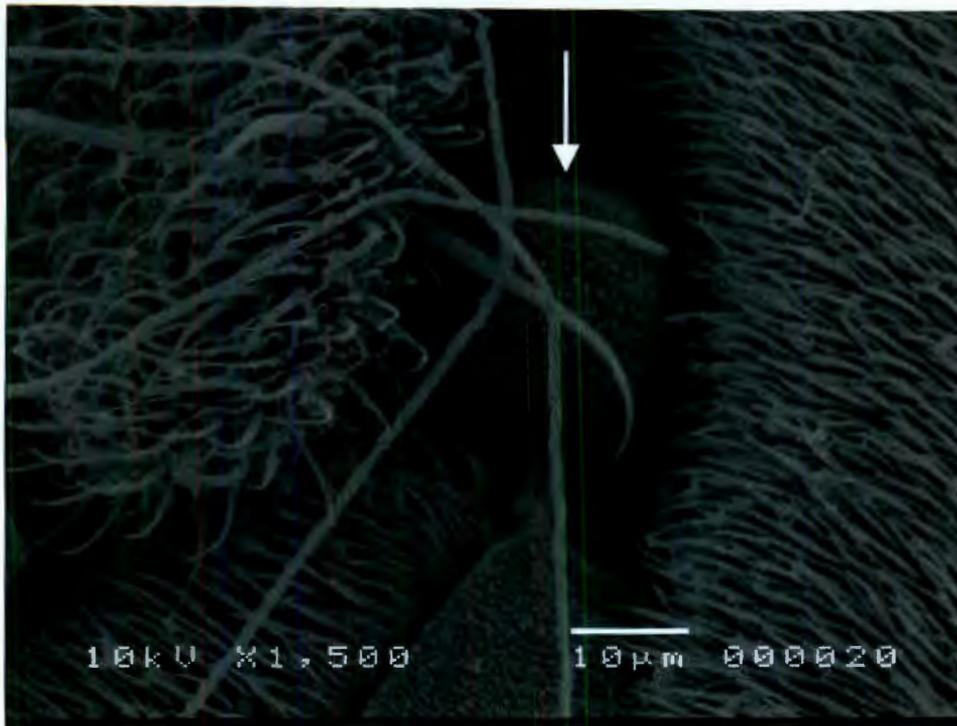


Figura 7. El mismo grano de polen que el de la figura anterior, visto a un mayor aumento. Las características del grano corresponden con la descripción del polen de *S. demersa*.

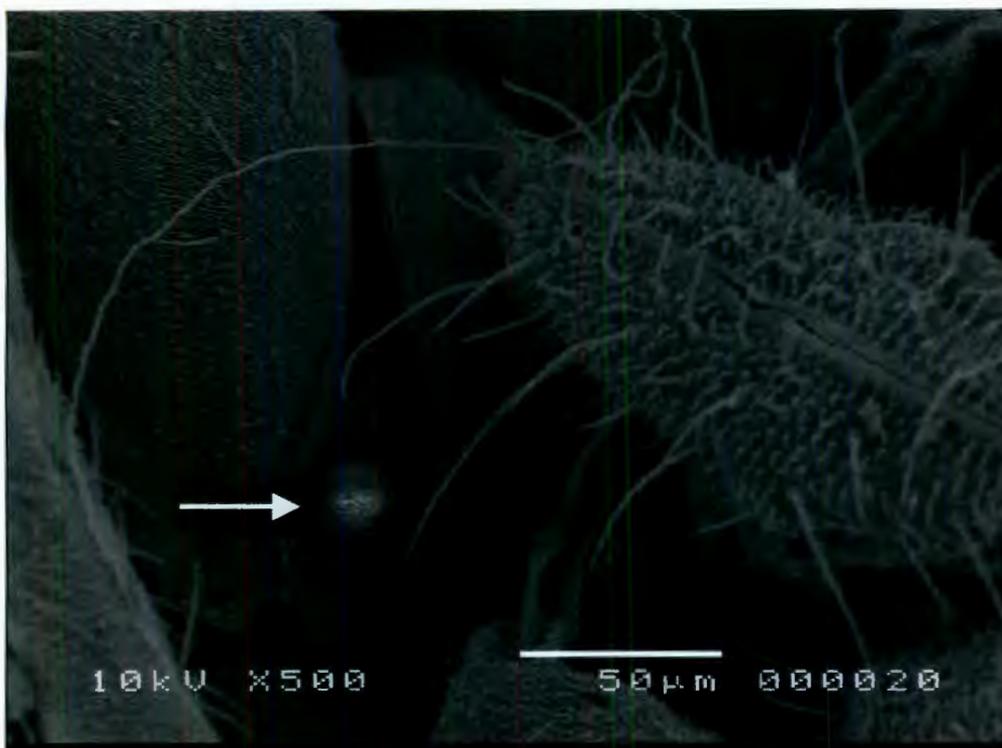


Figura 8. La flecha señala el grano de polen de *S. demersa* pegado en la pata izquierda de la mosca. El brillo del grano se debe a que durante la preparación para la micrografía, no se ionizó adecuadamente.

6.3 Diversidad genética

El ADN genómico de los individuos de las tres poblaciones de *S. demersa*, se puede apreciar en la figura 9, en donde las bandas más intensas son las soluciones más concentradas de ADN de los individuos de cada población. Las poblaciones se indican con el primer número (del 1 al 3; La Ceja, Frente a La Ceja y Km 29; respectivamente). El número que sigue después del punto representa al individuo. Las muestras de ADN de los individuos 1.1, 1.4, 1.5, 3.1, 3.2, 3.3 y 3.5 fueron las más concentradas, por lo cual al momento de cuantificarlos mediante espectrofotometría, se diluyó 1 μ l de cada ADN en 699 μ l de agua tridestilada estéril y de los demás se diluyeron 2 μ l en 698 μ l de agua tridestilada.



Figura 9. Bandas de ADN obtenido de las poblaciones de *S. demersa*, por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% (p/v). Los números del 1 al 3, representan a la población de la cual provienen los individuos, los cuales se representan del 1 al 5 (después del punto). Las muestras 1.1, 1.4, 1.5, 3.1, 3.2 y 3.5 fueron las más concentradas.

En el cuadro 2, se muestran los valores de absorbancia del ADN diluido como se indica en el párrafo anterior, mostrando los valores de pureza (260 nm / 280 nm), y el valor de concentración de la solución “stock” de ADN, para diluirlo como se indica en sección 5.3 de metodología.

El ADN de la planta 3.1 (población 3: Km 29, individuo 1), se degradó después de la cuantificación y a partir de ese momento, sólo se trabajó con cuatro individuos de esa población, por lo que los resultados de la diversidad genética están basados en 14 individuos de las tres poblaciones.

De los 70 oligonucleótidos que se probaron con ADN de los 15 individuos (5 por cada población) estudiados de *S. demersa*, se utilizaron los 15 que generaron marcadores RAPD en el análisis preliminar. En la figura 10, se muestran algunos de los decámeros que generaron mayor cantidad de bandas, en el ADN de algunos individuos de *S. demersa* de las poblaciones estudiadas.

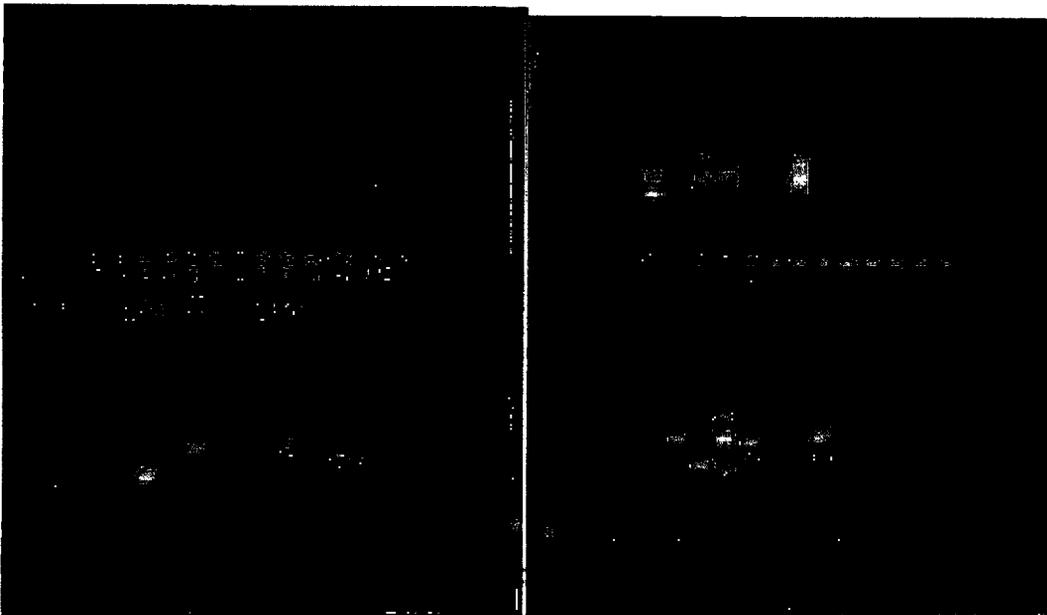


Figura 10. Se pueden observar los marcadores moleculares que se generaron a partir de algunos de los decámeros probados en el ADN obtenido a partir de *S. demersa* de las poblaciones estudiadas.

Las figuras 11 y 12 son ejemplos de geles de agarosa con los productos de la PCR (OPA 11 y OPB 10). Se pueden apreciar bandas (marcadores RAPD) teñidas con bromuro de etidio.

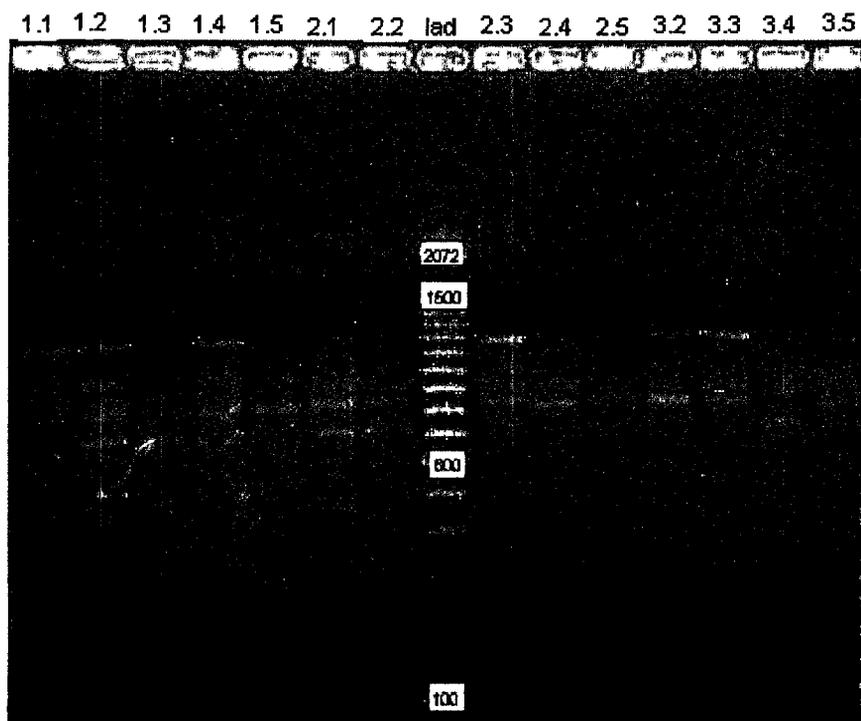


Figura 12. Ejemplo de un gel de agarosa al 2%, con el producto de la PCR del oligonucleótido OPA11. Las bandas que se encuentran numeradas, son las generadas por el marcador ("ladder"), el cual fue de 100 pares de bases (cada banda de "ladder" son 100 pb).

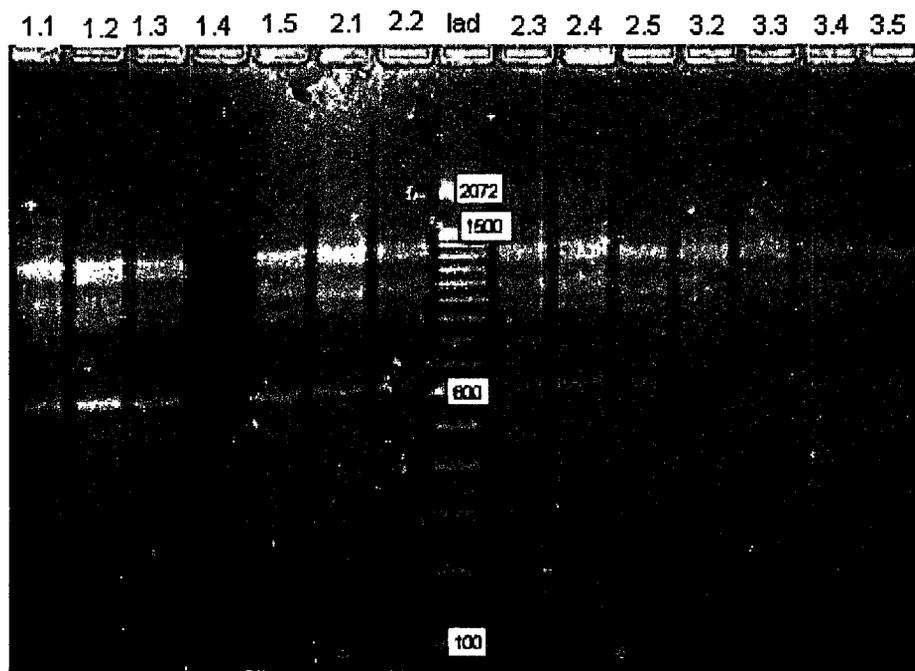


Figura 13. Producto de la PCR del oligonucleótido OPB10, en un gel de agarosa al 2%. Las bandas que se encuentran numeradas, son las generadas por el "ladder", el cual fue de 100 pares de bases (cada banda de "ladder" son 100 pb).

El fenograma (Figura 14) que se generó después de llevar a cabo el análisis de los datos con el programa estadístico, a partir de la matriz de datos (anexo III), agrupa a los individuos de cada población. Sin embargo, se forman algunos grupos que contienen individuos de diferentes poblaciones. En el fenograma, las líneas rojas corresponden a los individuos de la población La Ceja, las azules a las de la población Frente a La Ceja y las verdes corresponden a la población del Km. 29.

El fenograma agrupa a los individuos en dos grupos, uno de los cuales forma cuatro subgrupos. El grupo A, contiene a los individuos 1.1, 1.2, 1.3 y 1.4. El grupo B contiene a los siguientes subgrupos: el subgrupo B1, a los individuos 1.5, 2.1 y 2.2; el subgrupo B2, a los individuos 2.3 y 2.4; el subgrupo B3 a los individuos 2.5 y 3.5; y el subgrupo B4 a los individuos 3.2, 3.3 y 3.4. Como se aprecia en la figura 14, sólo los grupos y subgrupos que contienen individuos de la misma población son el grupo A, el subgrupo B2 y B4. Los subgrupos B1 y B3, comparten individuos de distinta población.

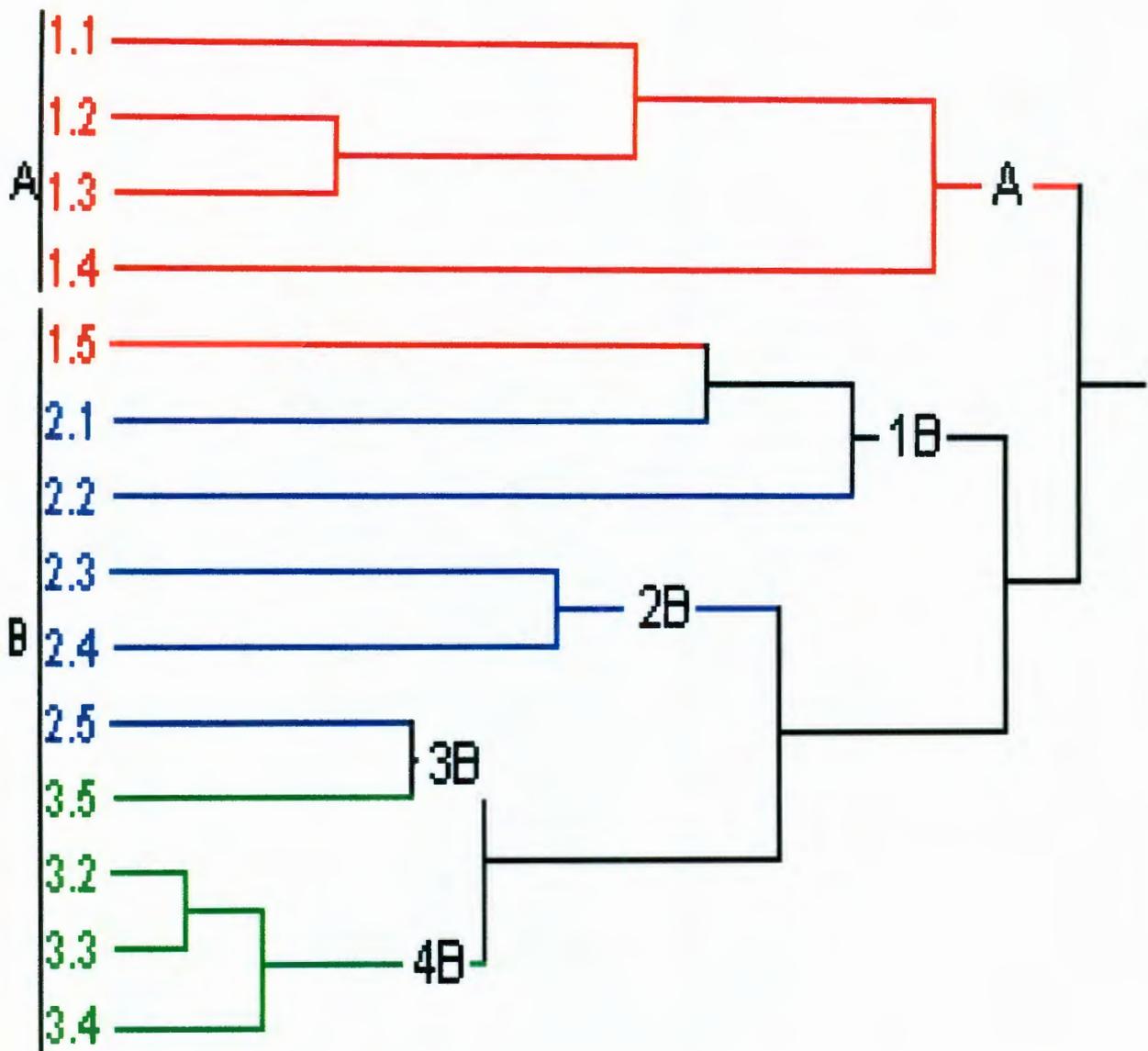


Figura 14. El fenograma agrupa a los individuos de las tres poblaciones de *S. demersa* en dos grupos (A y B), y al grupo B en cuatro subgrupos.

7. DISCUSIÓN

En algunas especies del género *Sagittaria*, la polinización es llevada a cabo por insectos generalistas (Muenchow y Delesalle, 1994) y se sabe que en algunos casos de flores que flotan sobre la superficie del agua, la polinización es llevada a cabo también por escarabajos (Lippok y col., 2000); por lo que se esperaba encontrar un patrón similar de insectos en la zona de estudio. En el caso de *S. demersa* la polinización es entomófila (Lot y col., 1999; Domínguez, 2001) sin embargo, no se sabía qué insecto la llevaba a cabo. Ya que las inflorescencias de *S. demersa* se encuentran flotando sobre la superficie del agua y nunca sobrepasan este nivel, la planta es candidata para que la polinización pueda estar relacionada con aquellos polinizadores asociados al ambiente en el cual se encuentra *S. demersa* y no únicamente con los insectos asociados a las plantas terrestres. Como se comentó en la sección 6.2, *S. demersa* tiene sólo un visitador floral, aunque también se encuentra otro insecto (aunque no es visitador) sobrevolando cerca de las flores de la planta, ambos son pertenecientes al orden de los dípteros. *Stratiomys* sp. (Stratiomyiidae), es una mosca que pone sus huevos en las colonias de algas que se forman en la superficie del agua y vuela alrededor de las flores para ahuyentar a los depredadores del lugar donde ovopositó (Jones, com. pers.). Sin embargo, en las observaciones hechas en campo durante el período de visitación, *Stratiomys* sp., no se posa sobre las flores, por lo que no se le puede considerar ni un visitador floral, como tampoco un posible polinizador de *S. demersa*.

embargo, se sabe que en Hawai hubo una colonización progresiva de las moscas de la fruta (*Drosophila*, aprox. las mismas dimensiones que el polinizador de *S. demersa*), de las islas viejas hacia las islas jóvenes (Brown y Lomolino, 1998). Lo anterior sugiere que las distancias no representan una barrera para que el polinizador pueda llevar el polen a otras poblaciones, además se tiene que considerar el hecho de que en la zona de estudio se presentan fuertes corrientes de viento, lo que representa un medio de transporte para el polinizador. Los charcos no están comunicados por una corriente de agua que pudiera llevar frutos, semillas o cormos. Observaciones personales, indican que especies de aves migratorias se establecen temporalmente en los charcos de Huimilpan, ya que estos ambientes forman parte de su ruta de migración, las cuales pueden ser una fuente de dispersión de frutos y estructuras de perennación muy importantes, al alimentarse y descansar en cada uno de los charcos de la región. Aunado a esto, como ya se ha mencionado, los sitios de estudio se encuentran bajo una fuerte presión humana, debido, entre otros factores, al pastoreo y a que son utilizados como abrevaderos para el ganado. Una vez más, si se toma en cuenta que lo que separa a las poblaciones 1 y 2 (La Ceja y Frente a La Ceja, respectivamente) es la carretera, y que la población 3 se encuentra a una distancia de 3 Km. de las otras, la distancia no representa una barrera para que el ganado lleve las estructuras de perennación a otros charcos, por lo que puede dar el flujo genético entre las poblaciones.

En el fenograma que se generó (Figura 14), se forman dos grupos definidos (A y B), el grupo B, agrupa a uno de los individuos de la población 1 y a los individuos de las poblaciones 2 y 3, en cuatro subgrupos (B1, B2, B3 y B4). El

hecho de que se formen grupos definidos significa que los individuos son genéticamente parecidos (grupo A). Sin embargo, el individuo 5 de la población 1 (1.5), comparte características de la población 2 (Frente a La Ceja), haciendo de este individuo diferente a los de su población, quedando de un subgrupo del grupo B (B1). De igual manera sucede con el individuo 5 de la población 3 (3.5), quien tiene similitud con la población 2, quedando agrupados estos dos en el subgrupo B3. Con lo anterior surgen las siguientes preguntas: ¿por qué la población 1 (La Ceja) comparte características con la población 2 (Frente a La Ceja) y no lo hace con la población 3 (Km. 29), siendo que la distancia geográfica entre el Km. 29 es casi la misma con respecto a las otras dos poblaciones? Y ¿por qué la población 2 es la única que comparte características con las otras dos poblaciones? Quizás la respuesta a estas preguntas sea que la cantidad de individuos por población con la que se hizo el análisis, no hayan sido los suficientes para que el análisis pudiera ser más concluyente, o es necesario probar un mayor número de decámeros. No obstante, si se consideran los trabajos de Keller (2000) y de Huang y col. (2001), en el que se encuentra diversidad genética (aunque baja) en poblaciones cercanas de plantas acuáticas, y además de que el flujo genético puede darse dependiendo de la interacción que hay entre poblaciones (Elam, 1996), podemos pensar que cualquier ave migratoria, vaca o caballo puedan ser los dispersores de las estructuras vegetativas de las plantas, lo que también podría explicar el que se compartan características de los individuos de diferentes poblaciones como se pudo apreciar en el fenograma de la sección 6.3.

8. CONCLUSIONES

Sagittaria demersa es polinizada por un díptero asociado a los ambientes temporales, que aparentemente utiliza las flores como un sitio seco sobre el cual puede posarse, debido a que las flores se encuentran flotando en la superficie del agua y no sobrepasan su nivel.

Aunque existen dos dípteros relacionados con el ambiente de la planta (*Stratiomys* sp. y el díptero sin determinar), sólo uno de ellos es el visitador floral y quien poliniza a las flores (el díptero sin determinar). *Stratiomys* sp. sólo hace recorridos cercanos a las flores de *S. demersa*, pero no toca las estructuras reproductivas, por lo que no se lleva el polen de las flores. Por el contrario, el díptero que no se determinó es quien poliniza las flores, ya que éste, después de volar, se posa sobre las flores y lleva el polen de una flor a otra. El polen de *S. demersa* se pega a cualquier parte del cuerpo del polinizador.

A pesar de que las tres poblaciones de *S. demersa* estudiadas están en cuerpos de agua discontinuos, no existe un patrón geográfico que indique que el flujo genético esté restringido dentro de cada población, ya que individuos de poblaciones distintas presentan algunas ligeras similitudes génicas.

La diversidad genética dentro de cada población, según el fenograma obtenido, es homogénea, y la diversidad genética existente entre cada población es diferente una de otra, aunque se comparten algunas rasgos que sugieren el intercambio de material genético entre ellas.

Es más probable que el flujo genético vía polen se presente sólo dentro de cada población, a través del díptero polinizador, y que el flujo genético entre

poblaciones se lleve a cabo por la dispersión de semillas, frutos o cormos, a través de las aves migratorias o ganado, aunque las moscas pueden estar involucradas en el intercambio genético entre las poblaciones, ya que las distancias entre ellas no representan una barrera para el tamaño del polinizador.

- INEGI. 1986. Síntesis geográfica, Nomenclator y Anexo cartográfico del estado de Querétaro. México. 144 pp.
- Lippok B., A. A. Gardine, P. S. Williamson y S. S. Renner. 2000. Pollination by flies, bees, and beetles of *Nuphar ozarkana* and *N. advena* (Nymphaeaceae). *American Journal of Botany* 87 (6): 898-902.
- Lot A. y A. Novelo. 1978. Laguna de Tecocomulco, Hidalgo. En: Guías botánicas de excursiones en México. Sociedad Botánica de México. México, p 19.
- Lot A., A. Novelo y P. Ramírez G. 1993. Diversity of Mexican aquatic vascular plant flora. En: Ramamoorthy, T. P., R. Bye y J. Fa (eds.). *Biological diversity of Mexico: origins and distribution*. Oxford University Press. Nueva York. pp. 557-591.
- Lot A., A. Novelo, M. Olvera, y P. Ramírez. 1999. Catálogo de angiospermas acuáticas de México. Cuadernos 33. Instituto de Biología. UNAM. p 19.
- Martínez M. y A. García. 2001. Flora y vegetación acuáticas de localidades selectas del estado de Querétaro. *Acta Botánica Mexicana*. 54: 1-23.
- Martínez M. y L. Hernández. 1997. Manual de prácticas de laboratorio del curso de botánica. Universidad Autónoma de Querétaro. p 70.
- Muenchow G. y V. Delesalle. 1994. Pollinator response to male floral display size in two *Sagittaria* (Alismataceae) species. *American Journal of Botany* 81 (5): 568-573.
- Hillis, D. y C. Moritz. 1990. *Molecular systematics*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. 369 – 370 pp.
- Keller B. E. M. 2000. Genetic variation among and within populations of *Phragmites australis* in the Charles river watershed. *Aquatic Botany* 66: 195-208.
- Koppitz H. 1999. Analysis of genetic diversity among selected populations of *Phragmites australis* world - wide. *Aquatic Botany* 64: 209-221.
- Otero A. A., M. De la Cruz y K. Oyama. 1997. El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. *Bol. Soc. Bot. México* 60: 85-117.
- Philbrick T. C. y D. H. Les. 1996. Evolution of aquatic angiosperm reproductive systems. *Bioscience* 46: 813-826.
- Saiki R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis y H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 239: 487-491.

- Sambrook, J. y D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, New York.
- Tingey S., J. A. Rafalski y M. K. Hanafey. 1994. Genetic Analysis with RAPD Markers. En: Coruzzi G. y P. Puigdomènech (eds.). *Plant Molecular Biology*. NATO ASI Series. Vol. H 81. Springer – Verlag Berlin Heidelberg. pp 491-498.
- Vieira M. F. y N. A. de Souza Lima. 1997. Pollination of *Echinodorus grandiflorus* (Alismataceae). *Aquatic Botany* 58: 89-98.
- Williams J. G. K., A. R. Kubelik J. Livak J. A. Rafalski y S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18: 6531-6535.
- Zamudio S., J. Rzedowski, E. Carranza y G. Calderón de Rzedowski. 1992. La vegetación en el estado de Querétaro: panorama preliminar. Instituto de Ecología A. C., México. pp. 75-78.

ANEXO I.

ACETÓLISIS (Martínez y Hernández, 1997).

Nota: Se recomienda trabajar en una campana de extracción debido a que los gases desprendidos por los ácidos son muy irritantes para las vías respiratorias.

1. Lavar el polen en ácido acético moviéndolo para eliminar el agua.
2. Centrifugar en tubos de vidrio, y guardar el ácido para el paso 7.
3. Añadir 10 ml de ácido acético anhídrico y moverlo con un tubo de vidrio.
4. Añadir 20 gotas de ácido sulfúrico concentrado. Se agrega gota por gota y moviendo con cada gota.
5. Poner en baño de agua por 5 – 15 minutos.
6. Centrifugar por 3 minutos, decantar la solución de acetólisis en un recipiente seco.
7. Añadir el ácido acético del paso 2 y centrifugar por 3 – 4 minutos.
8. Decantar con cuidado el ácido en el mismo recipiente.
9. Lavar el residuo de polen y centrifugar 4 veces. Llenar los tubos casi por completo.
10. Teñir con safranina O en agua y etanol.
11. Lavar en agua y centrifugar 2 a 3 veces.
12. Montar el polen en portaobjetos con cera.

1250a10	220a11	250a11	300a11	450a11	500a11	550a11	700a11	825a11	900a11	1100a11	1200a11	1600a11	400a18	420a18	450a18	500a18	700a18	800a18	1400a18	450b10	550b10	600b10	750b10	900b10	950b10
1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0
1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0
1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0
0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1
1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1
1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1
0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1
1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1
1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0

1000b10	1100b10	1350b10	300b11	700b11	850b11	950b11	1100b11	1200b11	1600b11	550b12	650b12	950b12	1150b12	1400b12	1500b12	1525b12	450b18	500b18	600b18	650b18	775b18	800b18	850b18	1200b18	1400b18
0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1
0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1
0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1
1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1
1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1
0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0