



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales

**DIVERSIDAD GENÉTICA DE PLANTAS ACUÁTICAS
EN LOS CHARCOS TEMPORALES DE
AMEALCO Y HUIMILPAN, QUERÉTARO**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el
grado de

DOCTOR EN CIENCIAS – RECURSOS BIÓTICOS

Presenta

EMMA FABIOLA MAGALLÁN HERNÁNDEZ

Santiago de Querétaro, Qro. Junio de 2004

No. Adq. 469698

No. Título _____

Clas. TS

581.760972453

M 188d

Ej. 1



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias-Recursos Bióticos

DIVERSIDAD GENÉTICA DE PLANTAS ACUÁTICAS
EN LOS CHARCOS TEMPORALES DE AMEALCO Y HUIMILPAN, QUERÉTARO

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Doctor en Ciencias-Recursos Bióticos

Presenta:

Emma Fabiola Magallán Hernández

Dirigido por:

Dra. Mahinda Martínez y Díaz

SINODALES

Dra. Mahinda Martínez y Díaz
Presidente

Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval
Secretario

Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa
Vocal

Dr. Carlos Fabián Vargas Mendoza
Vocal

Dr. Humberto Suzán Azpiri
Vocal

Dra. Ma. Teresa Peña Rangel
Vocal Suplente

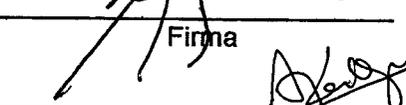
Dr. Ramón Álvar Martínez Peniche
Vocal Suplente



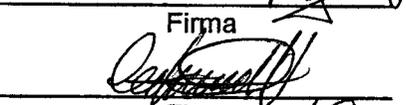
Dr. Carlos Francisco Sosa Ferreyra
Director de la Facultad de Ciencias Naturales



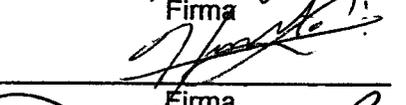
Firma



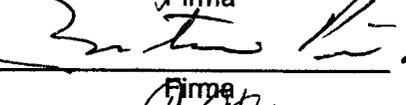
Firma



Firma



Firma



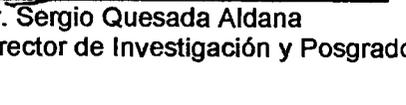
Firma



Firma



Firma



Dr. Sergio Quesada Aldana
Director de Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro.
Junio 2004
México

RESUMEN

Se estudió la estructura y diversidad genética de tres especies de plantas acuáticas: *Eriocaulon bilobatum*, *Lilaea scilloides* y *Sagittaria demersa* en humedales temporales de Amealco y Huimilpan, Querétaro. Basándose en las características ecológicas y de historia de vida registradas en la literatura para cada especie se plantearon las siguientes hipótesis: *Eriocaulon bilobatum* tendrá baja diversidad genética, alta endogamia, altos niveles de diferenciación y bajo flujo génico entre poblaciones. En *Lilaea scilloides* se esperaba alta diversidad genética, baja endogamia, poca diferenciación genética y alto flujo génico entre poblaciones. Se esperaba que *Sagittaria demersa* tuviera diversidad genética y endogamia moderada, alta diferenciación genética y bajo flujo génico entre poblaciones. Se colectaron cuarenta individuos por población y se usó la técnica de electroforesis de isoenzimas en geles de almidón para las tres especies, los datos se analizaron con el programa Biosys-1. Para *Eriocaulon* se estudiaron cuatro poblaciones, encontrándose relativamente alta diversidad genética, $A=2.32$ (A = número de alelos por locus), $P=69.65$ (P = porcentaje de loci polimórficos), $H_o=0.134$ (H_o = heterocigocidad observada) y $H_e= 0.197$ (H_e = heterocigocidad esperada). Endogamia moderada ($F_{IS}=0.312$). Poca diferenciación genética entre poblaciones ($F_{ST}=0.053$) y alto flujo génico ($Nm=4.46$). Para *Lilaea* se estudiaron doce poblaciones, encontrándose niveles promedio de diversidad genética ($A=1.78$, $P=36.9$, $H_o=0.064$ y $H_e=0.103$). Endogamia moderada ($F_{IS}=0.372$). Moderada diferenciación genética entre poblaciones ($F_{ST}=0.084$) y alto flujo génico ($Nm=2.72$). Para *Sagittaria* se estudiaron diez poblaciones, encontrándose alta diversidad genética ($A=2.73$, $P=92.7$, $H_o=0.225$ y $H_e=0.371$). Endogamia moderada ($F_{IS}=0.384$). Alta diferenciación genética entre poblaciones ($F_{ST}=0.148$) y bajo flujo génico ($Nm=1.43$). Se observó que para las tres especies no se cumplieron varias de las hipótesis planteadas, esto podría deberse a que no se conocen de manera específica otros factores de historia de vida y ecológicos de las especies o a que las hipótesis están basadas en generalizaciones hechas para plantas terrestres habiendo pocos estudios de este tipo para plantas acuáticas.

Palabras clave: Plantas acuáticas, *Eriocaulon bilobatum*, *Lilaea scilloides*, *Sagittaria demersa*, charcos temporales, diversidad genética.

SUMMARY

The diversity and genetic structure of three aquatic species *Eriocaulon bilobatum*, *Lilaea scilloides* and *Sagittaria demersa* was studied in temporary, spatially isolated ponds of Amealco and Huimilpan, Querétaro. Based on the generalizations of ecology and the life history of terrestrial plants, we hypothesized that *Eriocaulon bilobatum* would have a low genetic diversity, high inbreeding, high differentiation and low or null genetic flow between populations. For *Lilaea scilloides* we expected a high genetic diversity, low inbreeding, low differentiation and high genetic flow between populations. For *Sagittaria demersa* we hypothesized average levels of genetic diversity and inbreeding, high differentiation and low genetic flow between populations. Forty individuals per population were collected and screened with isozyme electrophoresis in starch gels. Data were analyzed in Biosys-1. For *Eriocaulon bilobatum*, four populations were analyzed, finding a high genetic diversity: $A=2.32$ (A =mean numbers of alleles per locus), $P=69.65$ (P =proportion of loci polymorphic), $H_o=0.134$ (mean observed heterozygosity), $H_e=0.197$ (mean expected heterozygosity), moderate inbreeding ($F_{IS}=0.312$), low genetic differentiation among populations ($F_{ST}=0.053$), and high genetic flow ($Nm=4.46$). *Lilaea scilloides* was screened in twelve populations, finding average levels of genetic diversity ($A=1.78$, $P=36.9$, $H_o=0.064$ y $H_e=0.103$), moderate inbreeding ($F_{IS}=0.372$), a moderate differentiation between populations ($F_{ST}=0.084$), and a high genetic flow ($Nm=2.72$). For *Sagittaria demersa* ten populations were studied, finding a high genetic diversity ($A=2.73$, $P=92.7$, $H_o=0.225$ y $H_e=0.371$), moderate inbreeding ($F_{IS}=0.384$), high genetic differentiation among populations ($F_{ST}=0.148\%$) and low genetic flow ($Nm=1.43$). Some of our hypotheses were not confirmed, which might be explained by a lack of data of their particular ecology and life history, as well as for the few genetic populations studies of aquatic plants.

Key words: Aquatic plants, *Eriocaulon bilobatum*, *Lilaea scilloides*, *Sagittaria demersa*, temporary ponds, genetic diversity.

A Dios por su cuidado y ayuda.

A mi esposo Carlos Felipe Rojas por su ayuda en todas las etapas de la
tesis y por su amor.

A mi mamá por apoyarme siempre en todo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Querétaro por el apoyo recibido para realizar mis estudios y continuar mi proceso de formación.

A la Dra. Mahinda Martínez y Díaz por haber aceptado dirigir esta tesis, por su apoyo en cada etapa de la investigación y por su amistad.

Al Dr. Luis Gerardo Hernández Sandoval por su guía y apoyo durante el tiempo de la investigación y por revisar cuidadosamente el escrito.

Al Dr. Ken Alberto Oyama por haber aceptado ser parte de mi comité tutorial y con sus valiosos comentarios y correcciones ayudar en mi formación.

Al Dr. Carlos Fabián Vargas Mendoza por revisar la tesis y ayudarme a resolver algunas dudas con respecto a la genética de poblaciones.

Al Dr. Humberto Suzán Azpiri por haber aceptado revisar la tesis y ser mi sinodal.

A la Dra. Ma. Teresa Peña Rangel, por los valiosos comentarios y correcciones en la revisión de la tesis. Por su ejemplo como investigadora y persona.

Al Dr. Ramón Álvaro Martínez Peniche por revisar la tesis y aportar valiosos comentarios para mejorar el escrito.

A la Dra. Patricia Moreno Casasola, quien fue parte importante en mi formación durante esta etapa y por revisar amablemente la tesis.

A las casi Dras. Rosaura Luna y Nidia Pérez por su gran ayuda con todo lo que tuvo que ver con la técnica y el análisis de datos. Gracias por su paciencia conmigo.

A Alejandra Beltrán por haberme ayudado en las salidas de campo y también en aquellos pesados días de laboratorio. Y por hacer mi estancia en el laboratorio más amena.

A Sandra Prado, mi amiguita, que aunque no es bióloga le encanta el campo y me ayudo en varias salidas.

A Gabriela Enriquez, Patricia Balderas, Yolanda Pantoja, Bertha Cid y Jacinto Treviño por su ayuda en algunas salidas de campo.

A mis amiguitos: Javier, Ricardo, Gabriela y Altagracia, simplemente por su amistad incondicional.

A mis compañeros del doctorado: Perla, Rosalía, Eduardo y Jacinto por los momentos agradables compartidos.

A Eleazar Carranza por su ayuda como guía para los trámites de titulación.

A mis amigas: Sandra Prado, Esther Cirnes, Beatriz Maruri, Mildred Rodríguez, Patricia Balderas y Olivia Baltazar por su apoyo y animo para seguir adelante y por sus vidas que hacen de la mía algo muy agradable.

ÍNDICE

	Pag.
REESUMEN.....	i
SUMMARY.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE.....	vi
ÍNDICE DE CUADROS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
I. INTRODUCCIÓN.....	1
A. Genética de poblaciones.....	2
B. Determinantes de la estructura y diversidad genética.....	3
C. Plantas acuáticas.....	5
II. ANTECEDENTES.....	8
A. Estudios de diversidad genética en plantas acuáticas.....	8
B. Estudios de genética de poblaciones en ecosistemas similares.....	13
C. Estudios en los charcos de Amealco y Huimilpan, Querétaro.....	14
III. HIPÓTESIS GENERAL.....	17
IV. OBJETIVOS.....	17
V. ÁREA DE ESTUDIO.....	18
A. Descripción de la zona.....	18
B. Descripción de la historia geológica.....	20
C. Características de los ecosistemas de estudio.....	23
D. Descripción y ubicación de los charcos estudiados.....	24
VI. METODOLOGÍA GENERAL.....	28
A. Métodos de campo y laboratorio.....	28
B. Análisis de datos.....	30
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
A. <i>Eriocaulon bilobatum</i>	37
1. Características principales.....	37
2. Hipótesis.....	38
3. Métodos.....	38
4. Resultados.....	39
5. Discusión.....	47

6. Conclusiones.....	54
B. <i>Lilaeae scilloides</i>	55
1. Características principales.....	55
2. Hipótesis.....	57
3. Métodos.....	57
4. Resultados.....	57
5. Discusión.....	66
6. Conclusiones.....	72
C. <i>Sagittaria demersa</i>	73
1. Características principales.....	73
2. Hipótesis.....	74
3. Métodos.....	74
4. Resultados.....	75
5. Discusión.....	83
6. Conclusiones.....	87
VIII. CONCLUSIONES GENERALES.....	88
IX. LITERATURA CITADA.....	91
X. APÉNDICES.....	99
APÉNDICE 1. Fórmulas para la preparación de los sistemas de corrimiento, buffers de extracción y tinción de enzimas.....	99
APÉNDICE 2. Ejemplo de la nomenclatura usada en la interpretación de los geles.....	107
APÉNDICE 3. Frecuencias alélicas de <i>Eriocaulon bilobatum</i>	108
APÉNDICE 4. Número de alelos por locus y número efectivo de alelos por locus para <i>Eriocaulon bilobatum</i>	110
APÉNDICE 5. Matriz de identidades y distancias genéticas de Nei para <i>Eriocaulon bilobatum</i>	110
APÉNDICE 6. Frecuencias alélicas de <i>Lilaea scilloides</i>	111
APÉNDICE 7. Número de alelos por locus para <i>Lilaea scilloides</i>	114
APÉNDICE 8. Número efectivo de alelos por locus para <i>Lilaea scilloides</i>	115
APÉNDICE 9. Matriz de identidades y distancias genéticas de Nei para <i>Lilaea scilloides</i>	116
APÉNDICE 10. Frecuencias alélicas de <i>Sagittaria demersa</i>	117
APÉNDICE 11. Número de alelos por locus para <i>Sagittaria demersa</i>	119
APÉNDICE 12. Número efectivo de alelos por locus para <i>Sagittaria demersa</i>	119
APÉNDICE 13. Matriz de identidades y distancias genéticas de Nei para <i>Sagittaria demersa</i>	120
APÉNDICE 14. Interpretación de los valores F_{ST}	121

ÍNDICE DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1. Características ecológicas y de historia de vida de las especies de plantas acuáticas que cuentan con estudios de diversidad genética.....	11
Cuadro 2. Índices de diversidad y estructura genética de algunas especies de plantas acuáticas.....	12
Cuadro 3. Características ecológicas y de historia de vida de las plantas acuáticas presentes en los charcos temporales de Amealco y Huimilpan, Querétaro.....	15
Cuadro 4. Parámetros de variación genética estimados para las cuatro poblaciones estudiadas de <i>Eriocaulon bilobatum</i>	40
Cuadro 5. Diversidad genética total (H_T), dentro (H_S) y entre (D_{ST}) subpoblaciones, y el coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}) para las poblaciones de <i>Eriocaulon bilobatum</i>	41
Cuadro 6. Índices de endogamia de <i>Eriocaulon bilobatum</i>	43
Cuadro 7. Estadísticos F de Wright para <i>Eriocaulon bilobatum</i>	44
Cuadro 8. Flujo génico entre las cuatro poblaciones locales de <i>Eriocaulon bilobatum</i>	45
Cuadro 9. Algunos aspectos de la biología floral de <i>Eriocaulon bilobatum</i>	48
Cuadro 10. Índices de diversidad genética dentro de las poblaciones locales (A, P y H_e). Diversidad genética total (H_T), y el coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}) para especies acuáticas autógamas con características de historias de vida similares a <i>Eriocaulon bilobatum</i>	50
Cuadro 11. Índices de diversidad genética dentro de las poblaciones locales (A, P y H_e). Diversidad genética total (H_T), y el coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}) para especies acuáticas entomófilas con características de historias de vida similares a <i>Eriocaulon bilobatum</i>	50
Cuadro 12. Índices de diversidad genética dentro de las poblaciones locales (A, Ae, P y H_e). Diversidad genética total (H_T), dentro (H_S) y entre (D_{ST}) subpoblaciones, y el coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}) para especies terrestres con las mismas características de historias de vida de <i>Eriocaulon bilobatum</i>	51
Cuadro 13. Parámetros de variación genética estimados para las doce poblaciones estudiadas de <i>Lilaea scilloides</i>	58
Cuadro 14. Diversidad genética total (H_T), dentro (H_S) y entre (D_{ST}) subpoblaciones, y el coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}) para las poblaciones de <i>Lilaea scilloides</i>	59
Cuadro 15. Índices de endogamia de <i>Lilaea scilloides</i>	61
Cuadro 16. Estadísticos F de Wright para <i>Lilaea scilloides</i>	63
Cuadro 17. Flujo génico entre las doce poblaciones locales de <i>Lilaea scilloides</i>	64
Cuadro 18. Algunos aspectos de la biología floral de <i>Lilaea scilloides</i>	66

Cuadro 19. Índices de diversidad genética dentro de las poblaciones locales (A, P y He). Diversidad genética total (H_T), y el coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}) para especies acuáticas con características de historias de vida similares a <i>Lilaea scilloides</i>	69
Cuadro 20. Índices de diversidad genética dentro de las poblaciones locales (A, Ae, P y He). Diversidad genética total (H_T), dentro (H_S) y entre (D_{ST}) subpoblaciones, y el coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}) para especies terrestres con las mismas características de historias de vida de <i>Lilaea scilloides</i>	69
Cuadro 21. Características de <i>Lilaea scilloides</i> que la relacionan y que contrastan con un síndrome de polinización por viento.....	70
Cuadro 22. Parámetros de variación genética estimados para las diez poblaciones estudiadas de <i>Sagittaria demersa</i>	76
Cuadro 23. Diversidad genética total (H_T), dentro (H_S) y entre (D_{ST}) subpoblaciones, y el coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}) para las poblaciones de <i>Sagittaria demersa</i>	77
Cuadro 24. Índices de endogamia de <i>Sagittaria demersa</i>	79
Cuadro 25. Estadísticos F de Wright para <i>Sagittaria demersa</i>	80
Cuadro 26. Flujo génico entre las diez poblaciones locales de <i>Sagittaria demersa</i>	81
Cuadro 27. Índices de diversidad genética dentro de las poblaciones locales (A, P y He). Diversidad genética total (H_T), y el coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}) para especies acuáticas con características de historias de vida similares a <i>Sagittaria demersa</i>	84
Cuadro 28. Índices de diversidad genética dentro de las poblaciones locales (A, Ae, P y He). Diversidad genética total (H_T), dentro (H_S) y entre (D_{ST}) subpoblaciones, y el coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}) para especies terrestres con las mismas características de historias de vida de <i>Sagittaria demersa</i>	84

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Ubicación de los municipios de Amealco y Huimilpan en el estado de Querétaro y de éste en México.....	19
Figura 2. Provincias fisiográficas del estado de Querétaro.....	19
Figura 3. Ubicación de los charcos temporales de Huimilpan, Querétaro.....	25
Figura 4. Ubicación de los charcos temporales de Huimilpan y Amealco, Querétaro.....	26
Figura 5. Población 2. Escolásticas, Huimilpan.....	27
Figura 6. Población 3. Frente al de La Ceja, Huimilpan.....	27
Figura 7. Charco temporal 5. La Ceja, Huimilpan.....	27
Figura 8. Charco temporal 10 en Amealco.....	27
Figura 9. <i>Eriocaulon bilobatum</i>	38
Figura 10. Dendrograma de identidad genética de Nei (1978), contruido mediante UPGMA, para las cuatro poblaciones locales de <i>Eriocaulon bilobatum</i>	46
Figura 11. Ubicación de las poblaciones locales analizadas para <i>Eriocaulon bilobatum</i> en Amealco y Huimilpan.....	46
Figura 12. Forma del grano de polen de <i>Eriocaulon bilobatum</i>	49
Figura 13. Apertura sincolpada en grano de polen de <i>Eriocaulon bilobatum</i>	49
Figura 14. <i>Lilaea scilloides</i> : especie enraizada emergente.....	55
Figura 15. Inflorescencia de <i>Lilaea scilloides</i> con flores emergentes.....	55
Figura 16. <i>Lilaea scilloides</i>	56
Figura 17. Dendrograma de identidad genética de Nei (1978), contruido mediante UPGMA, para las doce poblaciones locales <i>Lilaea scilloides</i>	65
Figura 18. Ubicación de las poblaciones locales analizadas para <i>Lilaea scilloides</i> en Amealco y Huimilpan.....	65
Figura 19. Tubo polínico dentro de los estilos de las flores basales de <i>Lilaea scilloides</i>	67
Figura 20. Forma, tipo de apertura y ornamentación del grano de polen de <i>Lilaea scilloides</i>	68
Figura 21. Aspecto general de <i>Sagittaria demersa</i>	73
Figura 22. Flores de <i>Sagittaria demersa</i> con mosca polinizadora.....	73

Figura 23. Dendrograma de identidad genética de Nei (1978), contruido mediante UPGMA, para las diez poblaciones locales de *Sagittaria demersa*.....**82**

Figura 24. Ubicación de las poblaciones locales analizadas para *Sagittaria demersa* en Amealco y Huimilpan.....**82**

I. INTRODUCCIÓN

Desde hace aproximadamente 40 años, tiempo en que los estudios de diversidad genética comenzaron a tener mayor auge, se han publicado una gran cantidad de estudios relacionados con esta área de la biología. Actualmente, la genética de poblaciones en plantas ha tenido un gran avance, uno de los aspectos más notables es que existen estudios donde se han analizado las relaciones entre las características ecológicas y de historias de las especies y su diversidad y estructura genética. Incluso, hay generalizaciones que permiten plantear hipótesis sobre la diversidad genética esperada, dependiendo de dichas características.

Es notable que la mayor parte de dichos estudios se han llevado a cabo en plantas terrestres y en la actualidad no existen este tipo de análisis ni generalizaciones para plantas acuáticas. Aún hay varias preguntas por responder en esta área: ¿Se pueden aplicar las mismas generalizaciones planteadas para plantas terrestres en plantas acuáticas? ¿Las características ecológicas y de historia de vida de las plantas acuáticas influyen en su estructura y diversidad genética de la misma forma que en plantas terrestres? ¿Es cierta la generalización de que las plantas acuáticas tienen baja diversidad genética? Con esta tesis se pretende contribuir al conocimiento de la genética de poblaciones en plantas acuáticas, usando como modelo tres especies con características ecológicas diferentes, no únicamente como una mera aportación de datos, sino, al ubicarla en el contexto de la teoría de genética de poblaciones tratar de aportar bases que permitan responder a dichas preguntas.

La estructura de esta tesis es la siguiente: este primer capítulo es una introducción general a la genética de poblaciones y las características de plantas acuáticas. El capítulo dos es una revisión de los estudios de diversidad genética hechos en plantas acuáticas y de los llevados a cabo en los ecosistemas de estudio (charcos temporales). El capítulo tres plantea una hipótesis general para las tres especies de estudio. El capítulo cuatro contiene los objetivos generales y específicos de la tesis. El capítulo cinco es una descripción de la zona y ecosistemas de estudio. El capítulo seis contiene los métodos usados en campo, laboratorio y análisis de datos para las tres especies. El capítulo siete, contiene tres

apartados, uno por cada especie y para cada especie se presentan sus características ecológicas y de historia de vida, una hipótesis basada en dichas características, métodos particulares, resultados, discusión y conclusiones. Por último, en el capítulo ocho se presentan conclusiones generales de la investigación y perspectivas. Al final se incluyen la literatura citada y los apéndices.

A. Genética de poblaciones

La diversidad y estructura genética son conceptos muy comunes dentro de la genética de poblaciones, el primero se refiere al porcentaje de individuos en una población que son heterocigotos y el segundo a la distribución no azarosa de alelos o genotipos en tiempo o espacio (Loveless y Hamrick 1984). Conocer cuanta diversidad genética existe en las poblaciones naturales, así como explicar su origen, mantenimiento e importancia evolutiva, es uno de los objetivos principales de la genética de poblaciones (Hartl y Clark 1997). La importancia de este conocimiento radica en que ésta constituye el potencial para los cambios evolutivos de las especies (Hamrick y Godt 1990).

Los estudios de diversidad genética empezaron a tener mayor auge a partir de los años sesenta con la aplicación de métodos moleculares para resolver problemas en genética de poblaciones. Actualmente existen varias técnicas moleculares que permiten conocerla, éstas son conocidas como “marcadores moleculares” y se basan en la detección de polimorfismos en proteínas y ADN. De acuerdo con Otero *et al.* (1997), los que se usan con más frecuencia son los RAPDs (Polimorfismos de ADN Amplificados al Azar) y la electroforesis de isoenzimas en gel ya sea de almidón, poliacrilamida, acetato de celulosa o agarosa.

Los RAPDs presentan un número mayor de loci que los que pueden obtenerse con enzimas, pero éstos son dominantes. Las isoenzimas presentan loci codominantes por lo que, además de obtener medidas de diversidad genética (al igual que con RAPDs), se puede conocer la estructura genética de las poblaciones e inferir los factores evolutivos que actúan sobre éstas. Por esta razón, el análisis de isoenzimas es quizá el método más utilizado para

entender y resolver cuestiones de genética de poblaciones en plantas. De las diferentes técnicas que existen para el análisis de isoenzimas, la electroforesis en gel de almidón es la más común debido a que ofrece más datos de aloenzimas por unidad de esfuerzo y por unidad de tiempo, además de ser relativamente más económica (Otero *et al.* 1997, Pérez y Piñero 1997).

En genética de poblaciones se entiende una "población" como un grupo de organismos de la misma especie que vive dentro de un área geográfica restringida, en donde cualquier miembro puede cruzarse potencialmente con cualquier otro miembro (Hartl y Clark 1997). Éstas, frecuentemente, se llaman "poblaciones locales", "subpoblaciones" o "poblaciones mendelianas" y son las unidades evolutivas de cualquier especie. En este estudio el término población lo usaremos para referirnos a poblaciones locales (cada charco temporal).

B. Determinantes de la estructura y diversidad genética

La diversidad y la estructura genética de las poblaciones están potencialmente afectadas tanto por procesos evolutivos como por las características ecológicas y de historia de vida de las plantas (Hamrick *et al.* 1979, Loveless y Hamrick 1984, Hamrick y Godt 1990, Hedrick 2000). Los procesos evolutivos con mayor influencia son: selección natural, endogamia, deriva génica y mutación (Hedrick 2000). Las características ecológicas y de historia de vida que se ha demostrado actúan más significativamente en las poblaciones son: rangos de distribución geográfica, tiempo generacional, modos de reproducción, sistemas de apareamiento, mecanismos de polinización, mecanismos de dispersión de semillas y estado sucesional. Además, también son importantes los factores históricos como la extinción, colonización y dispersión en las poblaciones (Hamrick *et al.* 1979, Loveless y Hamrick 1984, Hamrick y Godt 1990).

Un aspecto muy importante es que la estructura genética de las poblaciones no sólo es el resultado de las variables ecológicas actuales, sino también de variables históricas, tales como eventos de extinción, recolonización y dispersión de la población, los cuales

pueden tener un papel muy importante (Loveless y Hamrick 1984). Por lo que, tomando en cuenta aspectos históricos y conceptos de metapoblaciones, puede haber otra posible explicación a la estructura genética de las especies.

Una metapoblación se define como un sistema de poblaciones locales conectadas por dispersión (polen, semillas o propágulos), que pasan frecuentemente por procesos de extinción – colonización en escala temporal (Giles y Goudet 1997, Hanski 1997, Thrall *et al.* 2000). Se considera como una unidad evolutiva la cual tiene poblaciones locales jóvenes y viejas (Giles y Goudet 1997). Al parecer, los procesos de colonización – extinción de las metapoblaciones, incrementan la diferenciación genética entre poblaciones locales (Glover y Barrett 1987, Giles y Goudet 1997, Panell y Charlesworth 1999, Thrall *et al.* 2000). Las poblaciones locales que han sido colonizadas más recientemente tienen niveles más bajos de variación genética y más altos de diferenciación entre poblaciones, que las poblaciones locales que han sido colonizadas anteriormente (Panell y Charlesworth 1999).

Los estudios hechos por Hamrick *et al.* (1979), Loveless y Hamrick (1984) y Hamrick y Godt (1990), son contribuciones relevantes en el campo de la genética de poblaciones. Ellos demostraron la relación existente entre las características ecológicas y de historia de vida de las plantas con respecto a su diversidad y estructura genética, e hicieron algunas generalizaciones al respecto. Por ejemplo, se espera que especies con distribución amplia, reproducción cruzada, polinización por viento y tiempo generacional largo presenten mayor variación genética que aquellas con características opuestas. Gracias a estos estudios, actualmente es posible hacer hipótesis acerca de la posible diversidad y estructura genética para especies de las que se conocen algunas de sus características ecológicas. Sin embargo, las generalizaciones propuestas por estos autores se basan principalmente en estudios de plantas terrestres, esto se debe a que existen relativamente pocos estudios de genética de poblaciones para plantas acuáticas.

C. Plantas acuáticas

Los estudios de plantas acuáticas se han enfocado en áreas como la anatomía, morfología, fisiología, sistemática y ecología, conociéndose muy poco de su genética de poblaciones y evolución. La mayoría de los estudios de genética de poblaciones en plantas acuáticas se han orientado a especies con forma de vida emergente y reproducción sexual, y los datos existentes para especies con características ecológicas y formas de vida diferentes aún son escasos (Barrett *et. al* 1993).

Las plantas acuáticas presentan una amplia diversidad taxonómica, ecológica y morfológica (Barrett *et. al* 1993). Aunque, de manera tradicional, se consideran como un grupo biológicamente unificado, en realidad son un conjunto de especies extremadamente heterogéneo que sobrevive en hábitats similares pero como resultado de diferentes rutas evolutivas (Philbrick y Les 1996). Las hidrófitas tienen amplia variedad tanto en formas de vida como en modos de reproducción, polinización y dispersión, los cuales están directamente relacionados con la diversidad y estructura genética de sus poblaciones.

De acuerdo con Sculthorpe (1967), las plantas acuáticas presentan las siguientes formas de vida: enraizadas emergentes, enraizadas de hojas flotantes, enraizadas sumergidas, libres flotadoras y libres sumergidas. Cada forma de vida representa diferentes grados de adaptación de la vida terrestre a la acuática y está estrechamente relacionada con otras características reproductivas y de historias de vida (Philbrick y Les 1996).

Como en las plantas terrestres, la reproducción en plantas acuáticas puede dividirse de manera general en mecanismos asexuales y sexuales. La reproducción asexual incluye tanto la agamospermia (producción de embrión sin fecundación) como la reproducción vegetativa (bulbos, cormos, estolones, fragmentación, rizomas, pseudoviviparí, tubérculos y turiones). La reproducción sexual incluye los procesos de floración, polinización y producción de semillas. Aunque frecuentemente se presenta una combinación entre reproducción sexual y asexual, se ha sugerido que la frecuencia de la reproducción vegetativa en plantas acuáticas puede ser más alta que en plantas terrestres y que incluso

puede presentar más de una estrategia a la vez (Sculthorpe 1967, Richards 1986, Philbrick y Les 1996).

La reproducción vegetativa es muy frecuente y tiene mucho éxito en plantas acuáticas, por lo que se considera el modo de reproducción dominante (Sculthorpe 1967, Philbrick y Les 1996). Ésta confiere a las hidrófitas varias ventajas: alta capacidad de dispersión por medio de propágulos clonales, incremento numérico rápido y persistencia, pero al mismo tiempo se espera que las poblaciones tengan baja diversidad genética. Esto se debe a que la asexualidad generalmente se asocia tanto con uniformidad y baja diversidad genética como con bajo potencial evolutivo (Silander 1985). Si las poblaciones presentan reproducción vegetativa abundante, es probable que las mutaciones somáticas sean el principal recurso de variación genética en plantas acuáticas (Eckert 1999).

Las flores de la mayoría de las angiospermas acuáticas están adaptadas a la vida aérea, reflejando su herencia terrestre, tienen los mismos sistemas de polinización observados en plantas terrestres que involucran tanto al viento como a los insectos (Sculthorpe 1967). Sin embargo, existe un medio de polinización único en plantas acuáticas: hidrofilia (polinización por agua), la cual acentúa la importancia de la reproducción sexual en la evolución de las acuáticas (Barrett *et al.* 1993). En plantas acuáticas polinizadas por viento e insectos es posible que existan los mismos patrones de diversidad genética que para plantas terrestres (alta diversidad en especies anemófilas y media en especies entomófilas). Es posible que las especies con hidrofilia presenten baja diversidad genética dentro de las poblaciones y alta diferenciación entre éstas, debido a que es poco probable que exista flujo génico por polen entre los cuerpos de agua (Laushman 1993, Hollingsworth *et al.* 1995).

La mayoría de las plantas acuáticas presentan una alta capacidad de dispersión que les confiere la reproducción vegetativa, aunque también pueden dispersarse a larga distancia por medio de semillas (Barrett *et al.* 1993). Tanto los propágulos vegetativos como las semillas pueden dispersarse por medio de aves, viento, corrientes y actividades antropogénicas (Sculthorpe 1967). El movimiento de plantas completas, semillas y

estructuras como turiones, fragmentos, rizomas, entre otros, permite que exista flujo génico entre poblaciones. Cuando se presenta flujo génico extensivo por medio de estructuras vegetativas, se espera que las poblaciones locales sean genéticamente muy parecidas. Esto es porque se asume que el flujo génico tiende a homogeneizar las poblaciones, aunque el efecto real dependerá tanto de otras fuerzas evolutivas como de las características de la especie (Barrett *et al.* 1993, Hedrick 2000).

Los estudios en hidrófitas han mostrado un patrón general de baja diversidad genética dentro de las poblaciones y alta diferenciación genética entre poblaciones (Barrett *et al.* 1993, Laushman 1993, Hollingsworth *et al.* 1995, Caplen y Werth 2000, Edwards y Sharitz 2000, Iida y Kadono 2000, Lienert *et al.* 2002). También existen algunos estudios que muestran que las poblaciones de plantas acuáticas no siempre presentan baja diversidad genética (Philbrick y Les 1996, Edwards y Sharitz 2000). Probablemente estos resultados reflejen la gran heterogeneidad en cuanto a las formas de crecimiento, historias de vida y sistemas reproductivos de plantas acuáticas (Barrett *et al.* 1993).

II. ANTECEDENTES

A. Estudios de diversidad genética en plantas acuáticas

Existen relativamente pocos estudios sobre la diversidad genética y evolución de las plantas acuáticas, especialmente en comparación con la cantidad de investigaciones desarrolladas en plantas terrestres (Les 1991, Barrett *et al.* 1993, Laushman 1993, Hollingsworth *et al.* 1995, Elam 1998). Quizá uno de los trabajos más completos al respecto es el de Barrett *et al.* (1993) quienes hacen una revisión de los estudios de isoenzimas llevados a cabo hasta entonces en plantas acuáticas. En ésta se muestra una lista de 81 taxa con datos cualitativos de su diversidad genética y se menciona que de éstos, únicamente 44 se estudiaron en un contexto de genética de poblaciones y los demás eran estudios taxonómicos. De estos 44 taxa, 33 presentaban forma de vida enraizada emergente y reproducción no clonal. Los datos de estos 33 taxa con forma de vida enraizada emergente reflejaron patrones de variación genética asociados con sus sistemas de reproducción e historias de vida (al igual que en plantas terrestres). Por lo que, al menos para esta forma de vida, estos factores influyeron más en su estructura genética que el hecho de vivir en ambientes acuáticos (Barrett *et al.* 1993).

Para la presente investigación (tesis), se hizo una revisión de los estudios encontrados acerca de diversidad genética en plantas acuáticas. Se muestran los datos tanto de características ecológicas y de historias de vida (Cuadro 1), como de diversidad genética (Cuadro 2) para 24 especies. Solamente se tomaron en cuenta los estudios que usaron como técnica la electroforesis de isoenzimas y presentaron datos cuantitativos, esto con el fin de poder compararlos.

En el Cuadro 1, se observa que el 50 % de los estudios sobre diversidad genética se han llevado a cabo en sólo una forma de vida, enraizada emergente, mientras que el otro 50 % incluye tres formas de vida: enraizada sumergida (37.5 %), libre sumergida (8.3 %) y hojas flotantes (4.2 %). No se encontraron investigaciones en libres flotadoras. Las especies perennes han sido mucho más estudiadas (83.3 %) que las anuales (16.7 %). Las de

distribución cosmopolita, amplia o regional representan 75 % y las de distribución restringida o consideradas como raras o en peligro de extinción 25 %. Las que tienen al mismo tiempo reproducción sexual y asexual, representan 76.2 %, mientras que las que muestran únicamente una estrategia de reproducción son 23.8 %. Las especies hidrófilas representan 31.8 %, las entomófilas 27.3 %, las autógamas 22.7 % y las anemófilas 18.2 %. La mayoría de las especies (45.8 %) presentan más de un tipo de diáspora. Casi todas son hidrocoras (79.2 %) y únicamente el 4.2 % son anemocoras. Todos estos datos fueron tomados de las publicaciones citadas en el Cuadro 1.

Al analizar los índices de diversidad y estructura genética que se presentan en el Cuadro 2, se observa que existe un patrón general de baja diversidad genética dentro de las poblaciones (A=número de alelos por locus, P=porcentaje de loci polimórficos, H_o =heterocigosidad observada y H_e =heterocigosidad esperada) y alta diferenciación entre poblaciones (G_{ST}). Aunque también existen algunas especies con relativamente alta diversidad como *Carex basianta*, *C. willdenowii*, *Limnanthes alba*, *Phragmites australis*, *Sagittaria isoetiformis*, *S. teres*, *Swertia perennis* y *Thypa minima*, y otras sin diferenciación entre poblaciones como *Hydrilla verticillata*, *Isoetes echinospora* y *Posidonia ostenfeldii*. Además, la mayoría de los datos (81.8 %) del índice de endogamia (F) tiene valores positivos y mayores de cero, lo cual indica algún grado de endogamia y, por lo tanto, seguramente baja recombinación sexual.

Al tratar de relacionar la diversidad genética con las características ecológicas y de historias de vida de las especies (Cuadros 1 y 2), únicamente se observó relación entre la alta diversidad genética y la polinización entomófila y anemófila y cuando las diásporas son semillas. No se encontró alguna relación clara o determinante con las demás características. Esto seguramente se debe a que, a pesar de la gran heterogeneidad en cuanto a las formas de crecimiento, historias de vida y sistemas reproductivos de plantas acuáticas (Barrett *et al.* 1993), la mayoría de los estudios se han llevado a cabo en especies con características ecológicas y de historia de vida similares (Cuadro 1).

Con lo anterior, es posible concluir que los estudios de diversidad genética hechos hasta el momento en plantas acuáticas aún resultan insuficientes como para hacer alguna generalización. Sólo se ha estudiado una pequeña parte de la amplia gama de características ecológicas y de historia de vida que muestran. Por ejemplo, no se encontraron estudios en especies con forma de vida libre flotadora, prácticamente no existen datos para especies anuales o con distribución restringida (endémicas) y los estudios en acuáticas con polinización y dispersión por viento son muy pocos. Por lo tanto, resulta interesante llevar a cabo este tipo de estudios en plantas acuáticas con historias de vida y características ecológicas diferentes.

Cuadro 1. Características ecológicas y de historias de vida de las especies de plantas acuáticas que cuentan con estudios de diversidad genética

Taxon	Forma de vida	Tiempo generac.	Distribución	Reproducción	Flores	Polinización	Diásporas	Dispersión	Referencias
1. <i>Carex basiantha</i>	EE	Perenné	Regional	AR, S	M	Anemófila	S	H, Z	Ford <i>et al.</i> 1998
2. <i>Carex superata</i>	EE	Perenné	Restringida	AR, S	M	Anemófila	S	H, Z	Ford <i>et al.</i> 1998
3. <i>Carex willdenowii</i>	EE	Perenne	Regional	AR, S	M	Anemófila	S	H, Z	Ford <i>et al.</i> 1998
4. <i>Ceratophyllum demersum</i>	LS	Perenne	Cosmopolita	AF, S	M	Hipohidrófila	F, FU, ME	H, Z	Les 1991, Lot <i>et al.</i> 1999
5. <i>Ceratophyllum echinatum</i>	LS	Perenne	Restringida	AF, S	M	Hipohidrófila	F, FU, ME	H, Z	Les 1991
6. <i>Eichhornia paniculata</i>	EE	Perenne	Amplia	AE, AF, S	H		F, S	H	Glover y Barrett 1987
A. Brasil					3 formas de estilo	Entomófila			
B. Jamaica					2 formas de estilo	Autógama			
7. <i>Hydrilla verticillata</i>	ES	Perenne	Cosmopolita	AF	No se observaron	Epihidrófila	F	H, Z	Lot <i>et al.</i> 1999
8. <i>Isoetes echinospora</i>	ES	Perenne	Regional	S	Afín a Pteridofita		Esporas	H, Z	Caplen y Werth 2000
9. <i>Isoetes flaccida</i>	ES	Perenne	Regional	S	Afín a Pteridofita		Plantulas	H, Z	Caplen y Werth 2000
10. <i>Isoetes mattaponi</i>	ES	Perenne	Regional	S	Afín a Pteridofita			H, Z	Caplen y Werth 2000
11. <i>Limnanthes alba</i>	EE	Anual	Regional	S	H	Entomófila	S	?	Hickman 1993 y Elam 1998
12. <i>Limnanthes bakeri</i>	EE	Anual	Restringida	SA	H	Dos tipos: E. y A.	S	?	Hickman 1993 y Elam 1998
13. <i>Limnanthes floccosa</i>	EE	Anual	Restringida	SA	H	Autógama	S	?	Hickman 1993 y Elam 1998
14. <i>Najas marina</i>	ES	Anual	Amplia	AF, S	D	Hipohidrófila	FU	H	Triest 1989
15. <i>Phragmites australis</i>	EE	Perenne	Cosmopolita	AC	No se observaron	No existe	?	?	Pellegrin y Hauber 1999
16. <i>Podostemum ceratophyllum</i>	ES	Perenne	Regional	AC, S	H	Autógama	F, S	H, O	Philbrick y Crow 1992
17. <i>Posidonia ostenfeldii</i>	ES	Perenne	Amplia	AR, S	M	Hipohidrófila	FU, R	H	Campey <i>et al.</i> 2000
18. <i>Potamogeton coloratus</i>	HF	Perenne	Regional	AR, S	M	Autógama	R	H	Hollingsworth <i>et al.</i> 1995
19. <i>Sagittaria isoetiformis</i>	EE	Perenne	Restringida	AR, S	M	Entomófila	C	H, O	Edwards y Sharitz 2000
20. <i>Sagittaria teres</i>	EE	Perenne	Restringida	AR, S	M	Entomófila	C	H, O	Edwards y Sharitz 2000
21. <i>Swertia perennis</i>	EE	Perenne	Regional	AC, S	M	Entomófila	S	?	Lienert <i>et al.</i> 2002
22. <i>Typha minima</i>	EE	Perenne	Regional	AR, S	M	Anemófila	FU, R	A, H	Galeuchet <i>et al.</i> 2002
23. <i>Vallisneria americana</i>	ES	Perenne	Amplia	AE, AF, S	D	Epihidrófila	F, FU, ME, S	H	Laushman 1993
24. <i>Zostera marina</i>	ES	Perenne	Regional	AR, AF, S	M	Epihidrófila	R, S	H	Laushman 1993

Forma de vida. EE=Enraizada emergente, HF= Hojas flotantes, ES= Enraizada sumergida y LS= Libre sumergida

Reproducción. AC= Asexual clonal, AE= Asexual por medio de estolones, AF= Asexual por medio de fragmentos, AR= Asexual por medio de rizomas
S=Sexual y SA= Sexual pero autógama

Flores. D= Dioicas, H= Hermafroditas, M= Monoicas

Diásporas. C= Cormos, F= Fragmentos, FU= Frutos, ME= Meristemos especializados, R= Rizomas, S= Semillas

Dispersión. A= Anemocora, H= Hidrocora, O= Ornitorcora, Z= Zoocora

Cuadro 2. Índices de diversidad y estructura genética de algunas especies de plantas acuáticas.

Taxon	A	P	Ho	He	F	H _T	G _{ST}	I	Referencias
1. <i>Carex basiantha</i>	1.46	40.21	0.189	0.138		0.156	0.114	0.975	Ford <i>et al.</i> 1998
2. <i>Carex superata</i>	1.26	21.56	0.114	0.071		0.072	0.011	0.998	Ford <i>et al.</i> 1998
3. <i>Carex willdenowii</i>	1.50	40.00	0.237	0.148		0.177	0.167	0.957	Ford <i>et al.</i> 1998
4. <i>Ceratophyllum demersum</i>	1.22	20.00	0.076	0.064		0.156	0.580	0.890	Les 1991
5. <i>Ceratophyllum echinatum</i>	1.07	7.00	0.071	0.036					Les 1991
6. <i>Eichhornia paniculata</i>									
A. Brasil	1.27	23.80	0.078	0.090	0.088	0.150	0.400	0.915	Glover y Barrett 1987
B. Jamaica	1.07	7.60	0.020	0.030	0.275	0.060	0.570	0.951	Glover y Barrett 1987
7. <i>Hydrilla verticillata</i>	1.00	0.00	0.000	0.000			0.000	1.000	Hofstra <i>et al.</i> 2000
8. <i>Isoëtes echinospora</i>	1.00	0.00	0.000	0.000			0.000	1.000	Caplen y Werth 2000
9. <i>Isoëtes flaccida</i>	1.40	22.90	0.072	0.093	0.225		0.607	0.779	Caplen y Werth 2000
10. <i>Isoëtes mattaponi</i>	1.25	21.90	0.062	0.069	0.101		0.272	0.948	Caplen y Werth 2000
11. <i>Limnathes alba</i>	2.04	63.00						0.963	Elam 1998
12. <i>Limnathes bakeri</i>	1.20	22.00		0.114		0.180			Elam 1998
13. <i>Limnathes floccosa</i>	1.43	23.00		0.003		0.082	0.963		Elam 1998
14. <i>Najas marina</i>	1.05	4.18	0.017	0.015	-0.133				Triest 1989
15. <i>Phragmites australis</i>	1.24	24.98	0.248	0.135				0.722	Pellegrin y Hauber 1999
16. <i>Podostemum ceratophyllum</i>	1.07	5.27	0.032	0.024	-0.333	0.162	0.846	0.772	Philbrick y Crow 1992
17. <i>Posidonia ostenfeldii</i>	1.00	0.00	0.000	0.000			0.000	1.000	Campey <i>et al.</i> 2000
18. <i>Potamogeton coloratus</i>	1.02	1.80	0.001	0.077	0.857		0.702		Hollingsworth <i>et al.</i> 1995
19. <i>Sagittaria isoetiformis</i>	2.33	67.61	0.209	0.218	0.041	0.425	0.388	0.750	Edwards y Sharitz 2000
20. <i>Sagittaria teres</i>	2.19	48.21	0.079	0.101	0.217	0.237	0.261	0.890	Edwards y Sharitz 2000
21. <i>Swertia perennis</i>	1.53	42.50	0.113	0.139	0.187		0.128	0.958	Lienert <i>et al.</i> 2002
22. <i>Typha minima</i>	1.50		0.117	0.146	0.199			0.970	Galeuchet <i>et al.</i> 2002
23. <i>Vallisneria americana</i>	1.40	38.50		0.085			0.457		Laushman 1993
24. <i>Zostera marina</i>	1.30	18.30		0.063			0.107		Laushman 1993

Diversidad genética dentro de las poblaciones. A= Promedio de alelos por locus, P= Porcentaje de loci polimórficos,

Ho= Heterocigosidad observada, He= Heterocigosidad esperada.

F= Índice de Endogamia, H_T= Heterocigosidad total, G_{ST}=Diversidad genética entre poblaciones,

I= Identidad genética

Los espacios en blanco son datos no registrados en la literarura.

B. Estudios de genética de poblaciones en ecosistemas similares

Uno de los estudios más completos acerca de genética de poblaciones en este tipo de ecosistemas es el que llevó a cabo Elam (1998). Examina cómo influyen la deriva génica, la endogamia, el flujo génico y la selección natural en la estructura genética de las especies de las "charcas de primavera", que son muy similares a los charcos temporales de Amealco y Huimilpan. Probablemente las características más notables de ambos ecosistemas son que se distribuyen a manera de "islas" dentro de un ambiente terrestre y el grado de endemismo que presentan (Elam 1998, Martínez¹ comunicación personal).

La deriva génica es un proceso que influye de manera importante en estos ecosistemas, ya que comúnmente las especies presentan poblaciones pequeñas y/o las poblaciones sufren fluctuaciones drásticas en su tamaño. Estas fluctuaciones en el tamaño de las poblaciones se deben a la marcada estacionalidad. Por esta razón, se esperan niveles reducidos de variación genética y niveles altos de diferenciación entre poblaciones (Elam 1998).

En lo referente a la endogamia, Elam (1998) menciona que es mejor hacer las predicciones con referencia a cada uno de los taxa y con conocimiento específico de sus sistemas de reproducción. En cuanto al flujo génico, menciona que no existe un patrón general. Las medidas y observaciones directas del movimiento de polen y semillas implican un flujo génico relativamente restringido y al usar datos de marcadores moleculares como las isoenzimas u otros, se ha encontrado que sí existen altos niveles de flujo génico.

La selección natural es un proceso que puede influir de manera importante en estos ecosistemas. Si existen diferencias ambientales, tanto dentro como entre las poblaciones, se pueden formar "razas" o "biotipos. Varios estudios muestran que, en estos ecosistemas, el tipo de suelo puede ser un fuerte agente de selección natural en plantas de vida corta. Por lo que, si existe diferenciación genética, ya sea dentro o entre poblaciones, es posible que el

¹ Dra. Mahinda Martínez y Díaz. Laboratorio de Botánica. Universidad Autónoma de Querétaro. México.

origen sea la selección natural, aunque esto depende de la manera en que las demás fuerzas evolutivas estén influyendo (Elam 1998).

C. Estudios en los charcos de Amealco y Huimilpan Querétaro

Zamudio *et al.* (1992) llevaron a cabo los primeros estudios florísticos de los charcos, presentando un listado de 31 especies. Martínez y García (2001) hicieron trabajos sobre la vegetación acuática de Querétaro, presentando una lista de 33 especies de plantas acuáticas para la zona (Cuadro 3). Los resultados de este estudio muestran que estos ecosistemas son los más diversos en cuanto a plantas acuáticas vasculares en todo el estado y presentan una composición florística muy similar entre ellos. Además, son importantes refugios de fauna acuática.

Sánchez (2001) estudió las estructuras de perennación en las plantas acuáticas de uno de los charcos. Debido a que se trata de ambientes temporales, resultó interesante conocer cuáles son los mecanismos que permiten a las plantas sobrevivir en la época de sequía y volver a crecer y reproducirse en la siguiente época de inundaciones. Encontró siete diferentes estructuras de perenación (esporas, semillas, frutos, turiones, rizomas, estolones y cormos) y dos mecanismos que no tienen que ver con alguna estructura en sí, la fragmentación y el enanismo. Las estructuras que resultaron más abundantes fueron las esporas de *Isoëtes mexicana*. Cid (2003) investigó los cambios temporales que sufre la vegetación en dos charcos de la zona. Los estudios mencionados son tesis de licenciatura aún no publicadas.

A partir del listado florístico presentado por Martínez y García (2001) se llevó a cabo una revisión de las principales características ecológicas y de historias de vida de cada una de las especies (Cuadro 3):

Cuadro 3. Características ecológicas y de historias de vida de las plantas acuáticas presentes en los charcos temporales de Amealco y Huimilpan, Querétaro.

Taxon	Forma de vida	Tiempo generac.	Distribución	Reproducción	Flores	Polinización	Diásporas	Dispersión
1. <i>Azolla filiculoides</i>	LF	Anual	Amplia	AC, S		Afin a Pteridofita	Esporas	H, Z
2. <i>Bacopa rotundifolia</i>	HF	Anual	Amplia	SA		H Entomófila	S	H
3. <i>Berula erecta</i>	EE	Perenne	Amplia	AE, S		H Entomófila	FU	H, Z
4. <i>Callitriche heterophylla</i>	HF	Anual	Regional	S		M Anemófila	FU, S	H, Z
5. <i>Crassula aquatica</i>	ES	Anual	Amplia	AF, S		H Entomófila o Autógama	F, S	H
6. <i>Cyperus niger</i>	EE	Perenne	Amplia	AR, S		H Anemófila	FU	?
7. <i>Cyperus sesleroides</i>	EE	Perenne	Amplia	AR, S		H Anemófila	FU	?
8. <i>Elatine brachysperma</i>	EE	Anual	Amplia	SA		H ?	?	?
9. <i>Eleocharis acicularis</i>	EE	Anual	Amplia	AR, S		H Anemófila	FU, S	Z
10. <i>Eleocharis densa</i>	EE	Anual	Amplia	AR, S		H Anemófila	R, S	Z
11. <i>Eleocharis macrorhachya</i>	EE	Anual	Amplia	AR, S		H Anemófila	R, S	Z
12. <i>Eriocaulon bilobatum</i>	EE	Anual	Restringida	AR, S		M Entomófila o Autógama	S	?
13. <i>Heteranthera peduncularis</i>	EE	Anual	Regional	S		H Entomófila	S	H, O
14. <i>Heteranthera rotundifolia</i>	EE	Anual	Amplia	S		H Entomófila	S	H, O
15. <i>Hydrocotyle ranunculoides</i>	EE	Perenne	Amplia	AR, S		H Entomófila	S	?
16. <i>Hydrochloa caroliniensis</i>	HF	Anual o Perenne	Regional	AE, S		M Anemófila	C, R	?
17. <i>Isoetes mexicana</i>	ES	Perenne	Restringida	S		Afin a Pteridofita	Esporas	H, Z
18. <i>Jaegeria glabra</i>	EE	Anual	Restringida	S		H Entomófila	FU	H, Z
19. <i>Lemna aequinoctialis</i>	LF	Perenne	Amplia	AC, S		M Entomófila	FU, ME, S	H, O
20. <i>Lilaea scilloides</i>	EE	Anual	Amplia	AC, S		H, M Anemófila	FU, S	H, O
21. <i>Limosella aquatica</i>	EE	Anual	Cosmopolita	AE, S		H Entomófila o Autógama	S	H
22. <i>Ludwigia peploides</i>	EE	Perenne	Amplia	AE, S		H Entomófila	R, S	H
23. <i>Marsilea mollis</i>	HF	Anual o Perenne	Amplia	AR, S		Afin a Pteridofita	Esporocarpo	H, Z
24. <i>Myriophyllum hippuroides</i>	ES	Anual o Perenne	Amplia	AF		D Anemófila	FU	H, Z
25. <i>Najas guadalupensis</i>	ES	Anual	Amplia	AF, S		M Hipohidrófila	FU, S	H
26. <i>Nymphoides fallax</i>	HF	Perenne	Regional	AR, S		H Entomófila	S	H, O, Z
27. <i>Polygonum mexicanum</i>	EE	Anual	Regional	AR, S		H Entomófila	FU, S	H, Z
28. <i>Potamogeton diversifolius</i>	HF	Perenne	Amplia	AR, S		H Anemófila	FU, ME	H, O
29. <i>Rorippa mexicana</i>	EE	Anual	Regional	S		H Entomófila	S	?
30. <i>Sagittaria demersa</i>	EE	Anual	Restringida	AR, S		M Entomófila	C, R, S	H, Z
31. <i>Tagetes pringlei</i>	EE	Anual	?	S		H Entomófila	FU	?
32. <i>Utricularia perversa</i>	LS	Anual	Restringida	AF, S		H Entomófila	ME, S	A, H, Z
33. <i>Zannichellia palustris</i>	ES	Anual	Cosmopolita	S		M Hipohidrófila	FU	H, Z

Referencias. Lista de especies: Martínez y García (2001), Características ecológicas y de historias de vida: Sculthorpe 1967, Stodola 1967,

Bonilla-Barbosa y Novelo 1995, Moran 1995, Calderón 1996, Cook 1996, Lot *et al.* 1999, Novelo y Lot 2001 y Sánchez 2001

Forma de vida. EE=Enraizada emergente, HF= Hojas flotantes, ES= Enraizada sumergida, LF= Libre flotadora y LS= Libre sumergida

Reproducción. AC= Asexual clonal, AE= Asexual por medio de estolones, AF= Asexual por medio de fragmentos, AR= Asexual por medio de rizomas

S=Sexual y SA= Sexual pero autógama. **Flores.** D= Dioicas, H= Hermafroditas, M= Monoicas. **Diásporas.** C= Cormos, F= Fragmentos, FU= Frutos,

ME= Meristemos especializados, R= Rizomas, S= Semillas. **Dispersión.** A= Anemocora, H= Hidrocora, O= Ornitocora, Z= Zoocora.

Al analizar los datos presentados en el Cuadro 3, uno de los aspectos más sobresalientes fue que algunas de las especies tienen una distribución restringida al centro de México (endémicas) y esto es notorio debido a que la mayoría de las plantas acuáticas presentan alta capacidad de dispersión (Sculthorpe 1967). Estas especies están registradas en la literatura como raras y/o con distribución discontinua y esporádica. Además, algunas especies presentan características ecológicas y de historias de vida que no se han tomado en cuenta en los estudios de diversidad genética y, al mismo tiempo, se encuentran en varios de los charcos temporales. Por ello, resultan objetos ideales de estudio para cuestiones de genética de poblaciones. Estas especies son:

1. *Eriocaulon bilobatum* Morong. Distribución restringida, discontinua y esporádica, escasa y vulnerable a la extinción, anual, entomófila o autógama.
2. *Sagittaria demersa* J.G.Sm. Distribución restringida, discontinua y esporádica, endémica de México, considerada como rara, anual y entomófila.
3. *Lilaea scilloides* (Poir.) Hauman. Distribución amplia, anual, anemófila. Con características florales poco comunes.

III. HIPÓTESIS GENERAL

Debido a que *Eriocaulon bilobatum*, *Lilaea scilloides* y *Sagittaria demersa* presentan forma de vida enraizada emergente, es probable que sus características ecológicas y de historias de vida (como tipo de reproducción, polinización, dispersión y distribución, entre otras) influyan en su estructura y diversidad genética de forma similar que para plantas terrestres.

IV. OBJETIVOS

A. Objetivo general

Determinar la estructura y diversidad genética de *Eriocaulon bilobatum*, *Lilaea scilloides* y *Sagittaria demersa* en los diferentes charcos temporales de Amealco y Huimilpan, Querétaro.

B. Objetivos específicos

- Estimar los niveles de variación genética poblacional de *Eriocaulon bilobatum*, *Lilaea scilloides* y *Sagittaria demersa*.
- Determinar la diversidad genética dentro y entre poblaciones de las tres especies.
- Estimar los niveles de endogamia en las poblaciones de las tres especies.
- Conocer la estructura genética de las tres especies.
- Estimar los niveles de flujo génico entre las poblaciones de cada especie.
- Evaluar la diferenciación genética entre las poblaciones de cada especie.

V. AREA DE ESTUDIO

A. Descripción de la zona

Fisiografía

Los charcos temporales se encuentran en los municipios de Amealco y Huimilpan al suroeste del estado de Querétaro, en la parte central del país (Fig. 1). La zona pertenece a la provincia fisiográfica denominada "Faja Volcánica Transmexicana", que se extiende en la parte central y sur del estado, ocupando una superficie que alcanza 46 % del territorio (Fig. 2) (Caballero 1995). La zona de Amealco pertenece a la subprovincia denominada "Llanuras y sierras de Querétaro e Hidalgo", su sistema de topofomas es sierra de escudos volcánicos. En Huimilpan, los charcos temporales se localizan en la subprovincia "Mil cumbres", con un sistema de topofomas de valle de laderas tendidas (SPP 1981). Este tipo de ambientes acuáticos se establecen en terrenos planos a ligeramente ondulados con pendientes menores de 8 % (INEGI 1982).

Geología

En Querétaro, la Faja Volcánica Transmexicana 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 (Caballero 1995). De forma específica, los charcos temporales se encuentran en una zona conformada por rocas de origen ígneo extrusivo (INEGI 1982).

Suelos

En los charcos de Huimilpan el tipo de suelo predominante es feozem háplico y litosol como suelo secundario. En los charcos de Amealco se encuentra feozem lúvico como suelo predominante, y feozem háplico y litosol como suelos menos predominantes. Ambos sitios se caracterizan por tener un lecho rocoso entre los diez y cincuenta centímetros de profundidad, con una textura media (INEGI 1982).

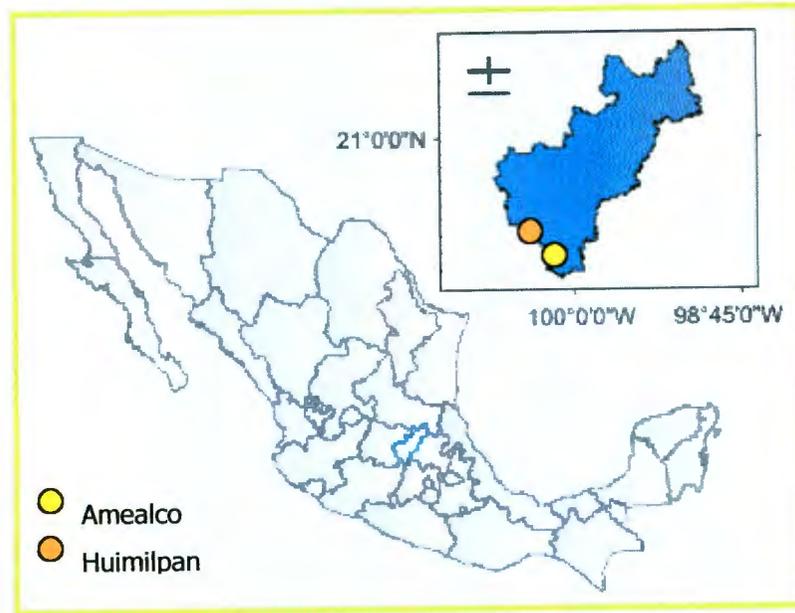


Fig. 1 Ubicación de los municipios de Amealco y Huimilpan en el estado de Querétaro y de éste en México.



Fig. 2 Provincias fisiográficas del estado de Querétaro. La zona de estudio se ubica en la Faja Volcánica Transmexicana.

Clima

La zona presenta un clima templado subhúmedo con lluvias de verano (Cw). Este es estable en cuanto a la temperatura, ya que durante el año varía de 12 a 18 °C. Gran parte de la humedad proviene de los vientos alisios provenientes del Golfo de México, que soplan durante el verano, las lluvias son abundantes en los meses de junio a septiembre (verano y parte del otoño). Para Huimilpan se registra un promedio de precipitación anual (1964-1994) de 781.8 mm, mientras que para Amealco el promedio de precipitación anual (1981-1999) es de 818.8 mm. En el invierno se presentan lluvias ocasionales, así como granizadas y heladas frecuentes (INEGI 1986, Lozano 1996, INEGI 1997, INEGI 2000).

B. Descripción de la historia geológica

La Faja Volcánica Transmexicana comenzó a desarrollarse en el Terciario Medio, pero los principales lagos de esta provincia tuvieron su origen del Terciario Tardío al Cuaternario. El extenso fallamiento, que parece estar asociado al vulcanismo, produjo "grabens" (depresiones tectónicas), en algunos de los cuales se formaron lagos. Los lagos de Chapala, Pátzcuaro, Cuitzeo, Yuriria y los de la cuenca de México son un ejemplo de esto (Tricart 1985, Ferrusquía 1998).

Aunque los charcos de Amealco y Huimilpan se encuentran en la Faja Volcánica Transmexicana, estos se forman únicamente por cuestiones topográficas, es decir, tienen un origen distinto al de los lagos mencionados. Si bien las depresiones o pequeñas cuencas donde estos se establecen, también son formadas por actividad volcánica, no coinciden con depresiones tectónicas, sino que la lava emitida por los volcanes se depositó de manera que formó las depresiones (Pérez², Urbán³ comunicación personal).

² Ing. Rafael Pérez Ibarguengoitia. Coordinador del área de metalurgia. Facultad de Química. Universidad Autónoma de Querétaro. México.

³ Dr. Rafael Germán Urbán Lamadrid. Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma de Guerrero. México.

Un aspecto importante a resaltar, es que no existe una relación en tiempo geológico entre la formación de la roca (depresiones) y la formación de los charcos (Aguirre⁴, Carrasco⁵ comunicación personal). De manera específica se sabe que las depresiones de Huimilpan se formaron hace aproximadamente 5-6 ma, mientras que las de Amealco se formaron hace aproximadamente 4.7 millones de años (ma) (Aguirre-Díaz 1995), ambas durante el Terciario Tardío (Plioceno). El origen de los charcos tiene que ver más con aspectos climáticos y probablemente sucedió en un tiempo geológico mucho más reciente (Aguirre⁴, Carrasco⁵ comunicación personal). Las rocas estuvieron acompañadas por cenizas y tobas que, debido a la alteración (bajas temperaturas), crearon condiciones de mayor impermeabilidad; esto, junto con la nula o baja pendiente, hicieron ambientes propicios para el estancamiento temporal del agua y el establecimiento de los ecosistemas en estudio (Urbán⁶ comunicación personal).

Aunque no se tienen datos puntuales del paleoclima para esta zona, se sabe que en la época en la que se formaron las depresiones de Amealco y Huimilpan (Plioceno) hubo descensos drásticos en la temperatura a nivel global, anunciando el inicio de las glaciaciones pleistocénicas (Graham 1998). En las épocas de climas fríos y glaciaciones, existía poca precipitación en las regiones tropicales, generando ambientes áridos, por lo que parece poco probable que se hayan formado los charcos durante estas épocas (Brown y Lomolino 1998).

La última glaciación, denominada Wisconsin tardío, duró 18,000 años. Empezó hace aproximadamente 30,000 años antes del presente (AP), alcanzando su máxima extensión a los 18,000 años AP (denominada máximo glacial) e inicia una etapa de deglaciación a los 12,000 años AP, en la que las temperaturas aumentan y el hielo comienza a derretirse. Durante el máximo glacial el hielo se extendió hacia el sur hasta la

⁴ Dr. Gerardo de Jesús Aguirre Díaz. Centro de Geociencias. Universidad Nacional Autónoma de México campus Juriquilla, Querétaro. México.

⁵ Dr. Gerardo Carrasco Nuñez. Centro de Geociencias. Universidad Nacional Autónoma de México campus Juriquilla, Querétaro. México.

⁶ Dr. Rafael Germán Urbán Lamadrid. Licenciatura en Biología. Universidad Autónoma de Guerrero. México.

zona de los grandes lagos (EUA) provocando cambios en las condiciones climáticas de extensas zonas tanto en latitudes medias como bajas (Lozano 1996).

Durante esta época, en el sector centro-oriental de la Faja Volcánica Transmexicana (lagos de Chalco, Texcoco, Tecocomulco y Cuenca de México), el conjunto de paleoindicadores apoya la hipótesis de una disminución relevante en la precipitación, que conlleva cierto grado de aridez y poca profundidad en dichos lagos. Mientras que para el sector centro-occidental (Pátzcuaro, Cuitzeo) no existen pruebas de climas áridos durante esta época (Urrutia-Fucugachi *et al.* 1995, Bradbury 1997, Bradbury 2000). Con estos datos, es difícil inferir el grado de precipitación que había en ese tiempo en Amealco y Huimilpan, ya que los charcos se localizan entre los dos sectores. Sin embargo, existen registros para ambos, que indican que en el Pleistoceno Tardío se incrementó la precipitación durante el invierno, y que el régimen de lluvias de verano se inició hasta el Holoceno (Bradbury 1997).

En el centro de México, hacia finales del Pleistoceno y principios del Holoceno (12,000-10,000 años AP), existe un incremento en la temperatura y precipitación, iniciándose un período de climas húmedos y templados. En esta época se establecen los patrones de estacionalidad y de humedad durante el verano, tal como se conocen actualmente (Lozano 1996, Bradbury 1997, Bradbury 2000). Es muy probable que los charcos de Amealco y Huimilpan hayan tenido su origen durante esta época.

Existen tres indicadores principales que nos permiten estimar el tiempo aproximado en que se formaron los charcos: El paleoclima (que ya se describió), el nivel de sedimentación y la ausencia de caliches. Es posible determinar la edad aproximada de un lago por el volumen de sedimentos, debido a que los charcos de Amealco y Huimilpan presentan pocos sedimentos, es probable que geológicamente sean muy jóvenes. Otro aspecto es la formación de caliches, que necesitan varios miles de años para formarse, y no se observan en nuestros sitios de estudio. Con todo esto, posiblemente los charcos de estudio tuvieron su origen entre los 12,000-10,000 años AP.

C. Características de los ecosistemas de estudio

Keeley y Zedler (1998) mencionan la presencia de humedales denominados “charcos de primavera” en California. Algunas de las peculiaridades de éstos son: su estacionalidad (período de sequía y de inundación), su establecimiento en depresiones poco profundos, su llenado por precipitación, su inundación en períodos de temperatura adecuada para el crecimiento de plantas y su período de anegación antes de secarse.

Las características mencionadas para los “charcos de primavera” en California se hallan también en los charcos temporales de Amealco y Huimilpan. Presentan una estacionalidad marcada, con un período de inundación que va de a seis a ocho meses y un período de sequía de cuatro a seis meses. Los charcos se forman en pequeñas depresiones poco profundas de suelos impermeables que se llenan únicamente por agua de lluvia, sin entradas de agua por drenaje de ríos o arroyos. El período de inundación se ubica durante el verano y otoño, estaciones en las que la temperatura es ideal para el crecimiento de las plantas. Cuando la época de lluvias termina, en los charcos empieza a disminuir el nivel del agua y para los meses de diciembre y enero se presenta un período de anegación hasta secarse completamente aproximadamente en febrero (Martínez⁷ comunicación personal, Magallán⁸ observación personal).

La característica más notable de este tipo de ecosistemas es que pueden ser estudiados como “islas” dentro de un paisaje terrestre (Elam 1998). Los estudios de genética de poblaciones en especies de plantas de hábitats aislados pueden revelar los niveles y la distribución de la variación genética dentro y entre las poblaciones, así como hasta dónde están relacionadas las poblaciones por dispersión (Edwards y Sharitz 2000). Además, presentan características que los hacen importantes centros de endemismos y pueden servir como laboratorios para el estudio de genética de poblaciones, evolución y biología de la conservación (Elam 1998).

⁷ Dra. Mahinda Martínez y Díaz. Laboratorio de Botánica. Universidad Autónoma de Querétaro. México.

⁸ Biol. Emma Fabiola Magallán Hernández. Laboratorio de Botánica. Universidad Autónoma de Querétaro. México.

D. Descripción y ubicación de los charcos estudiados

En la zona de estudio existen entre 15 y 20 charcos temporales. Sin embargo, sólo se describen y ubican los 12 en los que existen las especies estudiadas. De estos 12 humedales temporales, ocho se encuentran en Huimilpan, tres en Amealco y uno en Juventino Rosas, Guanajuato. Este último se incluyó dentro de la investigación, como una población externa a la zona de estudio, con fines comparativos. En la Figura 3 se muestra la ubicación de los ocho charcos temporales estudiados en Huimilpan en un mapa topográfico escala 1:50000 (INEGI 2001). En la Figura 4 se ubican tanto las tres poblaciones estudiadas en Amealco como las ocho de Huimilpan, en un mapa topográfico escala 1:250000 (INEGI 1998). La población externa, que es la número 12, no se observa en los mapas. Las poblaciones número tres a la ocho se encuentran en La Ceja de Bravo, poblado cercano a la cabecera municipal de Huimilpan. La mayoría de los charcos son utilizados como abrevaderos.

Huimilpan

Población 1. Se localiza en el Km 29 de la carretera Querétaro-Huimilpan a $20^{\circ} 26' 12.97''$ N y $100^{\circ} 16' 8.57''$ W y 2300 msnm. Tiene un área aproximada de $24,072 \text{ m}^2$. Este charco sólo se forma en años en los que llueve arriba del promedio.

Población 2. Se localiza en la desviación a Escolásticas, a la orilla del camino, en el Km 30 de la carretera Querétaro-Huimilpan a $20^{\circ} 24.01' \text{ N}$, $100^{\circ} 16.18' \text{ W}$ y 2280 msnm. Es un cuerpo de agua con un área de $33,750 \text{ m}^2$. No queda completamente seco, debido a su tamaño, pero las orillas y gran parte de éste si se comportan como charco temporal (Fig. 5).

Poblaciones 3, 4, 5, 6 y 7. Se encuentran en el Km 31 de la carretera Querétaro-Huimilpan a $20^{\circ} 23' \text{ N}$, $100^{\circ} 16' \text{ W}$ y 2310 msnm. Las poblaciones 3 (Fig. 6) y 4 son pequeñas pozas. La 3 tiene un área aproximada de 67 m^2 , la 4 tiene 82 m^2 . El charco 5 es nombrado por la gente del lugar como "La Ceja" (Fig. 7), tiene un área aproximada de $10,000 \text{ m}^2$ y el 6 tiene $8,250 \text{ m}^2$ y se encuentra frente al de La Ceja. Se observa que estas dos poblaciones formaban una sola y fueron divididas por la carretera. El charco 7 tiene aproximadamente $2,723 \text{ m}^2$.

Población 8. Se localiza también a la altura del Km 31 de la carretera Querétaro-Huimilpan, pero a aproximadamente 1 kilómetro al Este de la carretera, a $20^{\circ} 23' 35.1''$ N, $100^{\circ} 15' 52.9''$ W y 2324 msnm. Es un cuerpo de agua permanente con un área de $107,310 \text{ m}^2$, se tomó en cuenta para la presente investigación debido a que presenta zonas que son temporales en sus bordes.

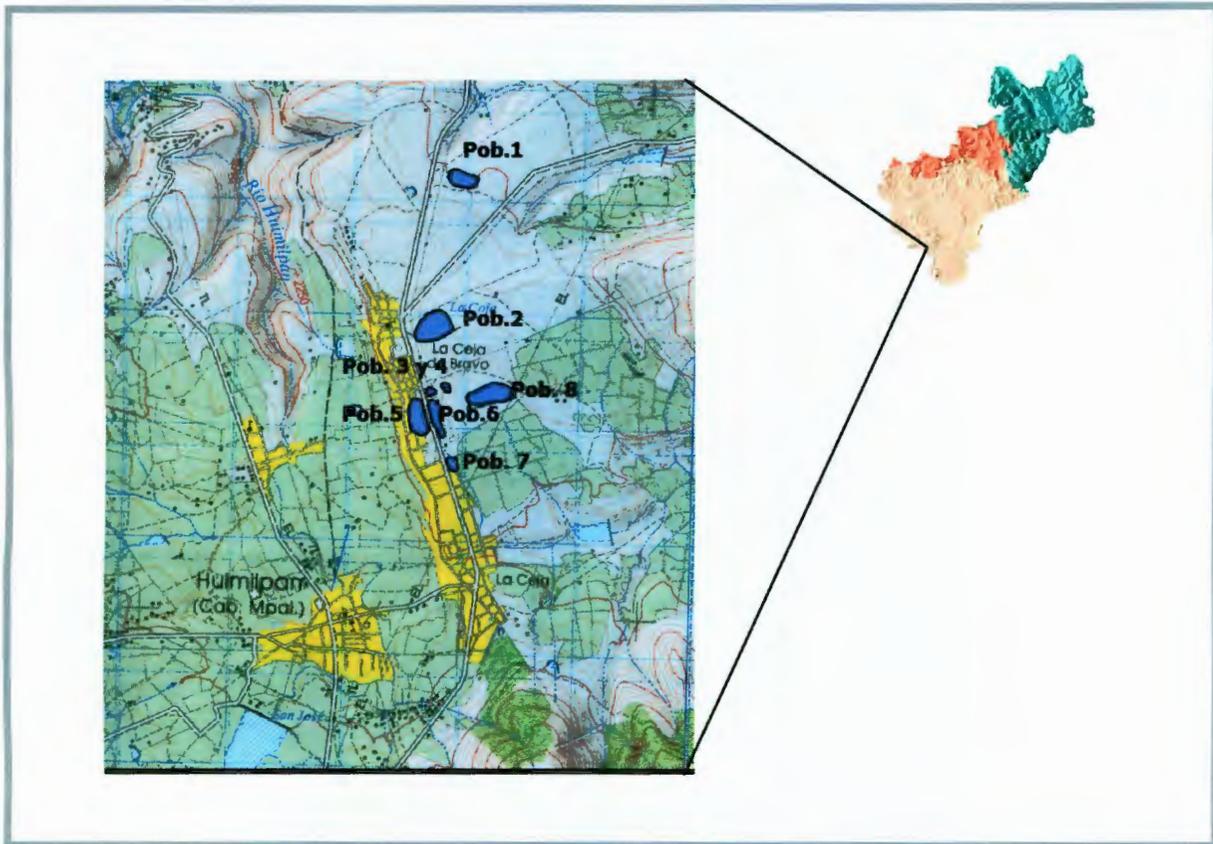


Figura 3. Ubicación de los charcos temporales de Huimilpan, Querétaro

Amealco

Población 9. Charco temporal al que la gente de los alrededores denomina El Caballo. En el Km 17 de la carretera Amealco-San Juan del Río a los $20^{\circ} 19.71'$ N, $100^{\circ} 07.98'$ W, y 2370 msnm. Es un cuerpo de agua con un área de $19,591 \text{ m}^2$.

Población 10. Charco temporal en el Km 7 de la carretera Amealco-San Ildefonso. $20^{\circ} 10' 18.3''$ N, $100^{\circ} 04' 26.7''$ W y 2632 msnm. Es un cuerpo de agua con un área de aproximadamente $9,748 \text{ m}^2$ (Fig. 8).

Población 11. Se localiza en el Km 16 de la carretera hacia “La Muralla”, pasando la desviación que va hacia San Ildefonso, cerca de El Bothé a $20^{\circ} 10' 08.10''$ N y $100^{\circ} 00' 42.65''$ W y 2400 msnm. Tiene un área aproximada de $4,973 \text{ m}^2$.

Población externa

Población 12. Juventino Rosas, Guanajuato. En el Km 48.5 de la carretera Juventino Rosas-Guanajuato, a $20^{\circ} 48' 23.5''$ N, $101^{\circ} 02' 04''$ W y 2326 msnm. Charco temporal con un área aproximada de $33,000 \text{ m}^2$.

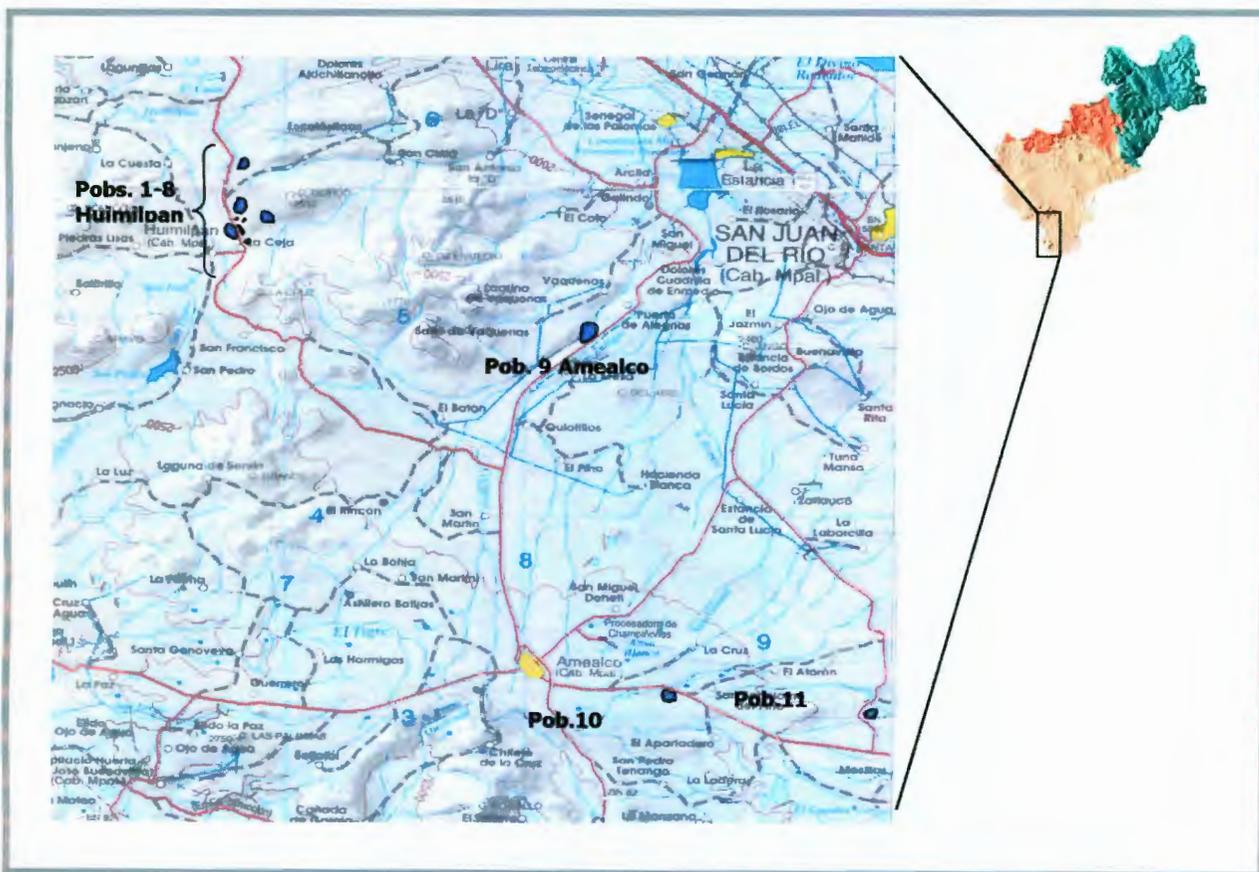


Figura 4. Ubicación de los charcos temporales de Huimilpan y Amealco, Querétaro.



Figura 5. Población 2. Escolásticas, Huimilpan



Figura 6. Población 3. Frente al de La Ceja, Huimilpan



Figura 7. Charco temporal 5. La Ceja, Huimilpan



Figura 8. Charco temporal 10 en Amealco

VI. METODOLOGÍA GENERAL

En este capítulo se describen los métodos generales usados en campo y laboratorio para las tres especies de estudio. El apartado de "análisis de datos" incluye las fórmulas empleadas para la obtención de los índices de diversidad y estructura genéticas, así como su interpretación.

Métodos de campo y laboratorio

Se colectaron, de forma aleatoria, 40 individuos por población, separados entre sí al menos un metro para evitar tomar muestras del mismo clon. También se colectó en un charco temporal fuera del área de estudio (Juventino Rosas, Guanajuato), el cual se consideró como una población externa en el análisis. Las plantas se transportaron al laboratorio en recipientes con agua. En el laboratorio, se escogieron las tres hojas más jóvenes de cada individuo, se enjuagaron con agua destilada y se introdujeron en bolsas pequeñas de plástico, etiquetadas con el número de individuo. Todas las muestras de una población se introdujeron en bolsas de plástico etiquetadas con el nombre de la especie, fecha y número de población y estas se almacenaron en un ultracongelador (-70°C), hasta su utilización.

Para conocer la diversidad y estructura genética de las tres especies seleccionadas se usó la técnica de electroforesis horizontal de isoenzimas en gel de almidón, según los protocolos establecidos por Cheliak y Pitel (1984), Werth (1985) y Wendel y Weeden (1989). Primeramente se ajustó la técnica a cada especie, para lo cual se probaron cinco sistemas de corrimiento: Sistema C (Stuber *et al.* 1988), Sistema D (Stuber *et al.* 1988), Sistema Histidina (Wendel y Weeden 1989), Sistema Hidróxido de Litio (Werth 1985) y Sistema Morfolina (Werth 1985). Así mismo, se probaron cuatro diferentes buffers de extracción: buffer "Camellia" (Wendel y Parks 1982), buffer "YO" (Yeh y O'Malley 1980), Buffer "YO:VEG" (Yeh y O'Malley 1980, Cheliak y Pitel 1984) y "Microbuffer" (Werth 1985). Se efectuaron pruebas con amperaje y tiempo de corrimiento

en los diferentes sistemas con el fin de establecer las condiciones ideales de electroforesis para cada especie.

Se hicieron pruebas de tinción de 22 enzimas: ADH, ALD, APX, CPX, DIA, EST, GDH, G-6PD, GOT, HK, IDH, LAP, LDH, MDH, ME, MNR, NADHDH, PGD, PGI, PGM, SDH y SOD. Las fórmulas para la preparación de los sistemas de corrimiento, buffers de extracción y tinción de las enzimas se especifican en el Apéndice 1. Además se incluye, el nombre completo de la enzima y para algunas fórmulas, las modificaciones hechas.

Para la extracción de enzimas, se maceró un fragmento de hoja con dos gotas del buffer de extracción, se agregó una pizca de arena esterilizada con el fin de hacer el proceso de maceración más sencillo. Con el extracto obtenido, se impregnaron los "wicks" [♦] hechos con papel de cromatografía Whatman 3 mm^². Los "wicks" se introdujeron en tubos Eppendorf etiquetados con el número del individuo, éstos se colocaron en gradillas con datos de la población y la especie y se almacenaron en el ultracongelador (-70 °C). Los geles se prepararon a concentraciones del 12 % de almidón (Wendel y Weeden 1989). Después de solidificar, se envolvieron con plástico autoadherente y se refrigeraron (10 °C) para usarse al día siguiente.

Los "wicks" de una población completa se colocaban en el gel de almidón (40 "wicks") y a la mitad del gel se ponía un "wick testigo", es decir, siempre el mismo individuo de cualquier población, con el fin de asignar correctamente la nomenclatura de los loci y alelos. Además, se colocaban "wicks" (al principio y final del gel) de un marcador molecular ("amido black") para poder determinar a qué distancia del cátodo se encontraba el frente de migración. En la electroforesis, se corría el gel con amperaje y tiempo de corrimiento específico. Se retiraba el gel de la corriente eléctrica y se hacían rebanadas de 2 mm de grosor. Las rebanadas se teñían con base en los protocolos de cada enzima (Apéndice 1) y se esperaba que aparecieran las bandas en los geles.

[♦] Rectángulos de papel filtro de 3 mm de ancho por 14 mm de largo

^² Se refiere al grosor del papel

La nomenclatura de los loci y de los alelos se estableció de la siguiente manera: a los loci que estuvieran más cerca del ánodo se les asignó el número 1, los que seguían el número 2 y así sucesivamente conforme se acercaran al cátodo, se usó el mismo criterio para los alelos, sólo que se les asignaron letras en lugar de números. La información acerca de la estructura cuaternaria de las enzimas, que sirvió para llevar a cabo la adecuada interpretación de las bandas, se obtuvo de Weeden y Wendel (1989). En el Apéndice 2 se muestran ejemplos de dicha nomenclatura.

Se dibujaron los zimogramas y se llevó a cabo una primer lectura de los patrones de bandeo con los geles en fresco. Se fijaron los geles en alcohol al 50 % o en una solución 5:5:1 de metanol, agua y ácido acético, se “escanearon”, se envolvieron con plástico autoadherente, se etiquetaron con sus datos correspondientes y se almacenaron en el refrigerador, este procedimiento se hizo con el fin de llevar a cabo una segunda lectura para confirmar los datos ya obtenidos.

Análisis de datos

Para obtener las frecuencias alélicas y la mayoría de los estadísticos presentados en este apartado se obtuvieron los genotipos individuales para cada población y especie y se conformaron matrices de datos, las cuales se analizaron en el programa Biosys-1 (Swofford y Selander 1981).

Variación genética dentro de las poblaciones locales

1. Número de alelos[■] por locus[▲] (A). Es un promedio simple del número de alelos por cada locus. Se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$A = \Sigma \text{ del número de alelos por locus} / \text{Número de locus}$$

■ Forma alterna de un gen.

▲ El sitio, el lugar de un gen en un cromosoma

2. Número efectivo de alelos por locus (**Ae**). Este índice no sólo toma en cuenta el número de alelos en un locus, sino también sus frecuencias relativas, es decir el número de alelos igualmente frecuentes (Hartl y Clark 1997). Se encuentra descrito por la siguiente ecuación:

$$Ae = 1 / \sum pi^2$$

Donde pi es la frecuencia del alelo i en la población.

3. Porcentaje de loci polimórficos (**P**). Un locus es considerado polimórfico si la frecuencia del alelo más común no excede de 0.95. **P** toma valores de 0 a 100, 0 sino existen loci polimórficos y 100 si todos los loci son polimórficos (lo cual indica alta diversidad genética dentro de la población) (Hedrick 2000). Este índice se estima mediante la siguiente fórmula:

$$P = x / m$$

Donde x es el número de loci polimórficos y m es el número de loci.

4. Heterocigosidad observada (**Ho**). Es un conteo directo del número de individuos heterocigotos. Primero se calcula la Ho para cada locus con la siguiente fórmula:

$$Ho = \frac{\text{Número de individuos heterocigotos para cada locus}}{\text{Número total de individuos de la muestra.}}$$

Después de haber calculado la Ho para cada locus se hace un promedio para la población.

5. Heterocigosidad esperada (**He**). Este índice se obtiene a partir del promedio de la heterocigosis esperada en el equilibrio de Hardy – Weinberg para todos los loci estudiados en la población. Se calcula para cada locus mediante la siguiente fórmula:

$$He = 1 - \sum pi^2$$

Donde pi es cada una de las frecuencias alélicas para ese locus.

Tanto la H_o como la H_e pueden tomar valores de 0 a 1, un valor de 0 quiere decir que no existe diversidad genética y un valor de 1 quiere decir que todos los individuos son heterocigotos, lo cual implica alta diversidad genética.

Diversidad genética dentro y entre poblaciones locales

La diversidad genética se define como la frecuencia de individuos heterocigotos esperados bajo el equilibrio de Hardy – Weinberg (Hernández-Verdugo *et al.* 2001).

1. Diversidad genética total (H_T). Es la heterocigosidad promedio esperada sobre todos los loci a nivel de toda la población.
2. Diversidad genética dentro de las subpoblaciones (H_S). Es la heterocigosidad promedio esperada sobre todos los loci a nivel subpoblación o población local.
3. Diversidad genética entre las poblaciones (D_{ST}). Es la diversidad genética total distribuida entre las subpoblaciones (Culley *et al.* 2002).
4. Coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}). Presenta valores de 0 a 1, donde valores bajos indican que existe poca variación entre subpoblaciones y valores altos denotan que existe gran cantidad de variación entre subpoblaciones (Culley *et al.* 2002).

Estos estimadores se calculan para cada locus a partir de las frecuencias alélicas y están relacionados mediante las siguientes fórmulas: $H_T = H_S + D_{ST}$ y $G_{ST} = D_{ST} / H_T$.

Índice de endogamia y estructura genética

1. Índice de Fijación (F). Estima el grado de endogamia dentro de una población, es decir mide la reducción proporcional de heterocigotos en una población en relación a lo esperado bajo el equilibrio de Hardy – Weinberg.

Se calcula para cada uno de los loci polimórficos y para cada población mediante la siguiente fórmula (Wright 1921):

$$F = H_e - H_o / H_e$$

Donde H_e es la heterocigosidad esperada y H_o es la heterocigosidad observada.

Este índice toma valores entre -1 a 1 , donde el valor 0 indica que la población está en equilibrio de Hardy – Weinberg, un valor negativo indica que hay exceso de heterocigotos y un valor positivo indica deficiencia de heterocigotos (endogamia). Este índice puede ser dividido en niveles geográficos, lo que genera los estadísticos F de Wright (F_{IS} , F_{IT} y F_{ST}), los cuales son también un tipo de coeficientes de endogamia que miden la reducción de la heterocigosidad en algún nivel jerárquico (Hartl y Clark 1997).

2. F_{IS} , (individuo – subpoblación) es el coeficiente de endogamia entre individuos dentro de una subpoblación o población local. Se calcula mediante la fórmula:

$$F_{IS} = (H_s - H_o) / H_s$$

Donde H_o es la heterocigosidad observada dentro de una población local (subpoblación) y H_s es la heterocigosidad esperada dentro una población local.

Este índice toma valores de -1 a 1 , si es positivo indica que existe diferenciación entre subpoblaciones debido a la endogamia local y si es negativo sugiere algún tipo de selección que favorece a los individuos heterocigotos (Hartl y Clark 1997).

3. F_{IT} , (individuo – total) es el coeficiente de endogamia entre individuos en relación a la población total, mide la diferenciación total debido tanto a la endogamia como a la deriva génica y/o selección (Eguiarte 1990). Se encuentra descrito mediante la siguiente fórmula:

$$F_{IT} = (H_T - H_o) / H_T$$

Donde H_o es la heterocigosidad observada dentro de una población local (subpoblación) y H_T es la heterocigosidad esperada en la población total.

Este índice toma valores de -1 a 1, si es positivo indica diferenciación de la subpoblación con respecto a la población total debido a la endogamia y si es negativo puede estar ocurriendo selección natural (Hartl y Clark 1997).

4. F_{ST} , (subpoblación - total) mide la cantidad de diferenciación genética entre subpoblaciones, es equivalente al índice G_{ST} (Nei 1987). Se calcula con la siguiente fórmula:

$$F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$$

Donde H_S es la heterocigosidad esperada a nivel subpoblación y H_T es la heterocigosidad esperada en la población total.

Este índice toma valores de 0 a 1, si su valor es 0, entonces todas las poblaciones locales son idénticas genéticamente, mientras que si su valor es 1, entonces todas las poblaciones locales son completamente diferentes entre sí, o sea que no comparten ningún alelo. Generalmente si el valor de F_{ST} es similar en los distintos loci, se considera a la deriva génica como el proceso de mayor influencia, y entre más alto sea el valor de F_{ST} quiere decir que ha habido mayor deriva génica y menor flujo génico y, por lo tanto, mayor diferenciación entre subpoblaciones (Hartl y Clark 1997).

Flujo génico

Se estimó el flujo génico (Nm) entre poblaciones locales de manera indirecta mediante la fórmula:

$$Nm = [(1 / F_{ST} \text{ ó } G_{ST}) - 1] / 4$$

Donde F_{ST} o G_{ST} se refiere a la diferenciación genética entre las subpoblaciones.

La fórmula está basada en el modelo de islas de Wright (1951) acerca de la estructura de la población bajo un balance entre deriva génica y flujo génico. Independientemente del tamaño de la población, si $Nm < 1$ entonces es posible que la deriva génica sea el proceso

que lleve a una diferenciación considerable de las poblaciones locales, si $Nm > 1$, se considera que el flujo génico es alto (Slatkin 1987).

Identidades y distancias genéticas

Son medidas entre pares de subpoblaciones, la identidad genética (**I**) de Nei (1978), se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$J_{xy} / (J_x J_y)^{1/2}$$

Donde $J_{xy} = \sum p_i^x \cdot p_i^y$, que es la probabilidad de escoger un par de alelos idénticos, uno de la subpoblación X y otro de la Y. $J_x = \sum p_i^2 \cdot x$ y $J_y = \sum p_i^2 \cdot y$, que son las probabilidades de escoger un par idéntico dentro de cada población.

Puede tomar valores de 0 a 1, 0 si ambas subpoblaciones no comparten alelos y 1 si las dos subpoblaciones manifiestan frecuencias alélicas idénticas (Hedrick 2000).

La distancia genética (**D**) de Nei (1978) se puede obtener a partir de la identidad genética mediante la siguiente fórmula:

$$D = -\ln(I)$$

Donde I es la identidad genética de Nei

Puede presentar un valor de 0 si las poblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas, y de infinito si no comparten ningún alelo (Hedrick 2000).

Con el objetivo de evaluar la diferenciación genética entre las poblaciones locales de cada especie, se construyeron dendrogramas mediante el método de ligamiento promedio no ponderado (UPGMA). Estos dendrogramas se basaron en las matrices de identidades genéticas (Nei 1978) de todas las combinaciones pareadas entre subpoblaciones (Sneath y Sokal 1973).

El programa Biosys-1 se usó para obtener las frecuencias alélicas, los índices de variación genética dentro de las poblaciones (excepto Ae), el índice de endogamia (F), los estadísticos F de Wright, las matrices de identidades (I) y distancias genéticas (D), y los dendogramas de relaciones genéticas. Los demás índices se calcularon con las frecuencias alélicas y sus respectivas fórmulas. Para evaluar si F, F_{IS} y F_{IT} eran significativamente diferentes de cero, se llevó a cabo una prueba de $\chi^2 = F^2N(k-1)$ con $gl = [k(k-1)] / 2$, donde F es el coeficiente de endogamia, N es el tamaño de la muestra y k es el número de alelos (Li y Horvitz 1953). Para saber si los valores de F_{ST} eran significativamente diferentes de cero se hizo una prueba de $\chi^2 = 2NF_{ST}(k-1)$ con $gl = [(k-1)(s-1)]$, donde N es el tamaño de la muestra, k es el número de alelos y s es el número de subpoblaciones (Workman y Niswander 1970).

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Este capítulo se divide en tres apartados, uno por cada especie de estudio: *Eriocaulon bilobatum*, *Lilaea scilloides* y *Sagittaria demersa*. Cada apartado contiene: las características ecológicas y de historia de vida principales de cada especie, hipótesis acerca de su posible diversidad genética con base en las características antes mencionadas, métodos particulares, resultados, discusión y conclusiones.

A. *Eriocaulon bilobatum* Morong.

1. Características principales

Estatus taxonómico:	Monocotiledónea.
Hábitat:	Acuático.
Forma de vida:	Herbácea, enraizada emergente (Fig. 9).
Tiempo generacional:	Anual.
Rango de distribución geográfica:	Reducido, discontinuo y esporádico.
Reproducción:	Sexual: producción de flores; asexual: rizomas.
Sexo:	Monoico.
Inflorescencia:	En forma de cabezuelas.
Flores:	Masculinas: aproximadamente de 1 mm de largo con corola blanca, representada solamente por tres lóbulos pequeñísimos, ligeramente desiguales, provistos de una glándula negra, seis estambres, anteras blancas. Femeninas: aproximadamente de 1 mm de largo, tres sépalos, libres, subiguales, pétalos por lo general ausentes, ovario trilobado, estilo trifido de 1 a 1.5 mm.
Frutos:	Cápsula loculicida de forma elipsoidal, diminutamente ornamentada, de 0.5 mm de largo. Tres semillas por fruto.
Polinización:	Autógama o entomófila.
Diásporas:	Semillas.
Dispersión:	Desconocida.

Otras características:

Distribución a manera de parches. Su dependencia de un hábitat amenazado de destrucción, la hacen muy vulnerable a la extinción. Debido a que las flores son pequeñas, unisexuales y aparentemente secas se había considerado su polinización por viento. Sin embargo, debido a que las flores son estructuralmente complejas y en algunas otras especies de la familia se ha encontrado que secretan néctar, es más probable que su polinización sea autógama o por insectos.

Referencias: Cook (1988, 1996) y Calderón 1996.

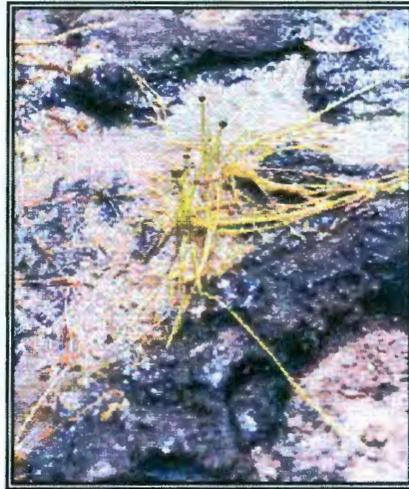


Figura 9. *Eriocaulon bilobatum*.

2. Hipótesis

Debido a que *Eriocaulon bilobatum* es una especie escasa y se distribuye de forma discontinua y esporádica, es probable que tenga baja diversidad genética. Si su polinización es autógama es posible que tenga baja diversidad genética, altos índices de endogamia, altos niveles de diferenciación entre poblaciones y bajo flujo génico.

3. Métodos

Se colectaron 160 individuos de cuatro poblaciones (6, 9, 10 y 12). Para esta especie se usaron nueve enzimas que tiñeron bien en tres sistemas: C (CPX, PGD y PGI), D (GDH, PGM, SDH) y Morfolina (IDH, ME, MNR). El Sistema C se corrió a 60 mA durante siete

hrs., el sistema D se corrió a 30 mA por ocho hrs. y el sistema Morfolina a 60 mA durante seis hrs. Se usó el buffer de extracción YO:VEG (Yeh y O'Malley 1980 y Cheliak y Pitel 1984), debido a que fue el que permitió una mayor definición en esta especie.

4. Resultados

Se analizaron 14 loci de nueve enzimas en cuatro poblaciones locales de *E. bilobatum*: CPX-1, CPX-2, GDH-1, IDH-1, IDH-2, IDH-3, ME-1, MNR-1, PGD-1, PGD-2, PGI-1, PGI-2, PGM-1 y SDH-1. En las frecuencias alélicas (Apéndice 3) se observa que de los 14 loci definidos, 13 fueron polimórficos al menos en alguna de las poblaciones estudiadas y un locus (IDH-3) resultó monomórfico en todas.

Variación genética dentro de las poblaciones

Se registraron un total de 48 alelos en los 14 loci definidos. El número de alelos por locus (A) fue de 2.32 con un intervalo de 1.86 a 2.86, mientras que el número efectivo de alelos por locus (Ae) fue de 1.31 con un intervalo de 1.21 a 1.37. En la mayoría de los loci Ae fue menor que A, lo que indica que la diversidad alélica se debe a la predominancia de un alelo en un locus entre las poblaciones y que los demás alelos se encuentran en frecuencias bajas. Los valores de A y Ae por locus y por población se muestran en el Apéndice 4.

El número promedio de individuos analizados para las cuatro poblaciones locales fue de 37.7, con 34.5 en la población seis de Huimilpan, 39.6 en la nueve de Amealco, 39.2 en la diez de Amealco y 37.5 en la doce de Guanajuato. El porcentaje de loci polimórficos (P) fue de 69.65 con un intervalo de 42.9 a 85.7. El promedio de heterocigosidad observada (Ho) fue de 0.134 con un intervalo de 0.084 a 0.138 y el de heterocigosidad esperada (He) de acuerdo al equilibrio de Hardy-Weinberg fue de 0.197 con un intervalo de 0.129 a 0.239. En todas las poblaciones la heterocigosidad observada fue menor que la esperada, indicando deficiencia de individuos heterocigotos. El tamaño de muestra por población así como los valores de A, Ae, P, Ho y He se muestran en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Parámetros de variación genética estimados para las cuatro poblaciones estudiadas de *Eriocaulon bilobatum*. N = Tamaño de la muestra, A = Número de alelos por locus, Ae = Número efectivo de alelos por locus, P = Porcentaje de loci polimórficos, Ho = Heterocigosidad observada y He = Heterocigosidad esperada. Los errores estándar están dados entre paréntesis.

Pobs.	N	A	Ae	P	Ho	He
6 Huimilpan	34.5 (1.4)	1.86 (0.3)	1.21 (0.2)	42.9	0.084 (0.037)	0.129 (0.048)
9 Amealco	39.6 (0.3)	2.36 (0.2)	1.36 (0.2)	78.6	0.182 (0.049)	0.222 (0.046)
10 Amealco	39.2 (0.5)	2.21 (0.2)	1.30 (0.1)	71.4	0.130 (0.033)	0.198 (0.042)
12 Gto.	37.5 (0.9)	2.86 (0.3)	1.37 (0.2)	85.7	0.138 (0.035)	0.239 (0.043)
Promedio	37.7	2.32	1.31	69.65	0.134	0.197

Diversidad genética dentro y entre poblaciones

La diversidad genética total (H_T) es moderada, siendo el promedio igual a 0.221, con un intervalo de 0.045 en el locus PGD-2 a 0.465 en el locus PGI-2. La mayor parte de la diversidad genética se encuentra dentro de las poblaciones ($H_S = 0.210$) y poca entre las poblaciones ($D_{ST} = 0.012$), lo cual indica que las cuatro poblaciones locales comparten una gran proporción de la diversidad total. El valor más alto de H_S se encuentra en el locus PGI-2 ($H_S = 0.457$) y el más bajo en el locus PGD-2 ($H_S = 0.043$), mientras que el valor más alto de diversidad entre poblaciones se presenta en el locus PGM-1 ($D_{ST} = 0.039$) y el más bajo en los loci GDH-1 y PGD-2 ($D_{ST} = 0.001$). El coeficiente de diferenciación genética ($G_{ST} = 0.048$) indica que el 4.8 % de la diversidad genética se encuentra entre poblaciones y el 95.2 % dentro de las poblaciones. Los valores de H_T , H_S , D_{ST} y G_{ST} se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Diversidad genética total (H_T), dentro (H_S) y entre (D_{ST}) subpoblaciones, y el coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}) para las poblaciones de *Eriocaulon bilobatum*.

Locus	H_T	H_S	D_{ST}	G_{ST}
CPX-1	0.176	0.168	0.008	0.045
CPX-2	0.347	0.322	0.025	0.072
GDH-1	0.062	0.061	0.001	0.018
IDH-1	0.085	0.083	0.002	0.027
IDH-2	0.168	0.151	0.017	0.103
ME-1	0.108	0.104	0.004	0.037
MNR-1	0.198	0.193	0.005	0.026
PGD-1	0.315	0.305	0.010	0.032
PGD-2	0.045	0.043	0.001	0.031
PGI-1	0.448	0.422	0.025	0.057
PGI-2	0.465	0.457	0.008	0.017
PGM-1	0.298	0.259	0.039	0.130
SDH-1	0.161	0.156	0.005	0.033
Promedio	0.221	0.210	0.012	0.048

Índice de endogamia y estructura genética

Se obtuvieron 45 valores de índice de fijación o endogamia (F) en los 13 loci polimórficos de las cuatro poblaciones estudiadas (Cuadro 6), a todos se les aplicó una prueba de χ^2 . Los valores de F que no fueron significativamente diferentes de cero indican que la población está en equilibrio de Hardy-Weinberg en esos loci, es decir, que el apareamiento entre los individuos ocurre al azar. Los valores de F que fueron significativamente mayores de cero indican deficiencia de heterocigotos y los valores que fueron significativamente menores de cero indican exceso de heterocigotos (Hartl y Clark 1997).

Los índices de fijación por locus y por población, así como la F poblacional, se muestran en el Cuadro 6. Se observó exceso de homocigotos en 15 loci (33.33 %) cuyos valores fueron positivos y significativamente diferentes de cero. De los valores restantes, 23

fueron negativos y siete fueron positivos, pero ninguno fue significativamente diferente de cero, lo cual indica que el 66.66 % de los loci están en equilibrio de Hardy-Weinberg. A partir de los valores de H_o y H_e se estimó el índice de endogamia por población y a los valores obtenidos también se les llevó a cabo una prueba de χ^2 . Las poblaciones seis y nueve no presentan valores significativamente diferentes de cero, indicando que se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, mientras que las poblaciones diez y doce presentan valores positivos y significativamente diferentes de cero, lo que señala que estas dos poblaciones tienen exceso de individuos homocigotos (endogamia).

Los estadísticos F de Wright: F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} se muestran en el Cuadro 7. Las estimaciones de F_{IS} fueron significativamente diferentes de cero en cinco loci (38.46 %), de los ocho valores restantes, cinco fueron negativos y tres positivos, pero no significativamente diferentes de cero, por lo que 61.53 % de los loci se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg.

El promedio de F_{IS} fue de 0.312 y fue significativamente diferente de cero, indicando que existe endogamia entre individuos dentro de las poblaciones locales. Las estimaciones de F_{IT} fueron significativamente diferentes de cero en siete loci (53.84 %), indicando que un poco más de la mitad de los loci presentan exceso de homocigotos, de los seis valores restantes, cuatro fueron negativos y dos positivos, pero no significativamente diferentes de cero, por lo que 46.15 % de los loci están en equilibrio de Hardy-Weinberg. El promedio de F_{IT} presentó un valor de 0.349 y fue significativamente diferente de cero, señalando que la diferenciación de las poblaciones locales con respecto a la población total se debe a la endogamia.

Cuadro 6. Índices de fijación o endogamia (**F**) para cada locus polimórfico de cuatro poblaciones de *Eriocaulon bilobatum*. Los valores significativamente diferentes de cero se denotan con asteriscos. ***P<0.001; **P<0.01; *P<0.05.

Poblaciones	6	9	10	12
Locus				
CPX-1		-0.114	-0.064	0.001
CPX-2	0.638***	0.777***	1.000***	1.000***
GDH-1		-0.039	-0.026	-0.053
IDH-1		-0.081	-0.067	-0.041
IDH-2		-0.310	-0.055	0.789***
ME-1		1.000***	-0.026	0.781***
MNR-1	-0.071	0.162	-0.096	0.427*
PGD-1	1.000***	1.000***	1.000***	1.000***
PGD-2			1.000***	-0.058
PGI-1	-0.246	0.358*	-0.149	0.482***
PGI-2	0.298	0.097	0.225	0.038
PGM-1	-0.034	-0.097	0.262	-0.114
SDH-1	-0.053	-0.113	-0.143	-0.059
F poblacional	0.349	0.180	0.343*	0.423**

Los valores de F_{ST} fueron significativamente diferentes de cero en doce loci (92.30 %) y solamente un locus (GDH-1) no fue significativamente diferente de cero. El promedio de F_{ST} tiene un valor de 0.053 y tuvo diferencias significativas de cero, lo cual indica diferenciación genética moderada entre poblaciones locales (Apéndice 14). Este valor concuerda con el índice G_{ST} (Cuadro 7), sugiriendo que la mayoría de la diversidad genética de *E. bilobatum* se encuentra dentro de las poblaciones.

Cuadro 7. Estadísticos F de Wright para *Eriocaulon bilobatum*. Los valores significativamente diferentes de cero se denotan con asteriscos. ***P<0.001; **P<0.01; *P<0.05.

Locus	F _{IS}	F _{IT}	F _{ST}
CPX-1	-0.064	-0.016	0.045***
CPX-2	0.906***	0.913***	0.072***
GDH-1	-0.043	-0.025	0.018
IDH-1	-0.067	-0.038	0.027**
IDH-2	-0.038	0.069	0.103***
ME-1	0.760***	0.769***	0.037***
MNR-1	0.170	0.192*	0.026***
PGD-1	1.000***	1.000***	0.032*
PGD-2	0.240***	0.263***	0.031**
PGI-1	0.211**	0.256***	0.057***
PGI-2	0.176	0.191*	0.017*
PGM-1	0.009	0.138	0.130***
SDH-1	-0.105	-0.069	0.033**
Promedio	0.312***	0.349***	0.053***

Flujo génico

El flujo génico entre poblaciones (Cuadro 8) presenta valores de 4.925 (calculado con el promedio de G_{ST}) y de 4.467 (calculado con el promedio de F_{ST} obtenido de biosys). El valor más bajo fue el de 1.673 en el locus PGM-1 y el valor más alto fue el de 14.456 en el locus PGI-2. Como el valor de Nm es mayor a uno se considera que existe alto flujo génico entre las poblaciones locales estudiadas de *E. bilobatum*.

Cuadro 8. Flujo génico entre las cuatro poblaciones locales de *Eriocaulon bilobatum*.

Locus	F _{ST} (G _{ST})	Nm
CPX-1	0.045	5.306
CPX-2	0.072	3.222
GDH-1	0.018	13.639
IDH-1	0.027	9.009
IDH-2	0.103	2.177
ME-1	0.037	6.507
MNR-1	0.026	9.365
PGD-1	0.032	7.563
PGD-2	0.031	7.815
PGI-1	0.057	4.136
PGI-2	0.017	14.456
PGM-1	0.130	1.673
SDH-1	0.033	7.326
Promedio Calculado	0.048	4.925
Promedio Biosys	0.053	4.467

Identities and genetic distances

Las cuatro poblaciones locales estudiadas son muy parecidas genéticamente (Fig. 10). Las identities genéticas de Nei (1978) tienen un intervalo de 0.976 a 0.993, con un promedio de $I = 0.986$, mientras que en las distancias genéticas el intervalo es de 0.007 a 0.025, con un promedio de $D = 0.014$ (Apéndice 5). Las poblaciones diez de Amealco y doce de Guanajuato aparecen en el dendrograma como las más parecidas genéticamente, sin embargo, estas dos poblaciones se encuentran geográficamente muy alejadas. Genéticamente, la población seis de Huimilpan es la más parecida a las poblaciones diez y doce. La población nueve de Amealco es la más alejada genéticamente de las otras tres poblaciones, pero es la más cercana a la población diez de Amealco. En la Figura 11 se muestra la ubicación de los charcos temporales colectados para esta especie.

Figura 10. Dendrograma de identidad genética de Nei (1978), construido mediante UPGMA, para las cuatro poblaciones locales de *Eriocaulon bilobatum*.

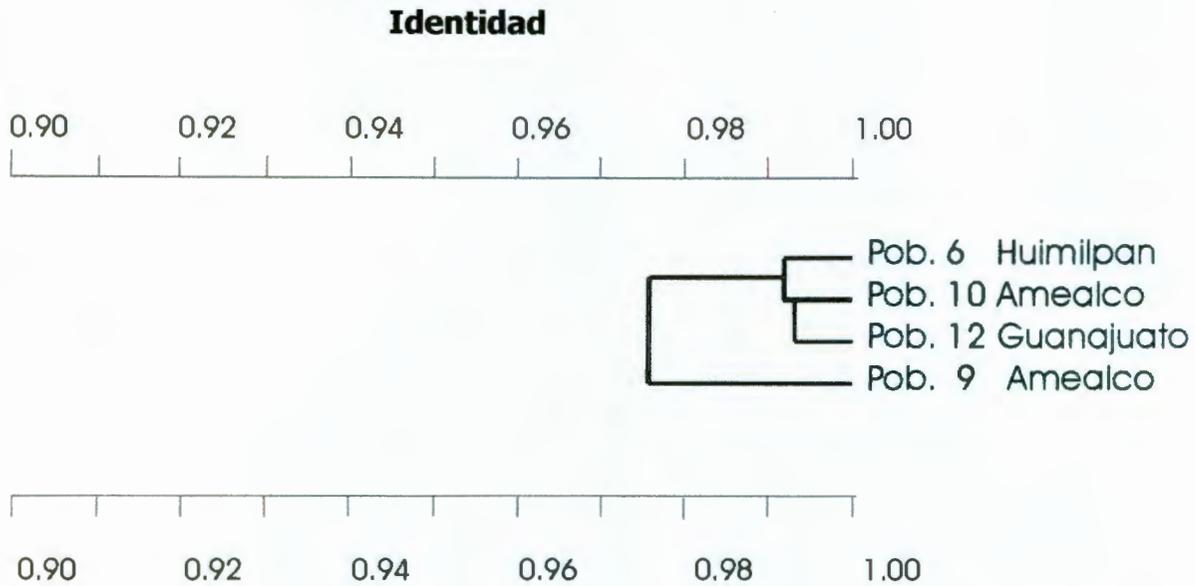
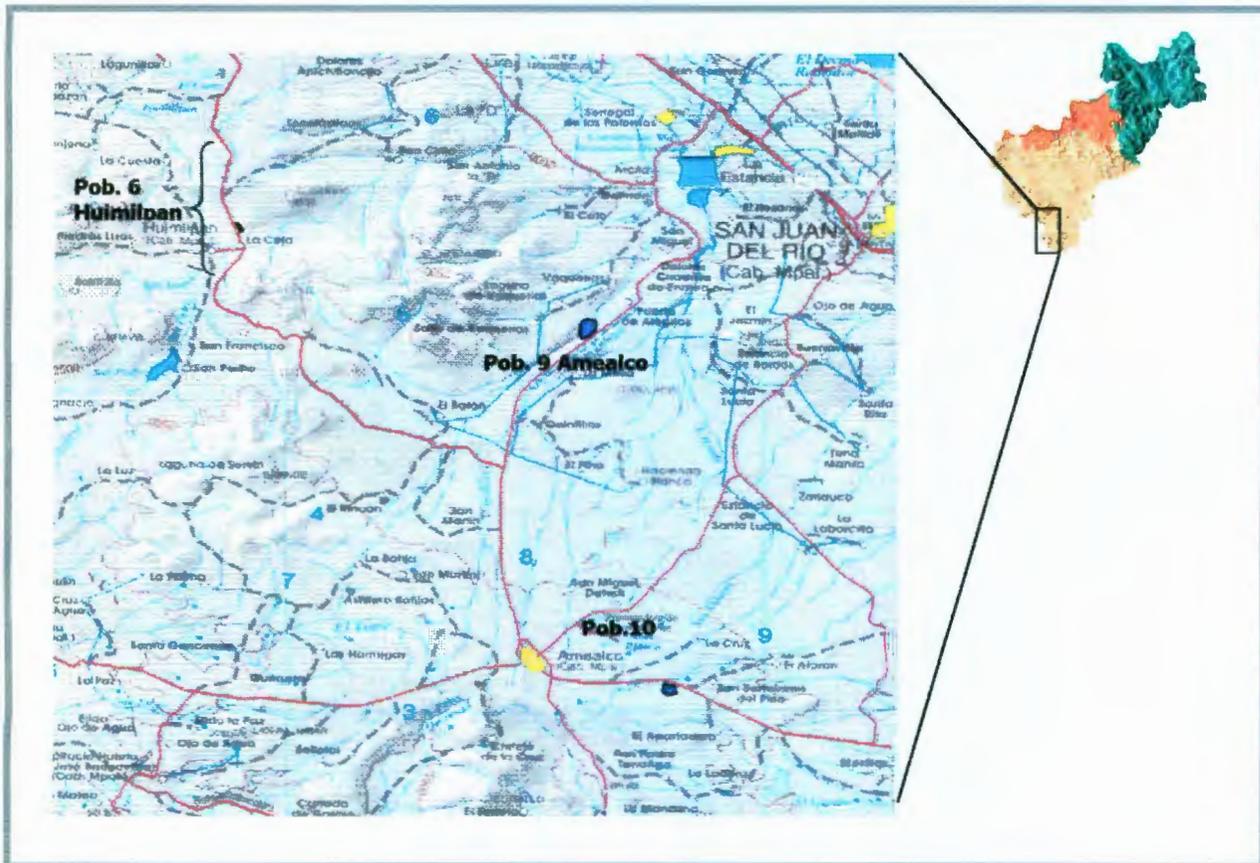


Figura 11. Ubicación de las poblaciones locales analizadas para *Eriocaulon bilobatum* en Amealco y Huimilpan.



5. Discusión

Se planteó la hipótesis de que *Eriocaulon bilobatum* Morong. tendría baja diversidad genética debido a que en la literatura se registra como una especie escasa, con distribución discontinua y esporádica y vulnerable a la extinción (Calderón 1996). Las especies con estas características son consideradas como raras de acuerdo a la clasificación de Rabinowitz (1981), y por lo general, presentan bajos niveles de diversidad genética comparadas con las especies de amplia distribución (Hamrick y Godt 1990).

De acuerdo con Cook (1988, 1996) su polinización es autógena o entomófila, sin mencionar de manera definitiva alguna de las dos. Con polinización autógena se supone que *E. bilobatum* tendría baja diversidad genética, alta endogamia y bajo o nulo flujo génico entre las poblaciones.

Se esperaba alta diferenciación genética entre poblaciones causada tanto por la deriva génica como por la probabilidad de nulo flujo génico. Se planteó esta hipótesis ya que Elam (1998) menciona que la deriva génica es un proceso muy importante en este tipo de ecosistemas, debido a que existen fluctuaciones drásticas hacia tamaños pequeños, si las poblaciones están afectadas por este proceso, es probable que tengan baja diversidad genética y altos niveles de diferenciación entre poblaciones.

En revisiones bibliográficas no se encontraron estudios específicos de la biología floral de *E. bilobatum*, por lo que fue necesario llevar a cabo observaciones de campo, revisión de flores en el laboratorio y acetólisis. Esta información es importante para conocer el sistema de apareamiento de la especie (una de las variables ecológicas más determinantes) y así tener más elementos para la interpretación de los resultados (Cuadro 9).

***Eriocaulon bilobatum* Morong.**

En este cuadro se puntualizan las observaciones llevadas a cabo en campo y laboratorio acerca de la biología floral de *Eriocaulon bilobatum*.

- La especie es monoica, es decir, existen flores masculinas y femeninas en la misma inflorescencia, por lo que Cook (1996) planteó que podría ser autógama*. Sin embargo, se observó la existencia de flores femeninas ya fertilizadas (con semillas inmaduras) y flores masculinas con anteras indehiscentes en la misma inflorescencia, por lo que el desarrollo y madurez de las flores femeninas es antes que el de las masculinas. Es decir, existe una autoincompatibilidad temporal de los sexos.
- Ni el polen, ni los óvulos están en contacto directo con el agua, ya que la inflorescencia permanece inmadura hasta que emerge del agua. Por lo que es posible decir que su síndrome de polinización es como el de una planta terrestre.
- En un individuo pueden existir de seis a doce inflorescencias (cabezuelas), que maduran de forma asincrónica. Mientras que algunas se encuentran fuera del agua, con presencia de semillas inmaduras, otras cabezuelas se encuentran en proceso de maduración (aún bajo el agua o apenas emergiendo).
- Se observó la presencia de una especie de díptero (mosca), de aproximadamente 3 - 4 mm de largo (no identificado taxonómicamente), visitando las inflorescencias. Estos dípteros se posan en la cabezuela y se mueven por toda su superficie, el tiempo que permanecen es variable (desde 20 s hasta 6.5 min.). Enseguida caminan por el pedúnculo de la inflorescencia dirigiéndose a la superficie del agua, cuando están a punto de llegar, vuelan hacia las hojas flotantes que se encuentren cercanas y después se dirigen hacia otros individuos. Es probable que este díptero sea su polinizador.

♦ En realidad una especie monoica, por definición, no puede ser autógama, ya que esta se refiere a la fertilización por polen procedente de la misma flor.

- En las cabezuelas se contaron hasta 30 flores femeninas y ocho flores masculinas como máximo. Dado que cada fruto puede producir como máximo tres semillas y si todas las flores fueran polinizadas, es posible que se produzcan aproximadamente de 540 a 1080 semillas por individuo.
- El polen tratado con acetólisis tiene la siguiente descripción: granos con forma circular, sincolpados (un grupo de colpos se fusionan dando la apariencia de un espiral rodeando el grano), mide de 20-30 μm en ambos diámetros (polar y ecuatorial) y presenta una ornamentación escabrada (Figs. 12 y 13). Los granos de polen que presentan algún tipo de ornamentación generalmente son dispersados por insectos (Moore *et al.* 1991), lo cual apoya la idea de que *E. bilobatum* tiene polinización entomófila.

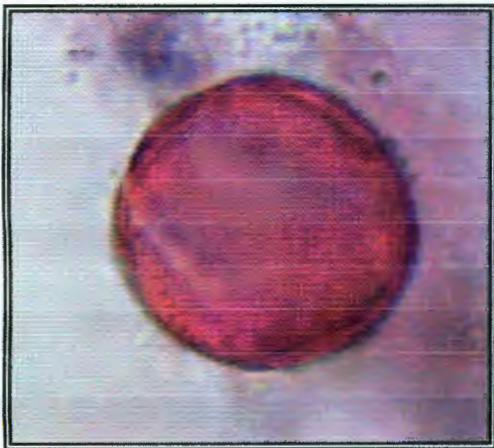


Fig. 12. Forma circular del grano de polen de *Eriocaulon bilobatum*

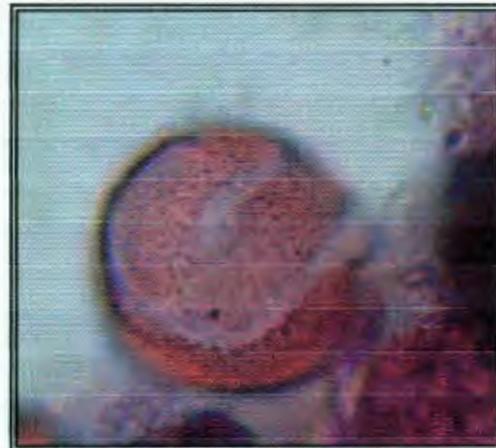


Fig. 13. Apertura sincolpada en grano de polen de *Eriocaulon bilobatum*

Si se comparan los niveles de variación genética de *E. bilobatum* ($A=2.32$, $A_e=1.31$, $P=69.65$, $H_o=0.134$ y $H_e=0.197$) con los registrados para las pocas especies acuáticas con características similares de historias de vida, tomando en cuenta por un lado polinización autógena y por otro polinización entomófila, se observa que presenta mayores niveles de

variación genética con respecto a especies autóгамas y niveles promedio con respecto a especies entomófilas (Cuadros 10 y 11). Aunque es importante mencionar que en el caso de *Sagittaria isoetiformis* y *S. Teres* (Cuadro 11), los autores consideran que presentan altos niveles de variación genética (Edwards y Sharitz 2000). También presenta mayores niveles de variación genética que los promedios registrados por Hamrick y Godt (1990) para especies terrestres con las mismas características de historias de vida (Cuadro 12).

Cuadro 10. Índices de diversidad genética dentro de las poblaciones locales: número de alelos por locus (A), porcentaje de loci polimórficos (P) y heterocigosidad esperada (He). Diversidad genética total (H_T), y el coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}) para especies acuáticas autóгамas con características de historias de vida similares a *Eriocaulon bilobatum*.

Especie	A	P	He	H_T	G_{ST}
<i>Eriocaulon bilobatum</i>	2.32	69.65	0.197	0.221	0.048
<i>Limnanthes bakeri</i>	1.20	22.00	0.114	0.180	
<i>Limnanthes floccosa</i>	1.43	23.00	0.003	0.082	0.963

Cuadro 11. Índices de diversidad genética dentro de las poblaciones locales: número de alelos por locus (A), porcentaje de loci polimórficos (P) y heterocigosidad esperada (He). Diversidad genética total (H_T), y el coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}) para especies acuáticas entomófilas con características de historias de vida similares a *Eriocaulon bilobatum*.

Especie	A	P	He	H_T	G_{ST}
<i>Eriocaulon bilobatum</i>	2.32	69.65	0.197	0.221	0.048
<i>Limnanthes alba</i>	2.04	63.00			
<i>Sagittaria isoetiformis</i>	2.33	67.61	0.218	0.425	0.388
<i>Sagittaria teres</i>	2.19	48.21	0.101	0.237	0.261

Cuadro 12. Índices de diversidad genética dentro de las poblaciones locales: número de alelos por locus (A), número efectivo de alelos por locus (Ae), porcentaje de loci polimórficos (P) y heterocigosidad esperada (He). Diversidad genética total (H_T), dentro (H_S) y entre (D_{ST}) subpoblaciones, y el coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}) para especies terrestres con las mismas características de historias de vida de *Eriocaulon bilobatum*.

Especie o característica	A	Ae	P	He	H _T	H _S	D _{ST}	G _{ST}
<i>Eriocaulon bilobatum</i>	2.32	1.31	69.65	0.197	0.221	0.210	0.012	0.048
Monocotiledóneas	1.66	1.21	40.30	0.144	0.320	0.238	0.082	0.231
Anuales	1.48	1.15	30.20	0.105	0.330	0.200	0.130	0.357
Endémicas	1.39	1.09	26.30	0.063	0.263	0.163	0.100	0.248
Distribución restringida	1.45	1.13	30.00	0.105	0.300	0.215	0.085	0.242
Autógamas	1.31	1.10	20.00	0.074	0.334	0.149	0.185	0.510
Entrecruzamiento por animales	1.54	1.17	35.90	0.124	0.310	0.243	0.067	0.197
Reproducción sexual y asexual	1.47	1.14	29.40	0.103	0.305	0.236	0.069	0.213

Es notable que la diversidad genética dentro de las poblaciones de *E. bilobatum* es más alta a la esperada de acuerdo a las características ecológicas y de historia de vida registradas en la literatura. Existen varios factores que pudieran estar contribuyendo a su relativamente alta diversidad genética: 1) Aunque se considera como rara por su forma de distribución y por su dependencia de un hábitat amenazado de destrucción (Calderón 1996), es una especie localmente abundante. 2) Seguramente no se trata de una especie autógama sino entomófila. 3) En las cuatro poblaciones locales, el número efectivo de alelos por locus (Ae) es menor que el número de alelos por locus (A) (Apéndice 4), indicando la presencia de alelos raros. 4) Existe alto flujo génico (Cuadro 8) y este juega un papel importante en el aumento de la variación genética (Futuyma 1998).

El índice $F_{IS} = 0.312$ indica que existe moderada endogamia entre individuos dentro las poblaciones locales, lo cual puede explicarse por su sistema de apareamiento. Es muy probable que *E. bilobatum* sea una especie entomófila. Esto se manifiesta, tanto por la incompatibilidad temporal de los sexos dentro de una misma inflorescencia, como por la presencia frecuente del díptero en éstas (Cuadro 9). Aunque no se sabe el comportamiento

específico del díptero, por los resultados obtenidos es posible que visite inflorescencias vecinas y alejadas dentro de un mismo charco. Habitualmente se observa que *E. bilobatum* forma colonias a manera de césped entonces, si la mosca visita individuos cercanos, cabe la posibilidad que sean parte de un mismo clon, generando endogamia biparental. Aunque se colectaron individuos separados entre si al menos un metro, puede ser que los clones sean más grandes.

Los valores de F_{ST} (0.053) y G_{ST} (0.048) señalan que la diferenciación genética entre las poblaciones es baja a moderada (Apéndice 14). Estos niveles se relacionan con los altos niveles de flujo génico ($N_m = 4.92$ y 4.46), por lo que es posible que exista flujo de genes a larga distancia. Aunque no se encontraron datos en la literatura acerca de las estructuras que usa la especie para propagarse, ni de los mecanismos de dispersión, es muy probable que sea por medio de las semillas y que éstas sean dispersadas a través del viento y/o aves.

Si *E. bilobatum* se dispersara por medio de propágulos clonales, además de la baja diferenciación genética, existiría baja diversidad genética dentro de las poblaciones, situación que no se presenta en este estudio. Tampoco es probable que el flujo de genes a larga distancia sea por polen, ya que aunque se desconoce si la mosca polinizadora tiene la capacidad de viajar a grandes distancias, se sabe que, por cuestiones energéticas, generalmente los insectos pequeños tienen patrones de movimiento restringido (Loveless y Hamrick 1984). En cuanto a los mecanismos de dispersión, se descartan el agua y las actividades humanas ya que no existen corrientes de agua que unan a los charcos temporales y no se conoce algún uso humano para esta especie.

Si se comparan los valores de identidades y distancias genéticas entre las poblaciones locales de *E. bilobatum* ($I = 0.986$ y $D = 0.014$) con los valores promedio presentados por Gottlieb (1977) para poblaciones de la misma especie ($I = 0.95 \pm 0.02$), se observa que éstos son más altos que el promedio, indicando que las poblaciones locales son muy parecidas genéticamente.

Se esperaba que la deriva génica fuera un proceso determinante en su estructura genética, ya que muchas plantas acuáticas anuales que están adaptadas a ambientes efímeros (como los charcos de estudio), pasan regularmente por “cuellos de botella” y ciclos de colonización – extinción (Barrett *et al.* 1993). Sin embargo, la deriva génica no está afectando la estructura poblacional de *E. bilobatum*, ya que no existe alta diferenciación ni baja diversidad genética, que son dos consecuencias importantes de esta fuerza evolutiva.

Es probable que aspectos como el alto flujo de genes y la presencia de banco de semillas, estén eliminando los efectos de la deriva génica. De manera general se asume que el flujo génico es una fuerza que homogeneiza las poblaciones actuando en contra de la deriva génica y la selección natural (Ellstrand y Elam 1993). Por otro lado, debido a que los charcos temporales de Amealco y Huimilpan pasan por períodos de sequía – inundación, es necesario que las plantas tengan mecanismos que les permiten sobrevivir de un periodo a otro (banco de semillas). La persistencia del banco de semillas amortigua los “cuellos de botella” y permite que la diversidad genética alta se mantenga en las poblaciones (Edwards y Sharitz 2000).

Las cuatro poblaciones locales de *E. bilobatum* estudiadas pueden considerarse como una metapoblación, ya que existe extensivo flujo génico entre ellas. La baja diferenciación genética entre poblaciones locales, muestra la posibilidad de que los genotipos colonizadores provengan de una misma fuente y que, después de que las poblaciones fueron colonizadas no haya habido más procesos de extinción – colonización.

De las cuatro hipótesis planteadas, únicamente el índice de endogamia (que se esperaba fuera alto y fue moderado) se cumplió. Esto tiene que ver con el hecho de que las hipótesis se basaron en datos bibliográficos no completamente correctos, por lo que es posible decir que la diversidad y estructura genética de *E. bilobatum* están determinadas por sus características ecológicas y de historia de vida y por aspectos históricos.

6. Conclusiones

- *Eriocaulon bilobatum* presenta niveles relativamente altos de variación genética dentro de las poblaciones locales.
- Estos altos niveles seguramente se deben a: que la especie es localmente abundante, su tipo de polinización, mutaciones y flujo génico.
- Las características florales de *E. bilobatum* indican que es entomófila.
- La mayor parte de su diversidad se encuentra dentro y existe muy poca entre poblaciones.
- Los niveles de endogamia son moderados.
- Los niveles de endogamia (F) y la reproducción clonal de *E. bilobatum* indican que existe endogamia biparental dentro de las poblaciones.
- La diferenciación genética entre poblaciones es baja.
- Existe alto flujo génico entre poblaciones.
- El flujo génico puede ser por medio de semillas dispersadas a larga distancia por viento y /o aves.
- Las identidades genéticas de Nei muestran que las poblaciones locales son muy parecidas genéticamente.
- La deriva génica no está afectando la diversidad y estructura genética de *E. bilobatum*.

B. *Lilaea scilloides* (Poir.) Hauman

1. Características principales

Estatus taxonómico:	Monocotiledónea.
Hábitat:	Acuático.
Forma de vida:	Herbácea, enraizada emergente (Fig. 14).
Tiempo generacional:	Anual.
Rango de distribución geográfica:	Amplio, de Canadá a Argentina.
Reproducción:	Sexual; asexual clonal.
Sexo:	Femenino, masculino y hermafrodita en la misma planta.
Inflorescencia:	Dos tipos: 1. En espiga y 2. Basal, con una o dos flores.
Flores:	Femeninas: se localizan en la base de la planta y son desnudas, sésiles, ovario unilocular con un óvulo, estilo filiforme, extremadamente largo, estigma papiloso. Masculinas y hermafroditas: se localizan en la espiga, presentan un estambre con antera sésil. Las hermafroditas con pistilo unilocular, con un óvulo basal, estilo alargado o corto, estigma papiloso (Figs. 15 y 16).
Frutos:	Aquenio. El de las flores femeninas sin alas y con estructuras parecidas a un cuerno en la parte superior. El de las flores hermafroditas con una ala dorsal y dos laterales. Semillas solitarias, sin endospermo (Fig. 16).
Polinización:	Anemófila.
Diásporas:	Frutos y semillas.
Dispersión:	Hidrocora y ornitocora.



Figura 14. *Lilaea scilloides*: especie enraizada emergente



Figura 15. Inflorescencia de *Lilaea scilloides* con flores emergentes

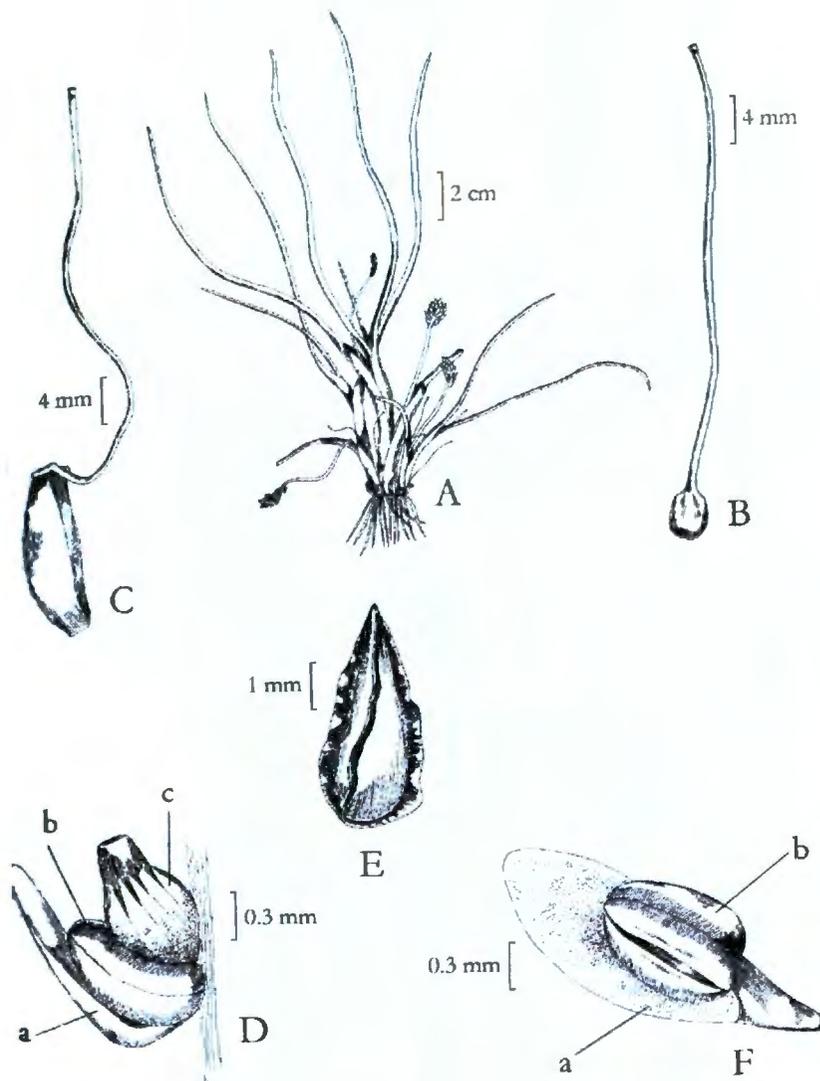


Fig. 16. *Lilaea scilloides* (Poir) Hauman. A. aspecto general de la planta, B. Flor femenina de la parte basal de la planta, C. Fruto de la parte basal de la planta, D. Flor hermafrodita de la espiga, a. apéndice (bráctea), b. antera, c. ovario, E. Fruto de la espiga, F. Flor masculina. Dibujo: Novelo y Lot (2001).

Otras características:

Debido a su morfología floral se considera que es polinizada por viento, aunque no hay observaciones directas. Una de las características más notables de esta especie es su alto heteromorfismo floral.

Referencias: Cook (1988,1996), Lot *et al.* (1999) y Novelo y Lot (2001).

2. Hipótesis

Debido a que *Lilaea scilloides* es una especie con distribución amplia y polinización por viento, se espera que tenga alta diversidad genética y bajos índices de endogamia. Si, como sucede con especies anemófilas, presenta alto flujo génico entre poblaciones locales, es probable que exista poca diferenciación genética entre estas.

3. Métodos

Se colectaron 480 individuos de 12 poblaciones (esta especie se encuentra en todas las poblaciones estudiadas). Para esta especie se usaron ocho enzimas que tiñeron bien en dos sistemas: C (APX, GOT, ME y PGI) y D (GDH, G-6PD, PGD y PGM). El sistema C se corrió a 65 mA durante ocho horas, el sistema D se corrió a 30 mA por nueve horas. Se usó el buffer de extracción "Microbuffer" (Werth 1985), por que permitió una mayor definición en esta especie.

4. Resultados

Se analizaron 14 loci de ocho enzimas en doce poblaciones locales de *Lilaea scilloides*: APX-1, GOT-1, GOT-2, GOT-3, GDH-1, G6PD-1, G6PD-2, ME-1, ME-2, PGD-1, PGD-2, PGI-1, PGI-2 y PGM-1. Las frecuencias alélicas se presentan en el Apéndice 6, se observa que de los 14 loci definidos, 13 fueron polimórficos al menos en alguna de las poblaciones estudiadas y un locus (PGD-1) resultó monomórfico en todas.

Variación genética dentro de las poblaciones

Se registraron un total de 45 alelos en los 14 loci definidos. El número de alelos por locus (A) fue de 1.78 con un intervalo de 1.29 a 2.07, mientras que el número efectivo de alelos por locus (Ae) fue de 1.15 con un intervalo de 1.08 a 1.25 (Cuadro 13). En la

mayoría de los loci A_e fue menor que A , lo que indica que la diversidad alélica se debe a la predominancia de un alelo en un locus entre las poblaciones y que los demás alelos se encuentran en frecuencias bajas. Los valores de A y A_e por locus y por población se muestran en los Apéndices 7 y 8.

El número promedio de individuos analizados para las 12 poblaciones locales fue de 38.1. El porcentaje de loci polimórficos (P) fue de 36.9, con un intervalo de 14.3 a 57.1. El promedio de heterocigosidad observada (H_o) fue de 0.064, con un intervalo de 0.009 a 0.115 y el de heterocigosidad esperada (H_e), de acuerdo al equilibrio de Hardy-Weinberg, fue de 0.103, con un intervalo de 0.058 a 0.157. En todas las poblaciones la heterocigosidad observada fue menor que la esperada, indicando deficiencia de individuos heterocigotos. El tamaño de muestra por población, así como los valores de A , A_e , P , H_o y H_e se muestran en el Cuadro 13.

Cuadro 13. Parámetros de variación genética estimados para las 12 poblaciones estudiadas de *Lilaea scilloides*. N = Tamaño de la muestra, A = Número de alelos por locus, A_e = Número efectivo de alelos por locus, P = Porcentaje de loci polimórficos, H_o = Heterocigosidad observada y H_e = Heterocigosidad esperada. Los errores estándar están dados entre paréntesis.

Pobs.	N	A	A_e	P	H_o	H_e
1 Huimilpan	39.1 (0.9)	1.57 (0.2)	1.08 (0.1)	28.6	0.036 (0.014)	0.058 (0.028)
2 Huimilpan	39.1 (0.5)	1.79 (0.2)	1.19 (0.1)	42.9	0.061 (0.039)	0.123 (0.043)
3 Huimilpan	37.4 (1.4)	1.29 (0.1)	1.09 (0.1)	14.3	0.017 (0.015)	0.060 (0.037)
4 Huimilpan	36.1 (1.9)	1.93 (0.2)	1.18 (0.1)	42.9	0.082 (0.032)	0.129 (0.040)
5 Huimilpan	35.6 (1.4)	1.86 (0.2)	1.14 (0.1)	35.70	0.009 (0.005)	0.101 (0.037)
6 Huimilpan	38.7 (0.4)	2.07 (0.2)	1.25 (0.2)	50.0	0.111 (0.043)	0.154 (0.049)
7 Huimilpan	39.4 (0.3)	1.71 (0.2)	1.13 (0.1)	35.7	0.081 (0.034)	0.093 (0.037)
8 Huimilpan	38.9 (0.7)	1.79 (0.3)	1.12 (0.1)	28.6	0.051 (0.018)	0.081 (0.034)
9 Amealco	39.1 (0.7)	1.86 (0.2)	1.08 (0.1)	21.4	0.064 (0.028)	0.065 (0.023)
10 Amealco	38.8 (0.9)	1.64 (0.2)	1.11 (0.1)	35.7	0.076 (0.035)	0.078 (0.033)
11 Amealco	39.9 (0.1)	1.79 (0.2)	1.24 (0.1)	57.1	0.115 (0.037)	0.157 (0.047)
12 Gto.	35.9 (1.8)	2.00 (0.3)	1.24 (0.2)	50.0	0.069 (0.029)	0.148 (0.047)
Promedio	38.1	1.78	1.15	36.9	0.064	0.103

Diversidad genética dentro y entre poblaciones

La diversidad genética total (H_T) es baja, siendo el promedio igual a 0.121, con un intervalo de 0.002 en el locus G6PD-2 a 0.436 en el locus GOT-3. La mayor parte de la diversidad genética se encuentra dentro de las poblaciones ($H_S = 0.111$) y existe poca entre las poblaciones ($D_{ST} = 0.010$), lo cual indica que las 12 poblaciones locales estudiadas comparten una gran proporción de la diversidad genética total. El valor más alto de H_S se encuentra en el locus GOT-3 ($H_S = 0.402$) y el más bajo en el locus G6PD-2 ($H_S = 0.002$), mientras que el valor más alto de diversidad entre poblaciones se presenta en el locus PGI-1 ($D_{ST} = 0.021$) y el más bajo en los loci G6PD-2 ($D_{ST} = 0.000$). El coeficiente de diferenciación genética ($G_{ST} = 0.077$) indica que 7.7 % de la diversidad genética se encuentra entre poblaciones y 92.3 % dentro de las poblaciones. Los valores de H_T , H_S , D_{ST} y G_{ST} se muestran en el Cuadro 14.

Cuadro 14. Diversidad genética total (H_T), dentro (H_S) y entre (D_{ST}) subpoblaciones, y el coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}) para las poblaciones de *Lilaea scilloides*.

Locus	H_T	H_S	D_{ST}	G_{ST}
APX-1	0.091	0.085	0.006	0.065
GOT-1	0.183	0.165	0.018	0.097
GOT-2	0.044	0.040	0.004	0.092
GOT-3	0.436	0.402	0.034	0.077
GDH-1	0.108	0.104	0.003	0.030
G6PD-1	0.035	0.031	0.005	0.133
G6PD-2	0.002	0.002	0.000	0.011
ME-1	0.082	0.074	0.007	0.091
ME-2	0.145	0.127	0.018	0.124
PGD-2	0.042	0.039	0.002	0.057
PGI-1	0.203	0.182	0.021	0.103
PGI-2	0.126	0.115	0.011	0.084
PGM-1	0.072	0.070	0.003	0.040
Promedio	0.121	0.111	0.010	0.077

Índice de endogamia y estructura genética

Se obtuvieron 95 valores de índice de fijación o endogamia (F) en los 13 loci polimórficos de las 12 poblaciones estudiadas (Cuadro 15), a todos se les aplicó una prueba de χ^2 . Los valores de F que no fueron significativamente diferentes de cero indican que la población está en equilibrio de Hardy-Weinberg en esos loci, es decir, que el apareamiento entre los individuos ocurre al azar. Los valores de F que fueron significativamente mayores de cero indican exceso de homocigotos y los valores que fueron significativamente menores de cero indican exceso de heterocigotos (Hartl y Clark 1997).

Existen 34 loci (35.78 %) con valores positivos y significativamente diferentes de cero, es decir con exceso de homocigotos. Solamente dos loci (2.10 %) presentaron valores negativos y significativamente diferentes de cero, el locus PGI-2 de la población dos (F = -0.311) y el locus PGI-1 de la población seis (F = -0.418), lo cual quiere decir que para éstos existe un exceso de heterocigotos. De los valores restantes, 50 fueron negativos y nueve fueron positivos, pero ninguno fue significativamente diferente de cero, lo cual indica que 62.10 % de los loci está en equilibrio de Hardy-Weinberg. A partir de los valores de H_o y H_e se estimó el índice de endogamia por población y a los valores obtenidos también se les llevó a cabo una prueba de χ^2 . Las poblaciones uno, seis, siete, nueve, diez y once no presentan valores significativamente diferentes de cero, indicando que estas poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, mientras que las poblaciones dos, tres, cuatro, cinco, ocho y doce presentan valores positivos y significativamente diferentes de cero, lo que señala que estas poblaciones tienen exceso de individuos homocigotos, es decir que existe endogamia. Los índices de fijación por locus y por población, así como la F poblacional, se observan en el Cuadro 15.

Cuadro 15. Índices de fijación o endogamia (F) para cada locus polimórfico de 12 poblaciones de *Lilaeae scilloides*. Los valores significativamente diferentes de cero se denotan con asteriscos. ***P<0.001; **P<0.01; *P<0.05.

Pobs.	Pob. 1	Pob. 2	Pob. 3	Pob.4	Pob. 5	Pob. 6	Pob. 7	Pob. 8	Pob. 9	Pob. 10	Pob. 11	Pob. 12
Locus												
APX-1	-0.098				1.000***	-0.013	-0.091		-0.013	-0.039	-0.068	0.389
GOT-1	-0.013	1.000***		0.024	1.000***	0.457**	1.000***	-0.096		0.360*	0.436**	-0.026
GOT-2					0.805***	1.000***			1.000***			
GOT-3	0.865***	1.000***	1.000***	-0.127	1.000***	0.750***	0.122	0.559***	0.657***	0.268	0.607***	0.956***
GDH-1	-0.053	1.000***	1.000***	-0.039		-0.070	-0.026	-0.042	-0.068		1.000***	0.538***
G6PD-1		-0.013			-0.013				-0.013			-0.216
G6PD-2							-0.013					
ME-1		1.000***		1.000***	1.000***	-0.040			-0.040	-0.049	-0.270	
ME-2		-0.015	0.309	1.000***	1.000***		0.066	0.875***	-0.013			
PGD-2				0.447**		-0.013	0.481***					1.000***
PGI-1	-0.013	-0.194		0.196		-0.418**		-0.039	-0.231	-0.290	-0.176	0.822***
PGI-2	-0.013	-0.311*		-0.040	-0.014	-0.115		-0.026	-0.067	-0.053	-0.053	0.367*
PGM-1	-0.053		-0.013	-0.013	-0.013	0.229	-0.068	-0.036	-0.026		0.127	-0.013
Promedio	0.377	0.503**	0.712*	0.360*	0.905***	0.278	0.127	0.379*	0.016	0.031	0.273	0.533**

Los estadísticos F de Wright: F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} se muestran en el Cuadro 16. Las estimaciones de F_{IS} fueron significativamente diferentes de cero en diez loci, es decir, que 76.92 % de éstos no se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg. De éstos, en 61.53 % (ocho loci) existe exceso de homocigotos y en 15.38 % (dos loci) existe exceso de heterocigotos. Los tres valores restantes fueron negativos pero no significativamente diferentes de cero, por lo que solamente 23.08 % de los loci se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg. El promedio de F_{IS} fue de 0.372 y fue significativamente diferente de cero, indicando que existe endogamia entre individuos dentro de las poblaciones locales.

Las estimaciones de F_{IT} fueron positivas y significativamente diferentes de cero en ocho loci (61.53 %), indicando que más de la mitad de los loci presentan exceso de homocigotos, de los cinco valores restantes, tres fueron negativos y dos positivos, pero no significativamente diferentes de cero, por lo que únicamente 38.46 % de los loci están en equilibrio de Hardy-Weinberg. El promedio de F_{IT} presentó un valor de 0.425 y fue significativamente diferente de cero, señalando que la diferenciación de las poblaciones locales con respecto a la población total se debe a la endogamia.

Los valores de F_{ST} fueron significativamente diferentes de cero en doce loci (92.30 %) y solamente un locus (G6PD-1) no fue significativamente diferente de cero. El promedio de F_{ST} tiene un valor de 0.084 y tuvo diferencias significativas de cero, lo cual indica diferenciación genética moderada entre poblaciones locales (Hartl y Clark 1997). Este valor concuerda con el índice G_{ST} (Cuadro 14), sugiriendo que la mayoría de la diversidad genética de *L. scilloides* se encuentra dentro de las poblaciones.

Cuadro 16. Estadísticos F de Wright para *Lilaea scilloides*. Los valores significativamente diferentes de cero se denotan con asteriscos. ***P<0.001; **P<0.01; *P<0.05.

Locus	F _{IS}	F _{IT}	F _{ST}
APX-1	0.235***	0.285***	0.065***
GOT-1	0.426***	0.482***	0.098***
GOT-2	0.885***	0.895***	0.092***
GOT-3	0.698***	0.721***	0.077***
GDH-1	0.452***	0.468***	0.030***
G6PD1	-0.175***	-0.017	0.134***
G6PD2	-0.013	-0.001	0.011
ME-1	0.222***	0.292***	0.091***
ME-2	0.561***	0.616***	0.124***
PGD-2	0.592***	0.616***	0.057***
PGI-1	-0.120**	-0.005	0.103***
PGI-2	-0.019	0.067	0.084***
PGM-1	-0.006	0.034	0.040***
Promedio	0.372***	0.425***	0.084***

Flujo génico

El flujo génico entre poblaciones (Cuadro 17) presenta valores de 2.981 (calculado con el promedio de G_{ST}) y de 2.726 (calculado con el promedio de F_{ST} obtenido de biosys). El valor más bajo fue de 1.766 en el locus ME-2 y el valor más alto fue de 22.477 en el locus G6PD-2. Como el valor de Nm es mayor a uno se considera que existe alto flujo génico entre las 12 poblaciones locales estudiadas de *L. scilloides*.

Cuadro 17. Flujo génico entre las doce poblaciones de *Lilaea scilloides*.

Locus	F _{ST} (G _{ST})	Nm
APX-1	0.065	3.596
GOT-1	0.098	2.301
GOT-2	0.092	2.467
GOT-3	0.077	2.997
GDH-1	0.03	8.083
G6PD-1	0.134	1.616
G6PD-2	0.011	22.477
ME-1	0.091	2.497
ME-2	0.124	1.766
PGD-2	0.057	4.136
PGI-1	0.103	2.177
PGI-2	0.084	2.726
PGM-1	0.040	6.000
Promedio calculado	0.077	2.981
Promedio Biosys	0.084	2.726

Identidades y distancias genéticas

Las doce poblaciones locales estudiadas son muy parecidas genéticamente (Fig. 17). Las identidades genéticas de Nei (1978) tienen un intervalo de 0.973 a 1.000, con un promedio de $I = 0.990$, mientras que en las distancias genéticas el intervalo es de 0.000 a 0.028, con un promedio de $D = 0.010$ (Apéndice 9). En la Figura 17 se observan cuatro grupos, el primero incluye a las poblaciones dos y seis de Huimilpan y a la 11 de Amealco, el segundo grupo incluye a las poblaciones cinco, uno, tres, siete y ocho de Huimilpan, el tercer grupo incluye a las poblaciones nueve y diez de Amealco y a la cuatro de Huimilpan y por último, la población menos parecida genéticamente a las demás, es la doce de Guanajuato. De forma general se observa que las poblaciones más parecidas genéticamente no son las más cercanas geográficamente, únicamente la población 12 de Guanajuato es la más alejada genéticamente y al mismo tiempo la más alejada geográficamente. En la Figura 18 se muestra la ubicación de los charcos temporales colectados para esta especie.

Figura 17. Dendrograma de identidad genética de Nei (1978), construido mediante UPGMA, para las 12 poblaciones de *Lilaea scilloides*.

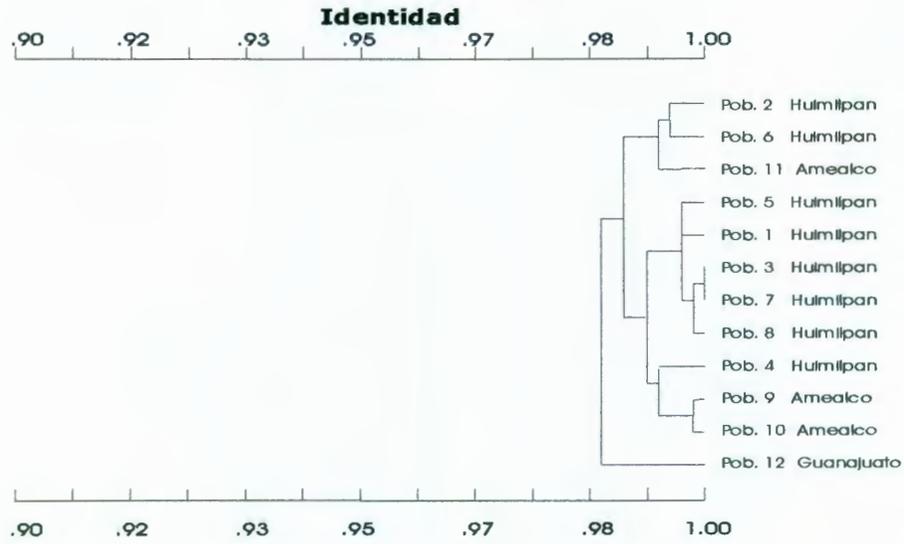
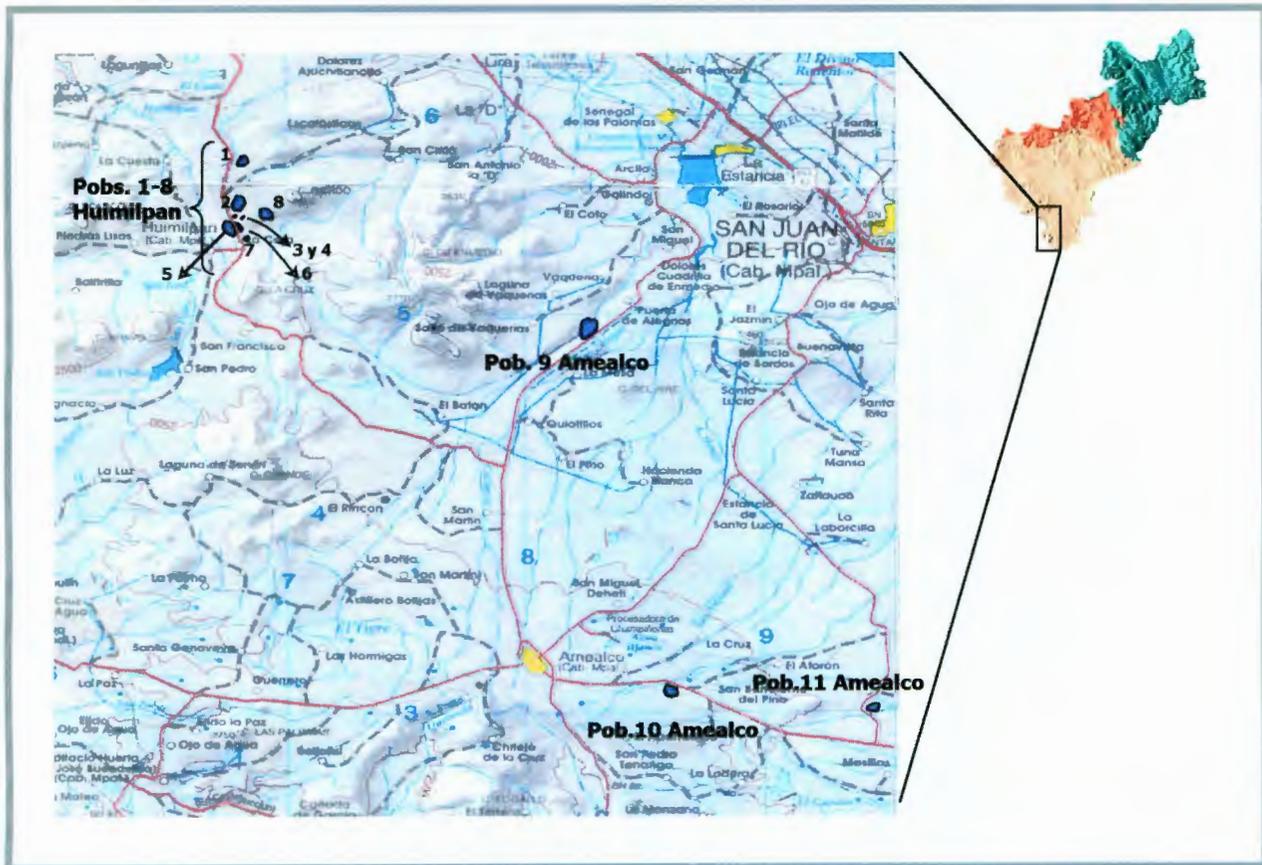


Figura 18. Ubicación de las poblaciones locales analizadas para *Lilaea scilloides* en Amealco y Huimilpan



5. Discusión

Debido a que *Lilaea scilloides* se registra en la literatura como una especie con distribución amplia (Novelo y Lot 2001) y polinización por viento (Cook 1988), se esperaba que tuviera alta variación genética dentro de las poblaciones y poca endogamia. También se hipotetizó que, por consecuencia de la anemofilia, los niveles de flujo génico serían altos y la diferenciación entre las poblaciones sería baja.

En todos los estudios revisados se registra a *L. scilloides* como una especie anemófila, pero no se encontraron estudios específicos de su biología floral. Por esta razón fue necesario llevar a cabo observaciones de campo, laboratorio y acetólisis, que permitieran tener más fundamentos para la adecuada interpretación de los resultados (Cuadro 18). Aunque los datos obtenidos fueron valiosos, no fue posible determinar de forma precisa su sistema de reproducción, debido principalmente a su alto heteromorfismo floral, incluso considerado como anómalo (Sculthorpe 1967, Cook 1988).

Cuadro 18. Algunos aspectos de la biología floral de *Lilaea scilloides*

***Lilaea scilloides* (Poir.) Hauman**

En este cuadro se puntualizan las observaciones llevadas a cabo en campo y laboratorio acerca de la biología floral de *Lilaea scilloides*.

- La especie es monoica y hermafrodita. Presenta inflorescencias emergentes (Fig. 15) en forma de espiga que tienen tanto flores masculinas (en el ápice) como flores hermafroditas (en el resto de la inflorescencia). Además, existen flores femeninas (Fig. 16) que surgen de la base de la planta y, por lo tanto, se encuentran sumergidas, éstas exhiben estilos muy largos filiformes que crecen hasta la superficie del agua (sin salir de esta), y estigmas papilosos. Se observó que una planta puede presentar al mismo tiempo espigas con flores, espigas con frutos y flores de la base con estilos flotando en la superficie del agua.

- Al parecer, en las flores hermafroditas de la espiga, el androceo y gineceo alcanzan su madurez al mismo tiempo (es necesario estudios más detallados para determinar este aspecto con certeza).
- Seguramente las flores femeninas basales de la planta sí están siendo polinizadas. Esto por las siguientes razones: 1) La presencia del tubo polínico en sus estilos (Fig. 19), 2) Se observaron embriones y 3) Existen frutos maduros.

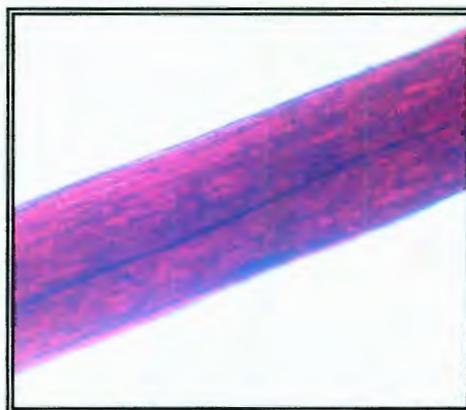


Fig. 19. Tubo polínico dentro de los estilos de las flores basales de *Lilaea scilloides*.

- Las flores femeninas sumergidas únicamente pueden ser fertilizadas por polen proveniente de las espigas, ya sea de la misma planta o de otras plantas. Quizá el polen de las espigas cae en el agua y se adhiere a los estigmas que se encuentran en la superficie. Así, las flores basales tienen un síndrome de polinización hidrófila, mientras que las espigas presentan síndrome de polinización similar al de una especie terrestre.
- Las espigas de *L. scilloides* no florecen sincrónicamente, lo cual se supone es una característica de las especies polinizadas por viento.
- Flores hermafroditas de la espiga y flores basales (femeninas) con un solo óvulo.

- Las espigas presentan frutos con estructuras a manera de alas, mientras que los frutos de la base (que se encuentran sumergidos) tienen estructuras a manera de cuernos (Fig. 16). Las espigas que ya tienen frutos, están sumergidas y movimientos aún leves, provocan que se desprendan y floten.
- El polen tratado con acetólisis tiene la siguiente descripción: Granos con forma elíptica, tripantocolpado (Moore *et al.* 1991), miden 40 μm en su eje ecuatorial y 50 μm en su eje polar, y tiene una ornamentación reticulada (Fig. 20). Generalmente se asume que los granos de polen con superficie completamente lisa y tamaño y/o número de aperturas reducido, son característicos de plantas polinizadas por viento, lo cual no se presenta en el polen de *L. scilloides*.

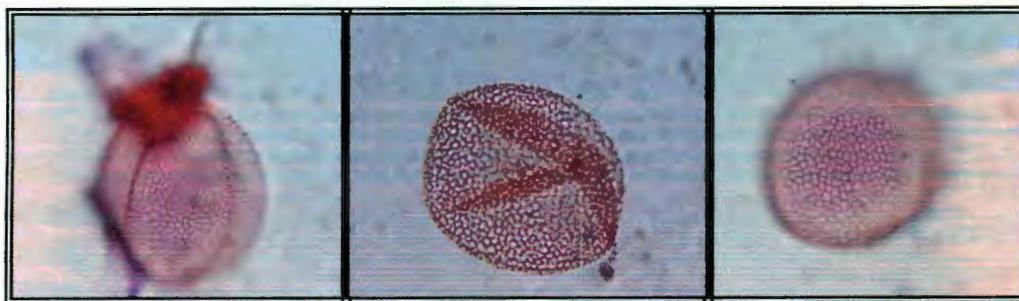


Fig. 20. Forma, tipo de apertura y ornamentación del grano de polen de *Lilaea scilloides*

La variación genética presente en *L. scilloides* ($A=1.78$, $A_e=1.15$, $P=36.90$, $H_o=0.064$ y $H_e=0.103$) es similar o un poco más baja que lo observado en especies acuáticas y terrestres con características similares de historias de vida (Cuadros 19 y 20). Si se compara únicamente con especies terrestres anemófilas ($A=1.79$, $A_e=1.19$, $P=49.70$ y $H_e=0.148$), tiene niveles muy parecidos en el número de alelos por locus y el número efectivo de alelos por locus (A y A_e) y más bajos con respecto al porcentaje de loci polimórficos y la heterocigosidad esperada (P y H_e). En las doce poblaciones locales A_e es menor que A , indicando la presencia de alelos raros, seguramente surgidos por mutaciones.

Cuadro 19. Índices de diversidad genética dentro de las poblaciones locales: número de alelos por locus (A), porcentaje de loci polimórficos (P) y heterocigosidad esperada (He). Diversidad genética total (H_T), y el coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}) para especies acuáticas con características de historias de vida similares a *Lilaea scilloides*.

Especie	A	P	He	H_T	G_{ST}
<i>Lilaea scilloides</i>	1.78	36.90	0.103	0.121	0.077
<i>Carex basiantha</i>	1.46	40.21	0.138	0.156	0.114
<i>Carex willdenowii</i>	1.50	40.00	0.148	0.177	0.167
<i>Typha minima</i>	1.50		0.146		

Cuadro 20. Índices de diversidad genética dentro de las poblaciones locales: número de alelos por locus (A), número efectivo de alelos por locus (Ae), porcentaje de loci polimórficos (P) y heterocigosidad esperada (He). Diversidad genética total (H_T), dentro (H_S) y entre (D_{ST}) subpoblaciones, y el coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}) para especies terrestres con las mismas características de historias de vida de *Lilaea scilloides*. Valores tomados de Hamrick y Godt (1990).

Especie o característica	A	Ae	P	He	H_T	H_S	D_{ST}	G_{ST}
<i>Lilaea scilloides</i>	1.78	1.15	36.90	0.103	0.121	0.111	0.010	0.077
Monocotiledóneas	1.66	1.21	40.30	0.144	0.320	0.238	0.082	0.231
Anuales	1.48	1.15	30.20	0.105	0.330	0.200	0.130	0.357
Distribución amplia	1.72	1.23	43.00	0.159	0.347	0.267	0.080	0.210
Anemófilas	1.79	1.19	49.70	0.148	0.293	0.259	0.034	0.099
Reproducción sexual y asexual	1.47	1.14	29.40	0.103	0.305	0.236	0.069	0.213

El índice $F_{IS} = 0.372$ indica que la especie tiene niveles moderados de endogamia entre individuos dentro las poblaciones locales. Para determinar si una especie es polinizada por viento o no, generalmente se usan criterios morfológicos y en pocas ocasiones existen observaciones directas (Cook 1988). Éste es el caso de *L. scilloides*, la cual se propuso como anemófila debido a la biología floral de las espigas, pero no se tomaron en cuenta las flores basales sumergidas, que obviamente, no pueden ser polinizadas por este medio. La especie presenta características que la relacionan con un síndrome de polinización por viento y, al mismo tiempo, otras que son contrastantes (Cuadro 21).

Cuadro 21. Características de *Lilaea scilloides* que la relacionan y que contrastan con un síndrome de polinización por viento (Cook 1988 y Haynes 1988).

Características que se relacionan con un síndrome anemófilo

- Tamaño del polen entre 20–40 (-60) μm
- Inflorescencia en espiga compacta, arriba de la superficie del agua
- Perianto y brácteas reducidas
- Número de óvulos por flor usualmente reducidos

Características que se contrastan con un síndrome anemófilo

- Flores hermafroditas
- Polen con superficie reticulada
- Floración asincrónica
- El estilo de las flores femeninas se encuentra en la superficie del agua

Al considerar todas estas características y relacionarlas con los índices de variación genética y endogamia, es probable que *L. scilloides* tenga al mismo tiempo polinización por viento (en las flores de las espigas) y polinización por agua (en las flores femeninas basales). La polinización por viento asegura el entrecruzamiento y por lo tanto aumenta los niveles de diversidad genética, en cambio la polinización por agua puede tener como consecuencia geitonogamia (fertilización de una flor por polen procedente de otra flor de la misma planta) o endogamia biparental (debido a la especie también exhibe reproducción clonal), las cuales reducen los niveles de diversidad genética y aumentan los índices de endogamia. Es posible que los dos tipos de polinización estén influyendo de manera importante en la estructura y diversidad genética de la especie.

Los valores de F_{ST} (0.084) y G_{ST} (0.077) señalan que la diferenciación genética entre las poblaciones es moderada (Apéndice 14). Estos niveles se relacionan con el flujo génico ($Nm = 2.98$ y 2.72), el cual existe a larga distancia seguramente por polen y probablemente también por semillas. En la literatura se menciona que las diásporas de esta especie son frutos o semillas dispersados por medio del agua y/o las aves. Sin embargo, debido a que

los frutos de las espigas tienen estructuras a manera de alas, también es posible que estos sean dispersados a larga distancia por viento.

Al comparar los valores de identidades y distancias genéticas entre las poblaciones locales de *L. scilloides* ($I = 0.990$ y $D = 0.010$) con los valores promedio presentados por Gottlieb (1977) para poblaciones de la misma especie ($I = 0.95 \pm 0.02$), se observa que las poblaciones locales son muy parecidas genéticamente. En este caso, es más probable que el flujo génico por medio de polen exista entre poblaciones más cercanas, lo cual se refleja (aunque poco) en el dendograma (Fig. 17), seguramente también existe dispersión a larga distancia por otros medios (semillas y frutos).

También es posible que la alta similitud genética se deba a cuestiones históricas. Es posible que las poblaciones locales fueran fundadas por un pequeño número de individuos provenientes de un sólo recurso, que después tuvieron una extensiva reproducción clonal, y que no han sufrido procesos de colonización – extinción importantes.

6. Conclusiones

- *Lilaea scilloides* tiene niveles promedio o un poco más bajos de variación genética dentro de las poblaciones, en comparación con especies acuáticas y terrestres con características ecológicas y de historias de vida parecidas.
- Estos niveles de variación genética seguramente son el resultado de su tipo de polinización y flujo génico considerable.
- Las características florales de *L. scilloides* indican que la especie tiene dos tipos de polinización: anemófila e hidrófila.
- La mayor parte de su diversidad se encuentra dentro y muy poca entre poblaciones.
- Los niveles de endogamia son moderados.
- La reproducción clonal de la especie, indica que puede haber geitonogamia y/o endogamia biparental dentro de las poblaciones.
- La diferenciación genética entre poblaciones es moderada.
- Existe alto flujo génico entre poblaciones.
- El flujo génico a larga distancia es seguramente por polen y también por semillas o frutos.
- Las identidades genéticas de Nei muestran que las poblaciones locales son muy parecidas genéticamente
- Aspectos históricos también pueden explicar la alta identidad genética entre poblaciones.

C. *Sagittaria demersa* J. G. Smith

1. Características principales

Estatus taxonómico:	Monocotiledónea.
Hábitat:	Acuático.
Forma de vida:	Herbácea, enraizada emergente (Fig.21).
Tiempo generacional:	Anual.
Rango de distribución geográfica:	Reducido. Especie endémica de México.
Reproducción:	Sexual; asexual: rizomas
Sexo:	Monoico.
Inflorescencia:	Escapo con dos a siete verticilos, cada uno con tres flores (Fig. 22).
Flores:	Masculinas: ubicadas en los verticilos superiores, con aproximadamente 12 a 15 estambres y pétalos blancos de 12 mm de largo y 9 mm de ancho. Femeninas: ubicadas en los verticilos inferiores, con pétalos blancos de aproximadamente de 8 mm y 6 mm de ancho.
Frutos:	Aquenio, ovoides, de 1.6 a 2.0 mm de largo.
Polinización:	Entomófila.
Diásporas:	Cormos, rizomas y semillas.
Dispersión:	Hidrocora y zoocora.



Figura 21. Aspecto general de *Sagittaria demersa*.



Figura 22. Flores de *Sagittaria demersa* con mosca polinizadora.

Otras características: Se conoce sólo de lagos y pozas de las zonas montañosas de México. Considerada como especie rara, endémica y localmente abundante. Presenta inflorescencias flotantes.

Referencias: Haynes y Holm-Nielsen (1993), Lot *et al.* (1999) y Domínguez (2001).

2. Hipótesis

Sagittaria demersa es una especie con distribución geográfica restringida, considerada como rara, pero al mismo tiempo con poblaciones locales abundantes, por lo que se espera que tenga moderada diversidad genética dentro de las poblaciones. Debido a su polinización entomófila, y tomado en cuenta el comportamiento del polinizador* y que *S. demersa* tiene reproducción asexual por rizomas, es probable que presente endogamia moderada, altos niveles de diferenciación genética entre poblaciones y bajo o nulo flujo génico entre poblaciones.

3. Métodos

Se colectaron 400 individuos de diez poblaciones (1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 12). Para esta especie se usaron seis enzimas que tiñeron bien en el sistema C: APX, CPX, GOT, MDH, ME y PGI. Este sistema se corrió a 65 mA durante siete horas y media. Se usó el buffer de extracción *Camellia* (Wendel y Parks 1982), debido a que fue el que permitió una mayor definición en esta especie.

* Polinizador: díptero de 3-4 mm que visita flores de una misma planta y flores cercanas de diferentes plantas. Debido a su tamaño, es probable que sólo visite plantas de un solo charco, razón por la que se hipotetizó que *Sagittaria demersa* tendría bajo o nulo flujo génico entre poblaciones.

4. Resultados

Se analizaron 11 loci de seis enzimas en diez poblaciones locales de *S. demersa*: APX-1, CPX-1, CPX-2, CPX-3, GOT-1, GOT-2, GOT-3, MDH-1, ME-1, PGI-1 y PGI-2. Las frecuencias alélicas se presentan en el Apéndice 10, se observa que los 11 loci definidos fueron polimórficos en todas las poblaciones, a excepción de los loci APX-1 de la población diez, GOT-1 de la población dos y nueve y ME-1 de la población tres y diez los cuales fueron monomórficos.

Variación genética dentro de las poblaciones

Se registraron un total de 47 alelos en los 11 loci definidos. El número de alelos por locus (A) fue de 2.73 con un intervalo de 2.45 a 2.91, mientras que el número efectivo de alelos por locus (Ae) fue de 1.68 con un intervalo de 1.45 a 1.81 (Cuadro 22). En todos los loci Ae fue menor que A, lo que indica que la diversidad alélica se debe a la predominancia de un alelo en un locus entre las poblaciones y que los demás alelos se encuentran en frecuencias bajas. Los valores de A y Ae por locus y por población se muestran en los Apéndices 11 y 12 respectivamente.

El número promedio de individuos analizados para las diez poblaciones locales fue de 36.1. El porcentaje de loci polimórficos (P) fue de 92.7 con un intervalo de 81.8 a 100.0. El promedio de heterocigosidad observada (Ho) fue de 0.225 con un intervalo de 0.182 a 0.277 y el de heterocigosidad esperada (He) de acuerdo al equilibrio de Hardy-Weinberg fue de 0.371 con un intervalo de 0.286 a 0.426. En todas las poblaciones la heterocigosidad observada fue menor que la esperada, indicando deficiencia de individuos heterocigotos. El tamaño de muestra por población así como los valores de A, Ae, P, Ho y He se muestran en el Cuadro 22.

Cuadro 22. Parámetros de variación genética estimados para las diez poblaciones estudiadas de *Sagittaria demersa*. N = tamaño de la muestra, A = número de alelos por locus, Ae = número efectivo de alelos por locus, P = porcentaje de loci polimórficos, Ho = heterocigosidad observada y He = heterocigosidad esperada. Los errores estándar están entre paréntesis.

Pobs.	N	A	Ae	P	Ho	He
1 Huimilpan	39.3 (0.4)	2.91 (0.2)	1.80 (0.2)	100.0	0.252 (0.042)	0.413 (0.049)
2 Huimilpan	36.9 (0.6)	2.45 (0.2)	1.64 (0.2)	81.8	0.271 (0.066)	0.343 (0.061)
3 Huimilpan	19.1 (0.8)	2.82 (0.3)	1.78 (0.2)	90.9	0.277 (0.084)	0.402 (0.061)
5 Huimilpan	36.0 (0.6)	2.73 (0.2)	1.72 (0.2)	100.0	0.227 (0.061)	0.395 (0.045)
6 Huimilpan	37.0 (1.1)	2.91 (0.3)	1.81 (0.2)	90.9	0.182 (0.047)	0.426 (0.047)
7 Huimilpan	39.5 (0.4)	2.64 (0.2)	1.45 (0.2)	90.9	0.230 (0.061)	0.286 (0.046)
8 Huimilpan	36.5 (1.1)	2.82 (0.1)	1.73 (0.2)	100.0	0.201 (0.037)	0.402 (0.043)
9 Amealco	38.1 (0.5)	2.64 (0.2)	1.69 (0.2)	90.9	0.185 (0.053)	0.369 (0.058)
10 Amealco	39.9 (0.1)	2.55 (0.3)	1.54 (0.2)	81.8	0.221 (0.043)	0.310 (0.058)
12 Gto.	38.8 (0.4)	2.82 (0.4)	1.59 (0.1)	100.0	0.205 (0.046)	0.365 (0.029)
Promedio	36.1	2.73	1.68	92.7	0.225	0.371

Diversidad genética dentro y entre poblaciones

La diversidad genética total (H_T) es alta, siendo el promedio igual a 0.429, con un intervalo de 0.228 en el locus GOT-2 a 0.564 en el locus CPX-3. La mayor parte de la diversidad genética se encuentra dentro de las poblaciones ($H_S = 0.366$) y poca entre las poblaciones ($D_{ST} = 0.063$), lo cual indica que las diez poblaciones locales estudiadas comparten una gran proporción de la diversidad genética total. El valor más alto de H_S se encuentra en el locus CPX-2 ($H_S = 0.463$) y el más bajo en el locus GOT-2 ($H_S = 0.200$), mientras que el valor más alto de diversidad entre poblaciones se presenta en el locus PGI-1 ($D_{ST} = 0.142$) y el más bajo en los loci PGI-2 ($D_{ST} = 0.015$). El coeficiente de diferenciación genética ($G_{ST} = 0.137$) indica que 13.7 % de la diversidad genética se encuentra entre poblaciones y 86.3 % dentro de las poblaciones. Los valores de H_T , H_S , D_{ST} y G_{ST} se muestran en el Cuadro 23.

Cuadro 23. Diversidad genética total (H_T), dentro (H_S) y entre (D_{ST}) subpoblaciones, y el coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}) para las poblaciones de *Sagittaria demersa*.

Locus	H_T	H_S	D_{ST}	G_{ST}
APX-1	0.418	0.369	0.048	0.115
CPX-1	0.532	0.395	0.137	0.257
CPX-2	0.559	0.463	0.096	0.171
CPX-3	0.564	0.443	0.121	0.215
GOT-1	0.327	0.285	0.042	0.129
GOT-2	0.228	0.200	0.028	0.124
GOT-3	0.451	0.424	0.027	0.060
MDH-1	0.472	0.454	0.018	0.039
ME-1	0.258	0.234	0.024	0.092
PGI-1	0.531	0.388	0.142	0.268
PGI-2	0.382	0.367	0.015	0.039
Promedio	0.429	0.366	0.063	0.137

Índice de endogamia y estructura genética

Se obtuvieron 105 valores de índice de fijación o endogamia (F) en los 11 loci polimórficos de las diez poblaciones estudiadas (Cuadro 24), a todos se les aplicó una prueba de χ^2 . Los valores de F que no fueron significativamente diferentes de cero indican que la población está en equilibrio de Hardy-Weinberg en esos loci, es decir, que el apareamiento entre los individuos ocurre al azar. Los valores de F que fueron significativamente mayores de cero indican exceso de homocigotos y los valores que fueron significativamente menores de cero indican exceso de heterocigotos (Hartl y Clark 1997).

Existen 50 loci (47.62 %) con valores positivos y significativamente diferentes de cero, es decir con exceso de homocigotos. Solamente un locus (0.95 %) presentó valores negativos y significativamente diferentes de cero, el locus PGI-2 de la población siete ($F = -0.378$), lo cual quiere decir que para este locus existe exceso de heterocigotos. De los valores restantes, 23 fueron negativos y 31 fueron positivos, pero ninguno fue significativamente diferente de cero, lo cual indica que 51.43 % de los loci están en equilibrio de Hardy-Weinberg. A partir de los valores de H_o y H_e se estimó el índice de

endogamia por población y a los valores obtenidos también se les aplicó una prueba de χ^2 . Las poblaciones dos, tres, siete y diez no presentan valores significativamente diferentes de cero, indicando que estas poblaciones se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg, mientras que las poblaciones uno, cinco, seis, ocho, nueve y doce presentan valores positivos y significativamente diferentes de cero, lo que señala que estas poblaciones tienen exceso de individuos homocigotos, es decir que existe endogamia. Los índices de fijación por locus y por población, así como la F poblacional, se observan en el Cuadro 24.

Los estadísticos F de Wright: F_{IS} , F_{IT} y F_{ST} se muestran en el Cuadro 25. Las estimaciones de F_{IS} fueron positivas y significativamente diferentes de cero en nueve loci, es decir, que 81.82 % de estos existe exceso de homocigotos. Los dos valores restantes fueron negativos pero no significativamente diferentes de cero, por lo que solamente 18.18 % de los loci se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg. El promedio de F_{IS} fue de 0.384 y fue significativamente diferente de cero, indicando que existe endogamia entre individuos dentro de las poblaciones locales.

Las estimaciones de F_{IT} fueron positivas y significativamente diferentes de cero en nueve loci, indicando que 81.82 % de los loci presentan exceso de homocigotos, de los dos valores restantes, uno fue negativo y uno fue positivo, pero no significativamente diferentes de cero, por lo que únicamente 18.18 % de los loci están en equilibrio de Hardy-Weinberg. El promedio de F_{IT} presentó un valor de 0.475 y fue significativamente diferente de cero, señalando que la diferenciación de las poblaciones locales con respecto a la población total se debe a la endogamia.

Cuadro 24. Índices de fijación o endogamia (F) para cada locus polimórfico de diez poblaciones de *Sagittaria demersa*. Los valores significativamente diferentes de cero se denotan con asteriscos. *** P < 0.001; **P < 0.01; *P < 0.05.

Locus	Pob. 1	Pob. 2	Pob. 3	Pob. 5	Pob. 6	Pob. 7	Pob. 8	Pob. 9	Pob. 10	Pob. 12
APX-1	0.505***	0.343*	0.753***	0.105	0.654***	0.092	0.232	0.061		0.851***
CPX-1	0.539***	0.684***	1.000***	0.506***	0.956***	0.393**	0.832***	0.759***	-0.010	1.000***
CPX-2	0.862***	0.845***	1.000***	0.816***	0.729***	1.000***	0.859***	1.000***	0.757***	0.559***
CPX-3	0.787***	-0.014	0.145	0.849***	1.000***	0.262	0.598***	0.875***	0.288	0.628***
GOT-1	-0.081		-0.217	1.000***	0.373*	0.184	0.844***		0.147	0.006
GOT-2	0.291	-0.118	1.000***	-0.077	-0.014	-0.067	-0.097	0.646***	0.086	0.015
GOT-3	0.120	0.226	0.633***	0.079	0.037	-0.013	0.185	0.686***	0.695***	0.827***
MDH-1	0.110	-0.089	-0.268	-0.244	0.376*	-0.050	0.097	0.160	-0.117	-0.232
ME-1	0.289	-0.120		0.728***	0.719***	0.020	0.577***	0.176		0.640***
PGI-1	0.037	0.242	0.000	0.039	0.758***	0.382**	0.485**	0.474**	0.127	0.352*
PGI-2	0.076	-0.148	-0.254	0.598***	-0.110	-0.378**	0.124	-0.288	-0.194	-0.213
F poblacional	0.390**	0.210	0.311	0.425***	0.573***	0.196	0.500***	0.499***	0.287	0.438**

Los valores de F_{ST} fueron significativamente diferentes de cero en todos los loci, lo cual indica que 100 % presentan un exceso de homocigotos. El promedio de F_{ST} tiene un valor de 0.148 y fue significativamente diferente de cero, lo cual indica que las poblaciones locales presentan diferenciación genética moderada a alta (Hartl y Clark 1997). Este valor concuerda con el índice G_{ST} (Cuadro 23), sugiriendo que la mayoría de la diversidad genética de *S. demersa* se encuentra dentro de las poblaciones.

Cuadro 25. Estadísticos F de Wright para *Sagittaria demersa*. Los valores significativamente diferentes de cero se denotan con asteriscos. *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$.

Locus	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
APX-1	0.414***	0.482***	0.116***
CPX-1	0.728***	0.798***	0.258***
CPX-2	0.841***	0.868***	0.171***
CPX-3	0.608***	0.692***	0.215***
GOT-1	0.300***	0.390***	0.129***
GOT-2	0.235***	0.330***	0.124***
GOT-3	0.411***	0.447***	0.060***
MDH-1	-0.014	0.026	0.039***
ME--1	0.388***	0.444***	0.092***
PGI-1	0.239***	0.443***	0.268***
PGI-2	-0.106	-0.062	0.039***
Promedio	0.384***	0.475***	0.148***

Flujo génico

El flujo génico entre poblaciones (Cuadro 26) presenta valores de 1.570 (calculado con el promedio de G_{ST}) y de 1.439 (calculado con el promedio de F_{ST} obtenido de biosys). El valor más bajo fue el de 0.683 en el locus PGI-1 y el valor más alto fue el de 6.160 en los loci MDH-1 y PGI-2. Como el valor de Nm es mayor a uno se considera que existe alto flujo génico entre las diez poblaciones locales estudiadas de *S. demersa*.

Cuadro 26. Flujo génico entre las diez poblaciones locales de *Sagittaria demersa*.

Locus	F _{ST} (G _{ST})	Nm
APX-1	0.116	1.905
CPX-1	0.258	0.719
CPX-2	0.171	1.212
CPX-3	0.215	0.913
GOT-1	0.129	1.688
GOT-2	0.124	1.766
GOT-3	0.06	3.917
MDH-1	0.039	6.160
ME--1	0.092	2.467
PGI-1	0.268	0.683
PGI-2	0.039	6.160
Promedio Calculado	0.137	1.570
Promedio Biosys	0.148	1.439

Identities and genetic distances

Las diez poblaciones locales estudiadas presentan cierto grado de diferenciación genética (Fig. 23). Las identities genéticas de Nei (1978) tienen un intervalo de 0.825 a 0.974, con un promedio de $I = 0.897$, mientras que en las distancias genéticas el intervalo es de 0.027 a 0.193, con un promedio de $D = 0.109$ (Apéndice 13). Las poblaciones diez de Amealco y 12 de Guanajuato aparecen en el dendrograma como las más parecidas genéticamente, sin embargo estas dos poblaciones se encuentran geográficamente muy alejadas. Las poblaciones cinco y uno de Huimilpan son las siguientes que se observan como muy parecidas genéticamente. La población dos de Huimilpan es la menos parecida genéticamente a las demás poblaciones, pero geográficamente se encuentra muy cercana a varios charcos (Fig. 24).

Figura 23 Dendrograma de identidad genética de Nei (1978), construido mediante UPGMA, para las diez poblaciones de *Sagittaria demersa*.

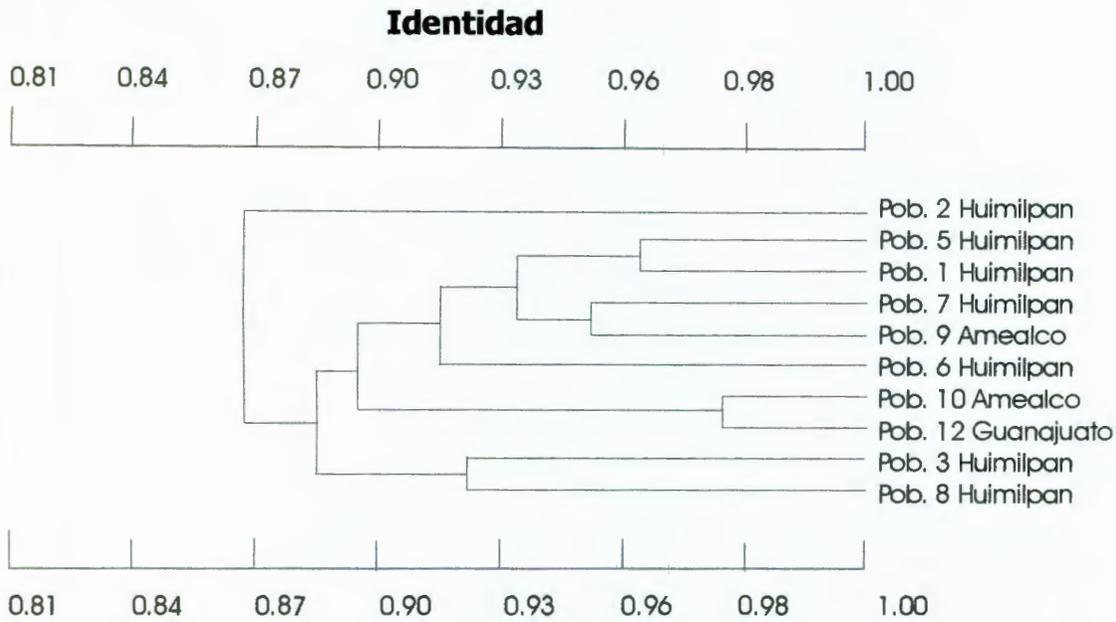
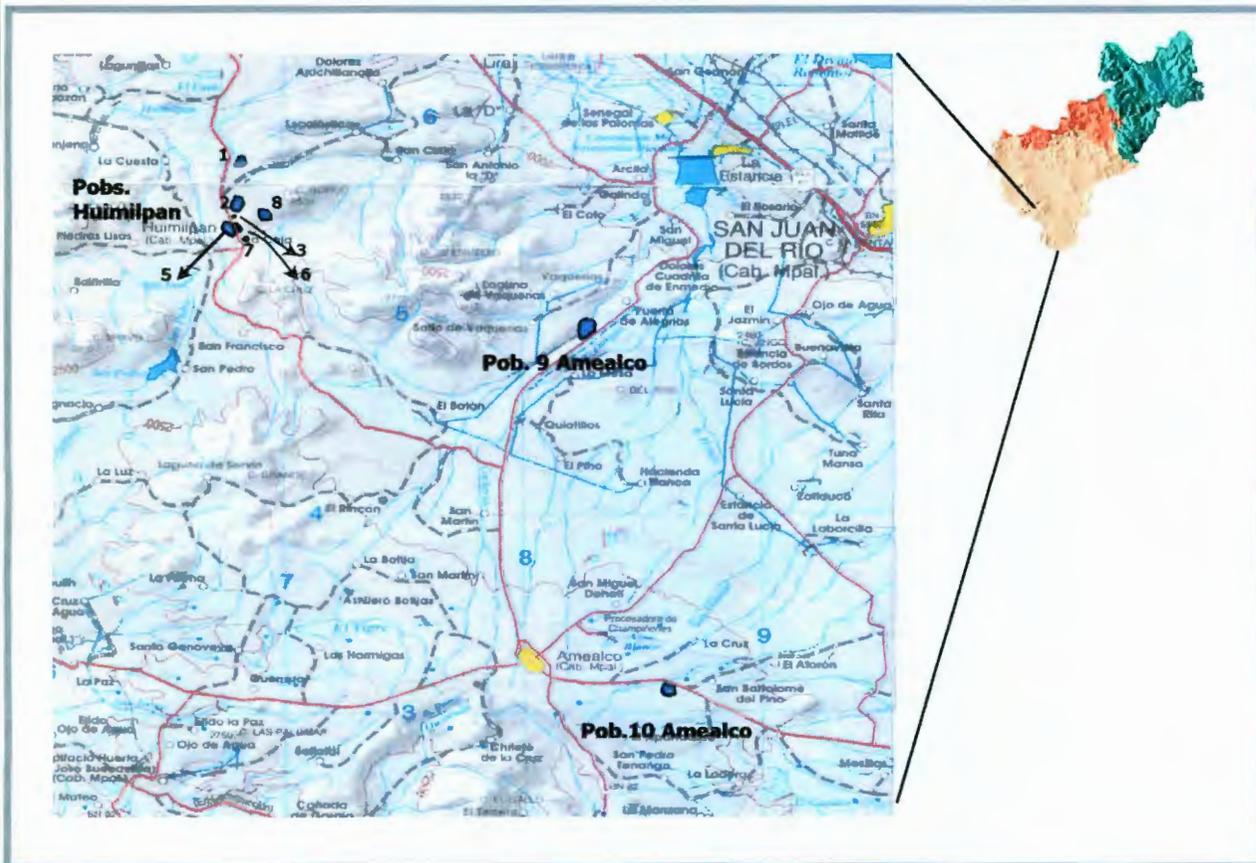


Figura 24. Ubicación de las poblaciones locales analizadas para *Sagittaria demersa* en Amealco y Huimilpan



(Dominguez 2003), como la abundante reproducción clonal de la especie, es posible que aunque *S. demersa* tenga un tipo de apareamiento con “entrecruzamiento”, pueda presentar endogamia debido a la consanguinidad de individuos adyacentes. Aunque se colectaron individuos separados entre sí al menos un metro, puede ser que los clones sean más grandes, generando geitonogamia entre rametos del mismo genet.

Cuadro 27. Índices de diversidad genética dentro de las poblaciones locales: número de alelos por locus (A), porcentaje de loci polimórficos (P) y heterocigosidad esperada (He). Diversidad genética total (H_T), y el coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}) para especies acuáticas con características de historias de vida similares a *Sagittaria demersa*.

Especie	A	P	He	H _T	G _{ST}
<i>Sagittaria demersa</i>	2.73	92.70	0.371	0.429	0.137
<i>Eichhornia paniculata</i>	1.27	23.8	0.090	1.150	0.400
<i>Limnathes alba</i>	2.04	63.00			
<i>Sagittaria isoetiformis</i>	2.33	67.61	0.218	0.425	0.388
<i>Sagittaria teres</i>	2.19	48.21	0.101	0.237	0.261
<i>Swertia perennis</i>	1.53	42.50	0.139		0.128

Cuadro 28. Índices de diversidad genética dentro de las poblaciones locales: número de alelos por locus (A), número efectivo de alelos por locus (Ae), porcentaje de loci polimórficos (P) y heterocigosidad esperada (He). Diversidad genética total (H_T), dentro (H_S) y entre (D_{ST}) subpoblaciones, y el coeficiente de diferenciación genética (G_{ST}) para especies terrestres con las mismas características de historia de vida de *Sagittaria demersa*. Valores tomados de Hamrick y Godt (1990).

Especie o característica	A	Ae	P	He	H _T	H _S	D _{ST}	G _{ST}
<i>Sagittaria demersa</i>	2.73	1.68	92.70	0.371	0.429	0.366	0.068	0.137
Monocotiledóneas	1.66	1.21	40.30	0.144	0.320	0.238	0.082	0.231
Anuales	1.48	1.15	30.20	0.105	0.330	0.200	0.130	0.357
Endémicas	1.39	1.09	26.30	0.063	0.263	0.163	0.100	0.248
Distribución restringida	1.45	1.13	30.00	0.105	0.300	0.215	0.085	0.242
Entrecruzamiento por animales	1.54	1.17	35.90	0.124	0.310	0.243	0.067	0.197
Reproducción sexual y asexual	1.47	1.14	29.40	0.103	0.305	0.236	0.069	0.213

Los valores de F_{ST} (0.148) y G_{ST} (0.137) señalan que existe alta diferenciación genética entre las poblaciones (Ellstrand y Elam 1993) (Apéndice 14). Probablemente los alelos raros surgidos por mutaciones estén siendo fijados en las poblaciones por la selección natural generando diferenciación local. De manera general se asume que, cuando los efectos del flujo génico y la deriva génica son pequeños, la selección natural es un proceso importante en el establecimiento de diferencias locales (Futuyma 1998). Aún si existe considerable flujo génico, la selección natural puede actuar fuertemente. Esto podría estar sucediendo en *S. demersa*, ya que aunque los niveles de flujo génico ($Nm = 1.57$ y 1.44) pueden considerarse altos, no están teniendo efectos en la homogeneización de las poblaciones locales. Además, debido a la alta diversidad genética, las densidades poblacionales altas y a la cantidad de flujo génico ($Nm > 1$) es probable que la deriva génica no esté actuando en las poblaciones (Slatkin 1987).

Probablemente el flujo génico entre las poblaciones sea por medio de aves migratorias. En la literatura se registra que las diásporas de *S. demersa* pueden ser sus cormos, rizomas y semillas y que la dispersión es por agua o animales (Lot *et al.* 1999). Ya que no existen corrientes de agua que unan a las poblaciones de estudio, lo más probable es que el flujo génico sea por la dispersión de las diásporas por medio de aves (Domínguez 2003). Es posible que no exista flujo génico por polen, debido al comportamiento y tamaño de la mosca polinizadora.

Si se comparan los valores de identidades y distancias genéticas entre las poblaciones locales de *S. demersa* ($I = 0.897$ y $D = 0.109$), con los valores promedio presentados por Gottlieb (1977) para poblaciones de la misma especie ($I = 0.95 \pm 0.02$), se observa que estos son bajos, indicando que sus poblaciones locales tienen alta diferenciación genética. Esta diferenciación genética, probablemente es el resultado de la selección natural.

Edwards y Sharitz (2000) llevaron a cabo estudios de diversidad genética en dos especies del mismo género: *Sagittaria isoetiformis* y *S. teres*, y encontraron que la primera tiene niveles muy altos de diversidad y la segunda presenta niveles promedio, a pesar de las

constantes fluctuaciones en los tamaños de las poblaciones. Mencionan que la presencia de un banco de semillas actúa amortiguando estos cambios, al impedir los efectos de cuellos de botella, y que existen varios estudios que muestran la importancia de éstos para mantener la diversidad genética en hábitats temporalmente variables. Los charcos temporales de Amealco y Huimilpan son ecosistemas de este tipo que presentan cambios drásticos en los tamaños de las poblaciones, sin embargo no se observan los efectos de la deriva génica. Por lo que, tomando en cuenta la alta diversidad genética observada en *S. demersa* y las características de los hábitats, es probable que la presencia de un banco de semillas este jugando un papel importante en su estructura genética.

Si se trata de explicar la diversidad y estructura genética de *S. demersa* desde un punto de vista histórico, es probable que los charcos hayan sido colonizados por unos pocos genotipos, quizá proveniente de una misma fuente, pero fuerzas evolutivas como la mutación y la selección natural han llevado a las poblaciones a la diferenciación genética y han originado alta diversidad genética en la especie.

Los resultados obtenidos no se relacionan exactamente con los esperados para plantas acuáticas, principalmente por la alta diversidad genética presente en la especie. Sin embargo, se observa que la diversidad y estructura genética de *S. demersa* si están relacionadas con sus características ecológicas y de historias de vida y que otros factores evolutivos también están determinándolas.

6. Conclusiones

- *Sagittaria demersa* presenta muy altos niveles de variación genética dentro de las poblaciones locales.
- Su alta diversidad genética seguramente se debe a que la especie es localmente abundante, presenta reproducción sexual y asexual al mismo tiempo y presencia de banco de semillas. Además de fuerzas evolutivas como la mutación y la selección natural.
- Tiene diversidad genética total (H_T) alta.
- La mayor parte de su diversidad se encuentra dentro de las poblaciones, aunque también existe diversidad entre poblaciones.
- Los niveles de endogamia son moderados.
- Existen indicios de que la geitonogamia está aumentando los niveles de endogamia.
- La diferenciación genética entre poblaciones es alta.
- El flujo génico no está teniendo efectos homogeneizadores entre las poblaciones locales.
- El flujo génico seguramente se da por medio de semillas dispersadas por aves.
- Las identidades genéticas de Nei muestran alta diferenciación genética de las poblaciones locales.
- La deriva génica no está afectando la diversidad y estructura genética de *S. demersa*.

5. Discusión

Sagittaria demersa es una especie considerada como rara, debido a su distribución geográfica reducida y por ser endémica de México (Lot *et al.* 1999), incluso algunos autores la consideran en vía de extinción (Lot y Novelo 1978), pero al mismo tiempo es localmente abundante (Dominguez 2001 y Magallán⁹ observación personal), por lo que se esperaba que tuviera diversidad genética moderada. Su polinización es entomófila (Lot *et al.* 1999) y en estudios más recientes se encontró que es polinizada por un díptero (no identificado taxonómicamente) que mide 3 a 4 mm (Dominguez 2003). Debido al comportamiento del díptero, el cual visita flores de la misma planta y de plantas vecinas, y a que *S. demersa* tiene reproducción asexual por rizomas, se hipotetizó que tendría diversidad genética e índices de endogamia moderados, además de poco o nada de flujo génico entre las poblaciones. Se esperaba alta diferenciación genética entre poblaciones causada tanto por la deriva génica como por el bajo flujo génico.

Es notable que la variación genética dentro de las poblaciones de *S. demersa* ($A=2.73$, $A_e=1.68$, $P=92.70$, $H_o=0.225$ y $H_e=0.371$) es mucho más alta que la registrada para las especies acuáticas y terrestres con similares características de historias de vida (Cuadros 27 y 28). Incluso es mayor que la observada en *Sagittaria isoetiformis* y *S. Teres* (Cuadro 27), especies que se consideran con altos niveles de variación genética (Edwards y Sharitz 2000). Es probable que su alta diversidad genética esté relacionada principalmente con procesos de mutación, ya que, en todas las poblaciones locales, A_e fue menor A , indicando la presencia de alelos raros, incluso se encontraron hasta seis alelos en un mismo locus (Apéndice 10). Otros factores que pueden contribuir a su alta diversidad son, tanto que presenta al mismo tiempo reproducción sexual (que favorece el entrecruzamiento) y asexual, como que las poblaciones son localmente abundantes.

El índice $F_{IS} = 0.384$ indica que existe endogamia moderada dentro las poblaciones locales, lo cual podría parecer contradictorio dada su polinización entomófila. Sin embargo, considerando tanto que la mosca polinizadora visita flores que se encuentran juntas

⁹ Biol. Emma Fabiola Magallán Hernández. Laboratorio de Botánica. Universidad Autónoma de Querétaro. México.

VIII. CONCLUSIONES GENERALES

- Con la presente tesis se contribuye al conocimiento de la genética de poblaciones en plantas acuáticas y se aportan bases para responder a algunas preguntas en esta área de la biología.
- Los resultados de los niveles de diversidad genética obtenidos, para las tres especies de estudio (*Eriocaulon bilobatum*, *Lilaea scilloides* y *Sagittaria demersa*), no corresponden con lo registrado para especies acuáticas. La mayoría de los estudios indican que las plantas acuáticas presentan baja diversidad dentro de las poblaciones, por el contrario, las especies de estudio presentaron niveles altos o promedio de diversidad genética.
- Los resultados de los niveles de diferenciación genética entre poblaciones, para las tres especies de estudio, no corresponden completamente con lo registrado para especies acuáticas. Se considera que las plantas acuáticas generalmente presentan altos niveles de diferenciación genética entre poblaciones. Sin embargo, en este estudio, se presentaron niveles altos (*S. demersa*), moderados (*L. scilloides*) y bajos (*E. bilobatum*).
- Se cumple la hipótesis general de este estudio. Para las tres especies analizadas, las cuales tienen forma de vida enraizada emergente, sus características ecológicas y de historias de vida se relacionan con su estructura y diversidad genética de manera similar que para plantas terrestres.
- No se cumplieron la mayoría de las hipótesis planteadas de manera específica para cada especie. En el caso de *E. bilobatum* y *L. scilloides*, las hipótesis no se cumplieron debido a que estas se basaron en datos bibliográficos no completamente correctos. Sin embargo, con las observaciones hechas en este estudio acerca de la biología floral, se comprobó que las características ecológicas y de historia de vida

de estas especies, si influyen en su diversidad y estructura genética de forma similar que para plantas terrestres.

- Para *L. scillodes*, existe una variable extra: la polinización por agua, la cual influyó sobre los niveles de diversidad genética, siendo más bajos de lo esperado.
- En el caso de *S. demersa*, la mayoría de las hipótesis planteadas si se cumplieron. Esto se debe a que existe un estudio previo, que de manera específica trata de la biología floral de la especie y las hipótesis de basaron en éste.
- La técnica usada en este estudio (electroforesis de isoenzimas en gel de almidón), resulto ideal, tanto por las características de las especies analizadas, como por los datos que se pretendían obtener para el cumplir con los objetivos.
- Las revisiones de la historia geológica y climática de los charcos temporales, indican que tuvieron su origen hace aproximadamente 12,000-10,000 años AP. Si estos nuevos hábitats recibieron genes (por medio de semillas, plántulas, estructuras de perenación, entre otras), entonces tuvieron una dinámica de colonización propia de las metapoblaciones.
- Debido a que los charcos temporales de estudio se encuentran conectados por dispersión (flujo génico), para las tres especies, se pueden considerar como una metapoblación. Además, seguramente han existido procesos de colonización – extinción en escala temporal.
- Los procesos de extinción – colonización, que se observan anualmente en los charcos temporales, no están influyendo en la diferenciación genética de las poblaciones, probablemente gracias al banco de semillas que no permite que las poblaciones pasen por cuellos de botella.

Perspectivas de estudio

Durante el desarrollo de la presente investigación, surgieron varias cuestiones. Una de las principales es el caso de *L. scilloides*, sus características florales poco comunes la hacen un objeto de estudio muy interesante desde el punto de vista evolutivo. Si es verdad que la especie presenta al mismo tiempo dos tipos de polinización, podría representar un estado de transición entre la anemofilia y la hidrofilia. Por esta razón es recomendable llevar a cabo estudios, tanto de su biología floral y dispersión (de manera mucho más detallada), como de su diversidad genética incluyendo más de poblaciones, ya que esto contribuiría ampliamente a su entendimiento.

Para tratar de tener un conocimiento más amplio de la genética de poblaciones en plantas acuáticas y poder hacer generalizaciones como las que ya existen para plantas terrestres es necesario llevar a cabo: estudios de diversidad genética en especies de plantas acuáticas con forma de vida: enraizadas de hojas flotantes, libres flotadoras y libres sumergidas, estudios de diversidad genética en especies con polinización hidrófila, estudios de biología floral y mecanismos de dispersión en especies de plantas acuáticas. En este último punto, es importante enfatizar el conocimiento de los mecanismos de dispersión de las especies acuáticas es un conocimiento esencial para la interpretación adecuada de los índices de diversidad genética.

IX. LITERATURA CITADA

- Aguirre-Díaz, G. 1995. La toba de Amealco y su correlación con la formación Las Américas a través del graben de Acambay, estados de México, Michoacán y Querétaro, México. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas* 12 (1): 17-21.
- Barrett, S., C. Eckert y B. Husband. 1993. Evolutionary processes in aquatic plant populations. *Aquatic Botany* 44: 105-145.
- Bonilla-Barbosa, J. y A. Novelo. 1995. Manual de identificación de plantas acuáticas del Parque Nacional Lagunas de Zempoala, México. Cuaderno No. 26. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 168 pp.
- Bradbury, J. 1997. Sources of glacial moisture in Mesoamerica. *Quaternary International* 43: 97-110.
- Bradbury, J. 2000. Limnologic history of Lago de Pátzcuaro, Michoacán, México for the past 48,000 years: impacts of climate and man. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 163: 69-95.
- Brown, J. y M. Lomolino. 1998. *Biogeography*. Segunda edición. Sinauer Associates, Inc. Publ. EUA. Pp. 177-202.
- Caballero, A. 1995. Enciclopedia temática del estado de Querétaro. Tomo I. Artículos gráficos de México. 385 pp.
- Calderón, G. 1996. Flora del bajo y de regiones adyacentes: Familia Eriocaulaceae. Instituto de Ecología A.C. México. 11 pp.
- Campey, M., M. Waycott y G. Kendrick. 2000. Re-evaluating species boundaries among members of the *Posidonia ostenfeldii* species complex (Posidoniaceae) morphological and genetic variation. *Aquatic Botany* 66: 41-56.
- Caplen, C. y C. Werth. 2000. Isozyme of the *Isoetes riparia* complex, I. Genetic variation and relatedness of diploid species. *Systematic Botany* 25 (2): 235-259.
- Cheliak, W. y J. Pitel 1984. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. Information Report PI-X-42. Petawa National Forestry Institute, Berkeley, EUA. 64 pp.

- Cid, B. 2003. Cambios temporales en la vegetación de dos charcas estacionales de Huimilpan y Amealco, Querétaro. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro. México. 73 pp.
- Cook, C. 1988. Wind pollination in aquatic angiosperms. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75 (3): 768-777.
- Cook, C. 1996. *Aquatic Plant Book*. SPB Academic Publ. EUA. 220 pp.
- Culley, T., L. Wallace, K. Gengler-Nowak y D. Crawford. 2002. A comparison of two methods of calculating G_{ST} , a genetic measure of population differentiation. *American Journal of Botany* 89 (3): 460-465.
- Domínguez, E. 2001. Alismataceae de la vertiente del pacífico en México. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 146 pp.
- Domínguez, A. 2003. Biología floral y diversidad genética de *Sagittaria demersa* (Alismataceae) en tres charcos de Huimilpan. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro. México. 46 pp.
- Eckert, C. 1999. Clonal plant research: Proliferation, integration, but not much evolution. *American Journal of Botany* 86 (11): 1649-1654.
- Edwards, A. y R. Sharitz. 2000. Population genetics of two rare perennials in isolated wetlands: *Sagittaria isoetiformis* and *S. teres* (Alismataceae). *American Journal of Botany* 87 (8): 1147-1158.
- Eguiarte, L. 1990. Genética de poblaciones de *Astrocaryum mexicanum* Liebm. en Los Tuxtlas, Veracruz. Tesis doctoral. Centro de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 188 pp.
- Elam, D. 1998. Population genetics of vernal pool plants: Theory, data and conservation implications. En: C. Witham, E. Bauder, D. Belk, W. Ferren y R. Ornduff (Eds.). *Ecology, Conservation and Management of Vernal Pool Ecosystems*. California Native Plants Society. Sacramento, CA. Pp.180-189.
- Ellstrand, N. y D. Elam. 1993. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 217-242.

- Ferrusquía, I. 1998. Geología de México: Una sinopsis. En: T. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (Comp.). *Diversidad Biológica de México: Orígenes y distribución*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México. Pp. 3-108.
- Ford, B., D. McQueen, R. Naczi y A. Reznicek. 1998. Allozyme variation and genetic relationships among species in the *Carex willdenowii* complex (Cyperaceae). *American Journal of Botany* 85(4): 546-552.
- Futuyma, D. 1998. *Evolutionary Biology*. Tercera edición. Sinauer Associates, Inc Publ. EUA. 761 pp.
- Galeuchet, D., R. Holderegger, R. Rutishauser y J. Schneller. 2002. Isozyme diversity and reproduction of *Thypha minima* populations on the upper River Rhine. *Aquatic Botany* 74: 19-32.
- Giles, B. y J. Goudet. 1997. A case study of genetic structure in a plant metapopulation. En: I. Hanski y M. Gilpin (Eds.). *Metapopulation Biology, Ecology, Genetics and Evolution*. Academic Press. EUA. Pp. 429-454.
- Glover, D. y S. Barrett. 1987. Genetic variation in continental island populations of *Eichornia paniculata* (Pontederiaceae). *Heredity* 59: 7-17.
- Gottlieb, L. 1977. Electrophoretic evidence and plant systematics. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 64: 161-180.
- Graham, A. 1998. Factores históricos de la diversidad biológica de México. En: T. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (Comp.). *Diversidad Biológica de México: Orígenes y distribución*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México. Pp. 109-127.
- Hamrick, J., Y. Linhart y J. Mitton. 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 10:173-200.
- Hamrick, J. y M. Godt. 1990. Allozyme diversity in plant species. En: A. Brown, M. Clegg, A. Kahler y B. Weir (Eds.). *Plant population genetics, breeding, and genetic resources*. Sinauer Associates, Inc Publ. EUA. Pp. 43-63.
- Hanski, I. 1997. Metapopulation dynamics, from concepts and observations to predictive models. En: I. Hanski y M. Gilpin (Eds.). *Metapopulation Biology, Ecology, Genetics and Evolution*. Academic Press. EUA. Pp. 69-91.

- Hartl, D y A. Clark. 1997. Principles of Population Genetics. Tercera edición. Sinauer Associates, Inc Publ. EUA. 542 pp.
- Haynes, R. 1988. Reproductive biology of selected aquatic plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75 (3): 805-810.
- Haynes, R. y L. Holm-Nielsen. 1993. Alismataceae, Potamogetonaceae y Rupiaceae. En R. Mc Vaugh (Ed.). *Flora Novo Galiciana*. Tomo 13. 7-20 pp.
- Hedrick, P. 2000. Genetics of populations. Segunda edición. Jones y Barlett Publ. EUA. 553 pp.
- Hernández-Verdugo, S., R. Luna-Reyes y K. Oyama. 2001. Genetic structure and differentiation of wild and domesticated populations of *Capsicum annuum* (Solanaceae) from Mexico. *Plant Systematics and Evolution* 226: 129-142.
- Hickman, J. 1993. The Jepson Manual, higher plants of California. University of California Press. EUA. Pp 736-738.
- Hofstra, D., J. Clayton, J. Green y K. Adam. 2000. RAPD profiling and isozyme analysis of New Zealand *Hydrilla verticillata*. *Aquatic Botany* 66: 153-166.
- Hollingsworth, P., R. Gornall y C. Preston. 1995. Genetic variability in British populations of *Potamogeton coloratus* (Potamogetonaceae). *Plant Systematics and Evolution* 197: 71-85.
- Iida, S. y Y. Kadono. 2000. Genetic diversity of *Potamogeton anguillanus* in lake Biwa, Japan. *Aquatic Botany* 67: 59-69.
- INEGI, 1982. Carta edafológica 1:50000. La Estancia F-14-C-76. Querétaro- Guanajuato.
- INEGI, 1986. Síntesis geográfica, nomenclator y anexo cartográfico del estado de Querétaro. México. 144 pp.
- INEGI, 1997. Cuaderno estadístico municipal: Huimilpan, Querétaro. México. 141 pp.
- INEGI, 1998. Carta topográfica 1:250000 F14-10.
- INEGI, 2000. Cuaderno estadístico municipal: Amealco de Bonfil, Querétaro. México. 157 pp.

- INEGI, 2001. Carta topográfica 1:50000. La Estancia F-14-C-76. Querétaro- Guanajuato.
- Keeley, J. y P. Zedler. 1998. Characterization and global distribution of vernal pools. En: C. Witham, E. Bauder, D. Belk, W. Ferren y R. Ornduff (Eds.). Ecology, Conservation and Management of Vernal Pool Ecosystems. California Native Plants Society. Sacramento, CA. Pp.1-14.
- Laushman, R. 1993. Population genetics of hydrophilous angiosperms. *Aquatic Botany* 44:147-158.
- Les, D. 1991. Genetic diversity in the monoecious hydrophile *Ceratophyllum* (Ceratophyllaceae). *American Journal of Botany* 78 (8): 1070-1082.
- Li, C. y D. Horvitz. 1953. Some methods of estimating the inbreeding coefficient. *American Journal of Human Genetics* 5: 107-117.
- Lienert, J., M. Fischer, J. Schneller y M. Diemer. 2002. Isozyme variability of the wetland specialist *Swertia perennis* (Gentianaceae) in relation to habitat size, isolation, and plant fitness. *American Journal of Botany* 89 (5): 801-811.
- Lovelees, M. y J. Hamrick. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15: 65-95.
- Lot, A. y A. Novelo. 1978. Laguna de Tecocomulco, Hidalgo. Guías botánicas de excursiones en México. Sociedad Botánica de México. México. 19 pp.
- Lot, A., A. Novelo, M. Olvera y P. Ramírez-García. 1999. Catálogo de angiospermas acuáticas de México. Hidrófitas estrictas emergentes, sumergidas y flotantes. Cuaderno No. 33. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México. 161 pp.
- Lozano, M. 1996. La vegetación del Cuaternario tardío en el centro de México: registros palinológicos e implicaciones paleoclimáticas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 58: 113-127.
- Martínez, M. y A. García. 2001. Flora y vegetación acuáticas de localidades selectas del estado de Querétaro. *Acta Botánica Mexicana* 54:1-23.
- Moore, P., J. Webb y M. Collins. 1991. Pollen analysis. Segunda edición. Blackwell science. Pp. 62-82.

- Moran, R. 1995. Flora Mesoamericana Vol. 1. Universidad Nacional Autónoma de México – Missouri Botanical Garden – The Natural History Museum (London). México. 470 pp.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press. EUA.
- Novelo, A. y A. Lot. 2001. Lilaeeaceae. En: G. Calderón y J. Rzedowski (Eds.). Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología A.C. México. Pp. 990-993.
- Otero, A., M. De la Cruz y K. Oyama. 1997. El uso de los RAPD's como marcadores moleculares en plantas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60: 85-117.
- Panell, J. y B. Charlesworth. 1999. Neutral genetic diversity in a metapopulation with recurrent local extinction and recolonization. *Evolution* 53 (3): 664-676.
- Pellegrin, D. y D. Hauber. 1999. Isozyme variation among populations of the clonal species, *Phragmites australis* (Cav.) Trin. Ex Steudel. *Aquatic Botany* 63: 241-259.
- Pérez, N. y D. Piñero. 1997. Isoenzimas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 60: 77-84.
- Philbrick, C. y G. Crow. 1992. Isozyme variation and population structure in *Podostemum ceratophyllum* Michx (Podostemaceae): implications for colonization of glaciated North America. *Aquatic Botany* 43: 311-325.
- Philbrick, C. y D. Les. 1996. Evolution of aquatic angiosperms reproductive systems. *Bioscience* 46 (11): 813-826.
- Rabinowitz, D. 1981. Seven forms of rarity. En H. Synge (Ed.). *The Biological Aspects of Rare Plant Conservation*. Nueva York. Pp. 205-217.
- Richards, A. 1986. *Plant Breeding Systems*. Cambridge University Press. Londres. pp. 370-402.
- Sánchez, G. 2001. Identificación de estructuras de perenación de plantas acuáticas vasculares en un charco temporal de Huimilpan, Querétaro. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Querétaro. México. 47 pp.

- Sculthorpe, C. 1967. The biology of aquatic vascular plants. Edward Arnold Publ. Londres. 610 pp.
- Silander, J. 1985. Microevolution in clonal plants. En: J. Jackson, L. Buss y R. Cook. (Eds.). Population Biology and Evolution of Clonal Organisms. Murray Printing Company. EUA. Pp. 107-152.
- Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. Science 236: 787-792.
- Sneath, P. y R. Sokal. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. Freeman. EUA.
- SPP (Secretaría de Programación y Presupuesto), 1981. Carta fisiográfica 1:1000 000.
- Stodola, J, 1967. Encyclopedia of waters plants. TFH Publ. EUA. 368 pp.
- Stuber, C., J. Wendel y M. Goodmam. 1988. Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maize (*Zea mays*) Technical Bulletin 286. North Caroline State University. EUA.
- Swofford, D. y R. Selander. 1981. Biosys-1: A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. User's manual. Illinois Natural History Survey. EUA. 43 pp.
- Thrall, P., J. Burdon y B. Murray. 2000. The metapopulation paradigm: a fragmented view of conservation biology. En: A. Young y G. Clarke (Eds.). Conservation Biology. Genetics, Demography and Viability of fragmented population. Cambridge University Press. Londres. Pp. 75-95.
- Tricart, J. 1985. Pro-Lagos. Los lagos del Eje Neovolcánico de México. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 66 pp.
- Triest, L. 1989. Electrophoretic polymorphism and divergence in *Najas marina* L. (Najadaceae): Molecular markers for individuals, hybrids, cytodemes, lower taxa, ecodemes and conservation of genetic diversity. Aquatic Botany 33: 301-380.
- Urrutia-Fucugauchi, J., S. Lozano-García, B. Ortega-Guerrero y M. Caballero-Miranda. 1995. Palaeomagnetic and palaeoenvironmental studies in the southern basin of Mexico – II Late Pleistocene – Holocene Chalco lacustrine record. Geofísica internacional 34 (1): 33-53.

- Wendel, J. y C. Parks. 1982. Genetic control of isozyme variation in *Camellia japonica* L. *Heredity* 73: 197-204.
- Wendel, J. y N. Weeden 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. En Soltis D. y P. Soltis (Eds.). *Isozymes in Plant Biology*. Dioscorides press. Portland, Oregon. EUA. Pp. 5-45.
- Werth, C. 1985. Implementing an isozyme laboratory at a field station. *Virginia Journal of Science* 36 (1): 53-76.
- Workman, P. y D. Niswander. 1970. Population studies on South-western Indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. *American Journal of Human Genetics* 41: 225-233.
- Wright, S. 1921. Systems of mating. *Genetics* 6: 111-178.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 322-354.
- Yeh, F. y D. O'Malley 1980. Enzyme variations in natural populations of Douglas fir, *Pseudotsuga menziessi* (Mub.) Franco, from British Columbia. 1. Genetic variation patterns in coastal populations. *Silvae Genetica* 29:83-92.
- Zamudio, S., J. Rzedowski, E. Carranza y G. Calderón. 1992. La vegetación del estado de Querétaro. Instituto de Ecología. Centro Regional del Bajío. CONCYTEQ. México. 92 pp.

X. APÉNDICES

APÉNDICE I. Fórmulas para la preparación de los sistemas de corrimiento, buffers de extracción y tinción de enzimas

Sistemas de corrimiento

1. Sistema C

Buffer del electrodo (pH 8.3)

- 0.19 M Ácido bórico 11.875 g
- 0.04 M Hidróxido de litio 1.60 g
- Agua destilada 1000 ml

Se ajustó el pH a 8.3 con LiOH o con ácido bórico

Buffer Trizma Base (pH 8.3)

- 0.05 M Trizma Base 6.20 g
- 0.007 M Ácido cítrico monohidratado 1.50 g
- Agua destilada 1000 ml

Se ajustó a pH 8.3 con Trizma Base o con ácido cítrico

Buffer del gel

- 9 partes del buffer Trizma Base (pH 8.3)
- 1 parte del buffer del electrodo (pH 8.3)

2. Sistema D

Buffer del electrodo (pH 6.5)

- 0.070 M L. Histidina 10.864 g
- 0.007 M Ácido cítrico monohidratado 1.50 g
- Agua destilada 1000 ml

Se ajustó el pH a 6.5 con ácido cítrico

Buffer del gel

- 4 partes de agua destilada
- 1 parte del buffer del electrodo (pH 6.5)

3. Sistema Histidina

Buffer del electrodo (pH 7.0)

- Ácido cítrico monohidratado 9.04 g
- Tris 16.35 g
- Agua destilada 1000 ml

Buffer del gel (pH 7.0)

- DL- Histidina 1.05 g
- Agua destilada 1000 ml

Se ajustó el pH a 7.0 con NaOH concentrado

4. Sistema Hidróxido de Litio

Buffer del electrodo (pH 8.1) = Solución A

Solución A

- Hidróxido de litio 1.2 g
- Ácido bórico 11.89 g
- Agua destilada 1000 ml

Solución B (pH 8.4)

- Tris 6.2 g
- Ácido cítrico monohidratado 1.6 g

Buffer del gel

- 1 parte de solución A
- 9 partes de solución B

5. Sistema Morfolina

Buffer del electrodo (pH 6.1)

- 0.040 M Ácido cítrico monohidratado 8.41 g
- 0.068 M N-(3-aminopropil)-morfolina 10 ml (aprox.)
- Agua destilada 1000 ml

Se disolvió el ácido cítrico en agua y se agregó poco a poco la morfolina hasta llegar a pH 6.1

Buffer del gel (pH 6.1)

- 19 partes de agua destilada
- 1 parte del buffer del electrodo

Buffers de extracción

1. Buffer *Camellia*

• 0.16 M Fosfato de potasio monobásico (pH 7.3)*	12.5 ml
• Sacarosa	3.423 g
• EDTA disódico	0.017 g
• DTT	0.023 g
• Ácido ascórbico (L) sal de sodio	0.044 g
• Metabisulfito de Sodio	0.029 g
• Ácido dietildithiocarbámico sal de sodio	0.051 g
• PVP-40 (5%)	2.500 g
• 2-Mercaptoetanol	25 µl

Se aforó a 50 ml con agua destilada

2. Buffer YO

• Solución Tris- ácido cítrico pH 7.0**	10 ml
• NADP (TPN)	0.050 g
• NAD (DPN)	0.050 g
• Ácido ascórbico	0.018 g
• EDTA disódico	0.034 g
• Suero de albúmina de bovino	0.100 g
• 2-Mercaptoetanol	0.33 ml

Se aforó a 100 ml con agua destilada

3. Buffer YO:VEG

Se preparó mezclando tres partes del buffer YO y una parte del buffer VEG II***

4. Microbuffer pH 7.5

• 0.2 M Tris HCl****	100 ml
• Tetraborato de sodio (=borax)	0.28 g
• Metabisulfito de sodio	0.08 g
• Ácido ascórbico (L) sal de sodio	1.00 g
• Ácido dietildithiocarbámico sal de sodio	0.07 g
• PVP-40 (6%)	6.00 g
• 2-Mercaptoetanol (0.5%)	0.50 ml

Se ajustó el pH a 7.5 con HCl

* Solución 0.16 M Fosfato de potasio monobásico (pH 7.3)

- Fosfato de potasio monobásico 1.08 g
- Agua destilada 35 ml

Se ajustó el pH con NaOH o HCl (no concentrados) y se aforó a 50 ml con agua destilada

** Solución Tris- ácido cítrico pH 7.0

- Trizma Base 1.57 g
- Ácido cítrico 0.83 g

Se ajustó el pH a 7.0 y se aforó a 100 ml con agua destilada

*** Buffer VEG II

- Ácido bórico 0.31 g
- Tergitol 2 ml
- PEG 8000 2.0 g
- PVP 40 7.0 g
- PVP 360 1.0 g
- Ácido ascórbico 0.88 g
- NAD 0.20 g
- Suero de albúmina de bovino 0.10 g
- Piridoxal 5-fosfato 0.005 g
- Sacarosa 0.27 g
- Cisteína - HCl 0.19 g
- 2-Mecaptoetanol 0.66 ml

Se ajustó el pH 7.1 con NaOH y se aforó a 100 ml con agua destilada

**** Solución 0.2 Tris-HCl

- Tris 24.22 g
- Agua destiladas 1000 ml

Fórmulas para la tinción de las enzimas

1. ADH (Alcohol deshidrogenasa)

DPN (= NAD)	10 mg
0.1 M Tris-HCl pH 8.0 ó pH 7.5	50 ml
Etanol	2 ml
MTT 1%	1.5 ml
PMS 1%	0.2 ml

2. ALD (Aldolasa)

DPN (= NAD)	20 mg
Ácido arsénico, sal sódica	75 mg
Fructosa 1.6 difosfato sal trisódica	200 mg
0.05 M Tris-HCl pH 8.0	50 ml
Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	100 u (28 µl)
MTT 1%	1 ml
PMS 1%	1 ml

3. APX (Peroxidasa anódica)

3-amino-9-ethylcarbazole	150 mg
Dimetilformamida	7 ml
Agua destilada	60 ml
Peróxido de Hidrógeno al 3%	1 ml
Cloruro de calcio al 1%	2 ml
1 M Acetato de Sodio pH 5.0	5 ml

4. CPX (Peroxidasa catódica)

3-amino-9-ethylcarbazole	75 mg
Dimetilformamida	3.5 ml
Agua destilada	30 ml
Peróxido de Hidrógeno al 3%	0.5 ml
Cloruro de calcio al 1%	1 ml
1 M Acetato de Sodio pH 5.0	2.5 ml

5. DIA (Diaforasa)

2,6 diclorofenol indofenol	4 mg
β-NADH	25 mg
0.2 M Tris-HCl pH 8.0	50 ml
MTT 1%	1 ml

6. EST (Esterasa)

Fast blue RR salt	100 mg
α -naphthyl acetate	50 mg
β -naphthyl acetate	50 mg
Acetona	2 ml
Disolverlo muy bien y añadir:	
Buffer de fosfatos 1M pH 6.0	5 ml
Agua destilada	45 ml

7. GDH (Glutamato deshidrogenasa)

Ácido L-Glutámico sal monosódica	1 g
DPN (=NAD)	10 mg
1 M Tris-HCl pH 8.0	10 ml
Agua destilada	40 ml
NBT 1%	1.5 ml
PMS 1%	0.5 ml
Cloruro de calcio al 1%	2 ml

8. G-6PD (Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa)

Glucosa 6 fosfato, sal disódica	100 mg
1 M Tris-HCl pH 8.0	10 ml
Agua destilada	40 ml
1 M MgCl ₂	1 ml
TPN (=NADP) 1%	2 ml
MTT 1%	2 ml
PMS 1%	1 ml

9. GOT (= AAT) (Glutamato oxalacetato transaminasa)

Pyridoxal 5-phosphate	4 mg
Fast blue BB salt	100 mg
Solución GOT (AAT)	50 ml

10. HK (Hexokinasa)

β -D- Glucosa	90 mg
ATP	20 mg
EDTA, sal tetrasódica	40 mg
DPN (= NAD)	10 mg
0.2 M Tris-HCl pH 8.0	25 ml
1 M MgCl ₂	2.5 ml
Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa	10 μ l
MTT 1%	1 ml
PMS 1%	0.5 ml

11. IDH (Isocitrato deshidrogenasa)

Ácido isocítrico, sal trisódica	300 mg
0.2 M Tris-HCl pH 8.0	50 ml
1 M MgCl ₂	1 ml
TPN (=NADP) 1%	1 ml
MTT 1%	0.5 ml
PMS 1%	0.2 ml

12. LAP (Leucina aminopeptidasa)

Buffer 0.2 M Tris-maleato pH 5.2	50 ml
L-leucina-β-naftilamida-HCl 2.5%	1 ml
Fast Black K salt	100 mg

13. LDH (Lactato deshidrogenasa)

DPN (=NAD)	10 mg
0.05 M Tris-HCl pH 8.0	50 ml
Ácido láctico, sal de litio	2 ml
MTT 1%	1 ml
PMS 1%	0.5 ml

14. MDH (Malato deshidrogenasa)

NAD (DPN)	10 mg
0.05 M Tris-HCl pH 8.0	50 ml
1 M DL Malato pH 7.0	5 ml
NBT 1%	1 ml
PMS 1%	0.5 ml

15. ME (Enzima málica)

0.2 M Tris-HCl pH 8.0	50 ml
1 M DL-malato pH 7.8	6.25 ml
1 M MgCl ₂	1.25 ml
TPN (=NADP) 1%	1.25 ml
MTT 1%	1.25 ml
PMS 1%	0.3 ml

16. MNR (Menadione reductasa)

β-NADH (forma reducida)	25 mg
Menadione	25 mg
0.05 M Tris-HCl pH 7.0	50 ml
NBT 1%	1 ml

17. NADHDH (Nicotinamida adenina dinucleótido deshidrogenasa)

NADH	40 mg
0.2 M Tris-HCl pH 8.0	50 ml
MTT 1%	2 ml

18. PGD (Fosfogluconato deshidrogenasa)

Ácido 6-fosfogluconico, sal trisódica	40 mg
0.2 M Tris-HCl pH 8.0	50 ml
1 M MgCl ₂	2 ml
TPN (=NADP) 1%	2 ml
MTT 1%	2 ml
PMS 1%	1 ml

19. PGI (Fosfoglucosa isomerasa)

D-fructosa-6-fosfato sal disódica	25 mg
0.05 M Tris-HCl pH 8.0	50 ml
Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa	7 µl
1M MgCl ₂	1 ml
TPN (=NADP) 1%	1 ml
MTT 1%	1 ml
PMS 1%	0.5 ml

20. PGM (Fosfoglucomutasa)

Glucosa 1 fosfato (G-1259)	50 mg
Glucosa 1 fosfato (G-7000)	50 mg
1 M Tris-HCl pH 8.0	5 ml
Agua destilada	40 ml
1 M MgCl ₂	1 ml
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	7 µl
TPN (=NADP) 1%	1 ml
NBT 1%	1 ml
PMS 1%	0.3 ml

21. SDH (Shikimato deshidrogenasa)

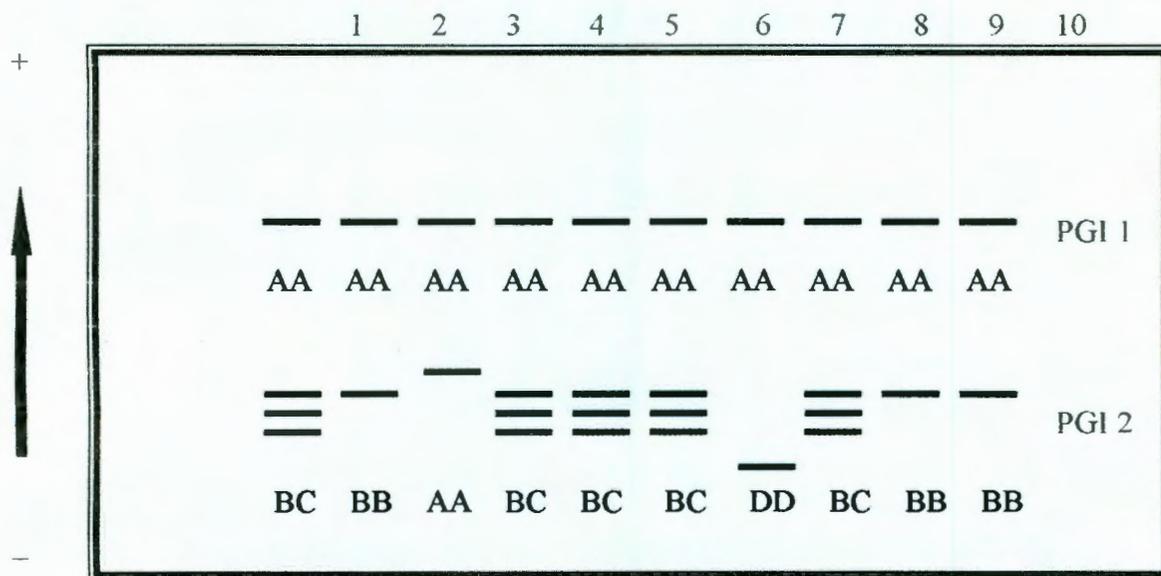
Ácido shikímico	70 mg
0.2 M Tris-HCl pH 8.0	50 ml
MgCl ₂	1 ml
TPN (=NADP) 1%	1 ml
NBT 1%	1 ml
PMS 1%	0.5 ml

22. SOD (Superoxido dismutasa)

Riboflavina	4 mg
EDTA disódico	2 mg
0.05 M Tris-HCl pH	50 ml
NBT 1%	2 ml

APÉNDICE 2. Ejemplo de la nomenclatura usada en la interpretación de los geles

Enzima PGI. Dímero.



APÉNDICE 3. Frecuencias alélicas de los 14 loci definidos en las cuatro poblaciones de *Eriocaulon bilobatum*. N = Tamaño de la muestra

Locus	Pob. 6	Pob. 9	Pob. 10	Pob. 12
CPX-1				
N	28	40	35	37
A	0.000	0.125	0.057	0.149
B	1.000	0.863	0.929	0.824
C	0.000	0.013	0.014	0.027
CPX-2				
N	28	40	35	37
A	0.071	0.100	0.343	0.297
B	0.893	0.875	0.657	0.703
C	0.018	0.025	0.000	0.000
D	0.018	0.000	0.000	0.000
GDH-1				
N	32	40	40	38
A	0.000	0.000	0.025	0.026
B	1.000	0.962	0.975	0.934
C	0.000	0.038	0.000	0.039
IDH-1				
N	39	40	40	38
A	0.000	0.000	0.000	0.039
B	1.000	0.925	0.938	0.961
C	0.000	0.075	0.063	0.000
IDH-2				
N	40	38	40	39
A	0.000	0.000	0.013	0.051
B	1.000	0.763	0.938	0.936
C	0.000	0.237	0.050	0.013
IDH-3				
N	40	40	40	40
A	1.000	1.000	1.000	1.000
ME-1				
N	40	40	40	40
A	0.000	0.075	0.000	0.050
B	1.000	0.925	0.975	0.875
C	0.000	0.000	0.025	0.025
D	0.000	0.000	0.000	0.050

APÉNDICE 3 (continuación). Frecuencias alélicas de los 14 loci definidos en las cuatro poblaciones de *Eriocaulon bilobatum*. N = Tamaño de la muestra

Locus	Pob. 6	Pob. 9	Pob. 10	Pob. 12
MNR-1				
N	40	40	40	27
A	0.050	0.038	0.087	0.037
B	0.913	0.938	0.913	0.815
C	0.038	0.013	0.000	0.000
D	0.000	0.013	0.000	0.000
E	0.000	0.000	0.000	0.056
F	0.000	0.000	0.000	0.093
PGD-1				
N	30	40	40	38
A	0.300	0.100	0.200	0.184
B	0.700	0.900	0.800	0.816
PGD-2				
N	30	40	40	38
A	1.000	1.000	0.975	0.934
B	0.000	0.000	0.000	0.053
C	0.000	0.000	0.000	0.013
D	0.000	0.000	0.025	0.000
PGI-1				
N	38	40	39	39
A	0.803	0.563	0.859	0.603
B	0.197	0.262	0.128	0.295
C	0.000	0.175	0.013	0.051
D	0.000	0.000	0.000	0.051
PGI-2				
N	38	40	40	39
A	0.105	0.038	0.188	0.077
B	0.158	0.162	0.162	0.154
C	0.658	0.800	0.650	0.718
D	0.000	0.000	0.000	0.038
E	0.000	0.000	0.000	0.013
F	0.079	0.000	0.000	0.000
PGM-1				
N	30	36	40	39
A	0.967	0.597	0.813	0.897
B	0.033	0.403	0.188	0.103
SDH-1				
N	30	40	40	36
A	0.050	0.013	0.125	0.000
B	0.950	0.887	0.875	0.944
C	0.000	0.100	0.000	0.056

APÉNDICE 4. Número de alelos por locus (A) y número efectivo de alelos por locus (Ae) en los 14 loci definidos para *Eriocaulon bilobatum*

Locus	Pob. 6	Pob. 9	Pob. 10	Pob. 12	Pob. 6	Pob. 9	Pob. 10	Pob. 12
	A				Ae			
CPX-1	1	3	3	3	1.00	1.31	1.15	1.42
CPX-2	4	3	2	2	1.25	1.29	1.82	1.72
GDH-1	1	2	2	3	1.00	1.08	1.05	1.14
IDH-1	1	2	2	2	1.00	1.16	1.13	1.08
IDH-2	1	2	3	3	1.00	1.57	1.13	1.14
IDH-3	1	1	1	1	1.00	1.00	1.00	1.00
ME-1	1	2	2	4	1.00	1.16	1.05	1.30
MNR-1	3	4	2	4	1.19	1.13	1.19	1.48
PGD-1	2	2	2	2	1.72	1.22	1.47	1.43
PGD-2	1	1	2	3	1.00	1.00	1.05	1.14
PGI-1	2	3	3	4	1.46	2.40	1.33	2.19
PGI-2	4	3	3	5	2.10	1.50	2.07	1.83
PGM-1	2	2	2	2	1.07	1.93	1.44	1.23
SDH-1	2	3	2	2	1.10	1.25	1.28	1.12
Promedio	1.86	2.36	2.21	2.86	1.21	1.36	1.30	1.37
Error estándar	0.3	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.1	0.2

APÉNDICE 5. Matriz de coeficientes de identidades y distancias genéticas de Nei (1978) para *Eriocaulon bilobatum*. Bajo la diagonal: Identidades genéticas no sesgadas. Sobre la diagonal: Distancias genéticas no sesgadas.

Población	6	9	10	12
Pob. 6 Huimilpan	*****	0.025	0.008	0.009
Pob. 9 Amealco	0.976	*****	0.020	0.016
Pob. 10 Amealco	0.992	0.980	*****	0.007
Pob. 12 Guanajuato	0.991	0.984	0.993	*****

APÉNDICE 6. Frecuencias alélicas de los 14 loci definidos en las 12 poblaciones de *Lilaea scilloides*. N = Tamaño de la población

Locus	Pob. 1	Pob. 2	Pob. 3	Pob. 4	Pob. 5	Pob. 6	Pob. 7	Pob. 8	Pob. 9	Pob. 10	Pob. 11	Pob. 12
APX-1												
N	28	40	40	34	33	40	36	30	40	40	39	22
A	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.013	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
B	0.911	1.000	1.000	1.000	0.909	0.988	0.917	1.000	0.988	0.962	0.936	0.818
C	0.089	0.000	0.000	0.000	0.091	0.000	0.083	0.000	0.013	0.038	0.064	0.182
GOT-1												
N	40	39	40	40	36	38	39	40	40	40	40	40
A	0.013	0.077	0.000	0.200	0.000	0.171	0.000	0.087	0.000	0.063	0.237	0.025
B	0.988	0.897	1.000	0.775	0.889	0.724	0.974	0.913	1.000	0.938	0.738	0.975
C	0.000	0.026	0.000	0.000	0.000	0.000	0.026	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
D	0.000	0.000	0.000	0.025	0.111	0.105	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025	0.000
GOT-2												
N	40	39	40	40	36	38	40	40	40	40	40	40
A	1.000	1.000	1.000	1.000	0.833	0.921	1.000	1.000	0.975	1.000	1.000	1.000
B	0.000	0.000	0.000	0.000	0.028	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
C	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.026	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
D	0.000	0.000	0.000	0.000	0.139	0.053	0.000	0.000	0.025	0.000	0.000	0.000
GOT-3												
N	40	39	40	40	36	38	40	40	40	40	40	40
A	0.150	0.308	0.325	0.112	0.250	0.224	0.275	0.225	0.013	0.112	0.400	0.463
B	0.775	0.641	0.675	0.887	0.694	0.645	0.725	0.700	0.962	0.800	0.575	0.463
C	0.000	0.051	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.075	0.025	0.013	0.025	0.050
D	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.079	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
E	0.075	0.000	0.000	0.000	0.056	0.053	0.000	0.000	0.000	0.075	0.000	0.025

APÉNDICE 6 (Continuación). Frecuencias alélicas de los 14 loci definidos en las 12 poblaciones de *Lilaea scilloides*. N = Tamaño de la población

Locus	Pob. 1	Pob. 2	Pob. 3	Pob. 4	Pob. 5	Pob. 6	Pob. 7	Pob. 8	Pob. 9	Pob. 10	Pob. 11	Pob. 12
PGD-1												
N	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
A	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
PGD-2												
N	40	40	40	34	40	40	40	40	40	40	40	40
A	0.000	0.000	0.000	0.088	0.000	0.013	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000	0.075
B	1.000	1.000	1.000	0.882	1.000	0.988	0.950	1.000	1.000	1.000	1.000	0.925
C	0.000	0.000	0.000	0.029	0.000	0.000	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
PGL-1												
N	40	40	29	39	25	39	40	40	40	40	40	40
A	0.013	0.162	0.000	0.192	0.000	0.295	0.000	0.038	0.188	0.225	0.150	0.013
B	0.988	0.837	1.000	0.782	1.000	0.705	1.000	0.962	0.813	0.775	0.850	0.925
C	0.000	0.000	0.000	0.026	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.063
PGL-2												
N	40	40	37	39	37	34	40	40	40	40	40	40
A	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.075
B	0.988	0.762	1.000	0.962	0.986	0.897	1.000	0.975	0.938	0.950	0.950	0.788
C	0.013	0.237	0.000	0.038	0.014	0.103	0.000	0.025	0.063	0.050	0.050	0.138
PGM-1												
N	40	40	39	40	40	38	39	40	40	40	40	40
A	0.000	0.000	0.000	0.000	0.013	0.000	0.000	0.013	0.025	0.000	0.112	0.000
B	0.950	1.000	0.987	0.988	0.988	0.908	0.936	0.950	0.975	1.000	0.887	0.988
C	0.050	0.000	0.013	0.013	0.000	0.066	0.064	0.013	0.000	0.000	0.000	0.013
D	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.026	0.000	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000

APÉNDICE 7. Número de alelos por locus (A) en los 14 loci definidos para *Lilaea scilloides*

Poblaciones	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Locus												
APX-1	2	1	1	1	2	2	2	1	2	2	2	2
GOT-1	2	3	1	3	2	3	2	2	1	2	3	2
GOT-2	1	1	1	1	3	3	1	1	2	1	1	1
GOT-3	3	3	2	2	3	4	2	3	3	4	3	4
GDH-1	2	3	2	2	1	2	2	2	3	1	3	3
G6PD-1	1	2	1	1	2	1	1	1	2	1	1	2
G6PD-2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1
ME-1	1	2	1	2	2	2	1	1	2	3	2	1
ME-2	1	2	2	3	3	1	3	3	2	1	1	1
PGD-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
PGD-2	1	1	1	3	1	2	3	1	1	1	1	2
PGI-1	2	2	1	3	1	2	1	2	2	2	2	3
PGI-2	2	2	1	2	2	2	1	2	2	2	2	3
PGM-1	2	1	2	2	2	3	2	4	2	1	2	2
Promedio	1.57	1.79	1.29	1.93	1.86	2.07	1.71	1.79	1.86	1.64	1.79	2.00
Error estándar	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.2	0.3	0.2	0.3	0.2	0.3

APÉNDICE 8. Número efectivo de alelos por locus (Ae) en los 14 loci definidos para *Lilaea scilloides*

Poblaciones	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Locus												
APX-1	1.19	1.00	1.00	1.00	1.20	1.02	1.18	1.00	1.02	1.08	1.14	1.42
GOT-1	1.02	1.23	1.00	1.56	1.25	1.77	1.05	1.19	1.00	1.13	1.66	1.05
GOT-2	1.00	1.00	1.00	1.00	1.40	1.17	1.00	1.00	1.05	1.00	1.00	1.00
GOT-3	1.59	1.97	1.78	1.25	1.83	2.10	1.66	1.83	1.08	1.52	2.04	2.32
GDH-1	1.10	1.23	1.05	1.08	1.00	1.14	1.05	1.09	1.18	1.00	1.36	1.21
G6PD-1	1.00	1.02	1.00	1.00	1.02	1.00	1.00	1.00	1.02	1.00	1.00	1.41
G6PD-2	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.02	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
ME-1	1.00	1.17	1.00	1.11	1.06	1.08	1.00	1.00	1.08	1.12	1.50	1.00
ME-2	1.00	1.03	1.46	1.62	1.19	1.00	1.65	1.28	1.03	1.00	1.00	1.00
PGD-1	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
PGD-2	1.00	1.00	1.00	1.27	1.00	1.02	1.11	1.00	1.00	1.00	1.00	1.16
PGI-1	1.02	1.38	1.00	1.54	1.00	1.71	1.00	1.08	1.44	1.54	1.34	1.16
PGI-2	1.02	1.57	1.00	1.08	1.03	1.23	1.00	1.05	1.13	1.10	1.10	1.55
PGM-1	1.10	1.00	1.03	1.02	1.02	1.21	1.14	1.11	1.05	1.00	1.25	1.02
Promedio	1.08	1.19	1.09	1.18	1.14	1.25	1.13	1.12	1.08	1.11	1.24	1.24
Error estándar	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2

APÉNDICE 9. Matriz de coeficientes de identidades y distancias genéticas de Nei (1978) para *Lilaea scilloides*. Bajo la diagonal: Identidades genéticas no sesgadas. Sobre la diagonal: Distancias genéticas no sesgadas.

Población	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Pob. 1 Huimilpan	****	0.008	0.005	0.010	0.003	0.011	0.005	0.002	0.005	0.004	0.013	0.012
Pob. 2 Huimilpan	0.992	****	0.009	0.012	0.009	0.005	0.013	0.005	0.010	0.005	0.008	0.009
Pob. 3 Huimilpan	0.995	0.991	****	0.010	0.004	0.014	0.000	0.001	0.012	0.009	0.014	0.012
Pob. 4 Huimilpan	0.990	0.988	0.990	****	0.012	0.008	0.008	0.006	0.007	0.005	0.016	0.028
Pob. 5 Huimilpan	0.997	0.991	0.996	0.988	****	0.011	0.005	0.003	0.010	0.007	0.013	0.012
Pob. 6 Huimilpan	0.989	0.995	0.986	0.992	0.989	****	0.017	0.008	0.010	0.004	0.007	0.019
Pob. 7 Huimilpan	0.995	0.987	1.000	0.992	0.995	0.983	****	0.002	0.013	0.011	0.017	0.015
Pob. 8 Huimilpan	0.998	0.995	0.999	0.994	0.997	0.992	0.998	****	0.007	0.005	0.009	0.012
Pob. 9 Amealco	0.995	0.990	0.988	0.993	0.990	0.990	0.987	0.993	****	0.002	0.018	0.025
Pob. 10 Amealco	0.996	0.995	0.991	0.995	0.993	0.996	0.989	0.995	0.998	****	0.012	0.017
Pob. 11 Amealco	0.988	0.992	0.987	0.984	0.987	0.993	0.983	0.991	0.982	0.989	****	0.015
Pob. 12 Guanajuato	0.988	0.991	0.988	0.973	0.988	0.981	0.985	0.988	0.976	0.983	0.985	****

APÉNDICE 10. Frecuencias alélicas de los 11 loci definidos en las diez poblaciones de *Sagittaria demersa*. N = Tamaño de la muestra.

Locus	Pob. 1	Pob. 2	Pob. 3	Pob. 5	Pob. 6	Pob. 7	Pob. 8	Pob. 9	Pob. 10	Pob. 12
APX-1										
N	39	36	19	34	32	39	40	39	40	37
A	0.000	0.000	0.053	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.027
B	0.128	0.000	0.158	0.059	0.000	0.000	0.025	0.103	0.000	0.000
C	0.603	0.819	0.737	0.588	0.453	0.808	0.913	0.667	1.000	0.784
D	0.218	0.181	0.053	0.353	0.500	0.192	0.063	0.231	0.000	0.135
E	0.000	0.000	0.000	0.000	0.047	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
F	0.051	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.054
CPX-1										
N	40	37	20	38	40	40	40	37	40	40
A	0.175	0.000	0.000	0.026	0.575	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000
B	0.725	0.176	0.550	0.816	0.287	0.887	0.712	0.797	0.837	0.675
C	0.100	0.095	0.000	0.105	0.013	0.063	0.188	0.041	0.162	0.000
D	0.000	0.730	0.450	0.053	0.125	0.000	0.100	0.162	0.000	0.325
CPX-2										
N	40	37	20	38	40	40	40	37	40	40
A	0.063	0.027	0.000	0.158	0.150	0.000	0.000	0.000	0.063	0.100
B	0.387	0.189	0.150	0.579	0.625	0.625	0.438	0.514	0.613	0.800
C	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	0.000	0.038	0.000	0.000	0.000
D	0.550	0.784	0.850	0.263	0.175	0.375	0.525	0.486	0.325	0.100
CPX-3										
N	40	37	20	37	40	40	40	37	40	40
A	0.000	0.014	0.000	0.041	0.000	0.125	0.000	0.027	0.000	0.013
B	0.538	0.986	0.375	0.473	0.650	0.800	0.138	0.703	0.675	0.688
C	0.138	0.000	0.575	0.000	0.000	0.000	0.587	0.000	0.175	0.075
D	0.325	0.000	0.050	0.486	0.350	0.075	0.275	0.270	0.150	0.225
GOT-1										
N	40	40	20	35	37	40	34	40	40	38
A	0.925	1.000	0.525	0.686	0.730	0.900	0.765	1.000	0.762	0.829
B	0.075	0.000	0.125	0.000	0.135	0.075	0.044	0.000	0.188	0.145
C	0.000	0.000	0.300	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
D	0.000	0.000	0.050	0.314	0.135	0.025	0.191	0.000	0.050	0.026

APÉNDICE 10. (Cont.) Frecuencias alélicas de los 11 loci definidos en las diez poblaciones de *Sagittaria demersa*. N = Tamaño de la muestra.

Locus	Pob. 1	Pob. 2	Pob. 3	Pob. 5	Pob. 6	Pob. 7	Pob. 8	Pob. 9	Pob. 10	Pob. 12
GOT-2										
N	39	38	20	35	37	40	34	40	40	38
A	0.051	0.105	0.050	0.071	0.014	0.063	0.088	0.100	0.125	0.224
B	0.923	0.895	0.950	0.929	0.986	0.938	0.912	0.550	0.875	0.776
C	0.026	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.350	0.000	0.000
GOT-3										
N	40	37	20	35	37	40	34	40	40	38
A	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.013	0.000
B	0.650	0.554	0.600	0.771	0.770	0.988	0.809	0.613	0.675	0.697
C	0.225	0.230	0.300	0.171	0.203	0.013	0.132	0.162	0.112	0.224
D	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025	0.000	0.000
E	0.125	0.216	0.000	0.057	0.027	0.000	0.059	0.200	0.200	0.079
MDH-1										
N	40	36	20	36	38	36	40	35	40	37
A	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000
B	0.063	0.069	0.100	0.181	0.145	0.069	0.213	0.300	0.025	0.176
C	0.700	0.569	0.725	0.653	0.671	0.708	0.637	0.657	0.875	0.770
D	0.237	0.278	0.175	0.167	0.145	0.208	0.150	0.043	0.100	0.054
E	0.000	0.083	0.000	0.000	0.039	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
ME--1										
N	38	40	20	40	40	40	34	36	40	40
A	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.028	0.000	0.000
B	0.053	0.000	0.000	0.075	0.200	0.000	0.265	0.000	0.000	0.000
C	0.829	0.788	1.000	0.900	0.712	0.850	0.662	0.889	1.000	0.925
D	0.118	0.213	0.000	0.025	0.087	0.150	0.074	0.083	0.000	0.075
PGI-1										
N	36	34	11	33	29	40	34	40	39	39
A	0.000	0.000	0.045	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
B	0.000	0.000	0.045	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.051	0.000
C	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025	0.176	0.000	0.641	0.679
D	0.431	0.691	0.591	0.712	0.828	0.863	0.706	0.950	0.295	0.321
E	0.569	0.309	0.318	0.288	0.172	0.112	0.118	0.050	0.013	0.000
PGI-2										
N	40	34	20	35	37	40	31	38	40	40
A	0.013	0.074	0.025	0.000	0.000	0.063	0.000	0.000	0.000	0.175
B	0.800	0.662	0.775	0.829	0.676	0.625	0.790	0.776	0.837	0.813
C	0.188	0.265	0.200	0.171	0.324	0.313	0.210	0.224	0.162	0.013

APÉNDICE 11. Número de alelos por locus (A) en los 11 loci definidos para *Sagittaria demersa*

Locus	Pob. 1	Pob. 2	Pob. 3	Pob. 5	Pob. 6	Pob. 7	Pob. 8	Pob. 9	Pob. 10	Pob. 12
APX-1	4	2	4	3	3	2	3	3	1	4
CPX-1	3	3	2	4	4	3	3	3	2	2
CPX-2	3	3	2	3	4	2	3	2	3	3
CPX-3	3	2	2	3	2	3	3	3	3	4
GOT-1	2	1	4	2	3	3	3	1	3	3
GOT-2	3	2	2	2	2	2	2	3	2	2
GOT-3	3	3	4	3	3	2	3	4	4	3
MDH-1	3	4	3	3	4	4	3	3	3	3
ME-1	3	2	1	3	3	2	3	3	1	2
PGI-1	2	2	4	2	2	3	3	2	4	2
PGI-2	3	3	3	2	2	3	2	2	2	3
Promedio	2.91	2.45	2.82	2.73	2.91	2.64	2.82	2.64	2.55	2.82
Error Estándar	0.2	0.3	0.3	0.2	0.3	0.2	0.2	0.3	0.3	0.3

APÉNDICE 12. Número efectivo de alelos por locus (Ae) en los 11 loci definidos para *Sagittaria demersa*

Locus	Pob. 1	Pob. 2	Pob. 3	Pob. 5	Pob. 6	Pob. 7	Pob. 8	Pob. 9	Pob. 10	Pob. 12
APX-1	2.32	1.42	1.74	2.11	2.19	1.45	1.19	1.97	1.00	1.57
CPX-1	1.77	1.75	1.98	1.47	2.33	1.26	1.81	1.51	1.38	1.78
CPX-2	2.19	1.54	1.34	2.33	2.24	1.88	2.13	2.00	2.06	1.52
CPX-3	2.41	1.03	2.11	2.17	1.83	1.51	2.28	1.76	1.97	1.89
GOT-1	1.16	1.00	2.61	1.76	1.76	1.23	1.60	1.00	1.62	1.41
GOT-2	1.17	1.23	1.10	1.15	1.03	1.13	1.19	2.30	1.28	1.53
GOT-3	2.05	2.46	2.20	1.60	1.58	1.02	1.48	2.26	1.97	1.84
MDH-1	1.82	2.42	1.77	2.05	2.03	1.82	2.11	1.91	1.29	1.60
ME-1	1.42	1.50	1.00	1.23	1.80	1.34	1.95	1.25	1.00	1.16
PGI-1	1.96	1.75	2.20	1.70	1.40	1.32	1.84	1.10	2.00	1.77
PGI-2	1.48	1.95	1.56	1.40	1.78	2.03	1.50	1.53	1.38	1.45
Promedio	1.80	1.64	1.78	1.72	1.81	1.45	1.73	1.69	1.54	1.59
Error Estándar	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1