



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE ECOLOGÍA
BIOLOGÍA EVOLUTIVA**

**Filogeografía de *Salix humboldtiana* distribuido en tres regiones
hidrológicas (Ameca, Balsas y Lerma).**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MARIANA SUSANA HERNÁNDEZ LEAL

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU
INSTITUTO DE ECOLOGÍA**

**COMITÉ TUTOR: DR. GERARDO PÉREZ PONCE DE LEÓN
INSTITUTO DE BIOLOGÍA**

**COMITÉ TUTOR: DR. JUAN PABLO JARAMILLO CORREA
INSTITUTO DE ECOLOGÍA**

MÉXICO, D.F.

FEBRERO, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA
BIOLOGÍA EVOLUTIVA

**Filogeografía de *Salix humboldtiana* distribuido en tres regiones
hidrológicas (Ameca, Balsas y Lerma).**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MARIANA SUSANA HERNÁNDEZ LEAL

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU
INSTITUTO DE ECOLOGÍA

COMITÉ TUTOR: DR. GERARDO PÉREZ PONCE DE LEÓN
INSTITUTO DE BIOLOGÍA

COMITÉ TUTOR: DR. JUAN PABLO JARAMILLO CORREA
INSTITUTO DE ECOLOGÍA

MÉXICO, D.F.

FEBRERO, 2014

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas, en su sesión ordinaria del día 06 de mayo de 2013, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del Posgrado en Ciencias Biológicas, de la alumna **HERNÁNDEZ LEAL MARIANA SUSANA** con número de cuenta **301819750** con la tesis titulada "FILOGEOGRAFÍA DE *SALIX HUMBOLDTIANA* DISTRIBUIDO EN TRES REGIONES HIDROLÓGICAS (AMECA, BALSAS Y LERMA)", bajo la dirección del **DR. DANIEL IGNACIO PIÑERO DALMAU**:

Presidente:	DRA. ELLA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ
Vocal:	DRA. ANA ELENA ESCALANTE HERNÁNDEZ
Secretario:	DR. JUAN PABLO JARAMILLO CORREA
Suplente:	DR. ANTONIO GONZÁLEZ RODRÍGUEZ
Suplente:	DRA. HELGA OCHÓTERENA BOOTH

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 24 de enero de 2014

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARIA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

c. c. p. Expediente del (la) interesado (a).

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM

Al Consejo nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y el Programa nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) por la beca otorgada en el período de Febrero 2011- Enero2013 (CVU: 339623). El financiamiento para realizar el proyecto se obtuvo a través del Instituto de Ecología UNAM.

El comité tutorial quedó integrado por los siguientes miembros:

Dr. Daniel Ignacio Piñero Dalmau

Dr. Gerardo Pérez Ponce de León

Dr. Juan Pablo Jaramillo Correa

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todas las personas que me apoyaron en la realización de este trabajo, en especial mi más profundo agradecimiento a:

Dr. Daniel Piñero, por haber confiado en mí y en los sauces pese a todos los pronósticos desfavorables. Por permitirme hacer lo que es mi pasión.

A mi comité tutorial y revisores que contribuyeron con sus opiniones y comentarios al mejoramiento de este trabajo: Dra. Ella Vázquez Domínguez, Dr. Juan Pablo Jaramillo Correa, Dra. Ana Elena Escalante Hernández, Dra. Helga Ochoterena Booth, Dr. Antonio González Rodríguez, especialmente al Dr. Gerardo Pérez Ponce de León y a sus alumnos por todo el trabajo que han realizado en los ríos de México.

A Ariadna Morales García, que además de ser una gran amiga fue un excelente técnico de laboratorio. Gracias por todo el apoyo, las risas y los cafés.

A todos los miembros del laboratorio de Genética y Ecología, por sus comentarios apoyo y por soportar mis malos ratos.

A aquellos que me acompañaron en las colectas del esquivo *Salix humboldtiana* en los tristemente caños y ríos de México: Ariadna, Alicia, Adán, Alfredo, Eva, Laura, Lorena, Lev, Sergio, Roberto, Arzu y Jerónimo; en especial a Christian por compartir su amor por los ríos y a Luis Hernández por llevarme a Tierra Caliente.

A mis Padres, hermanos y tíos, por apoyarme siempre sin importar mis locuras y preocuparse cuando voy a territorio hostil.

A mis amigos, Ana, Andrés, Diana, Isa, Lorena, Lili, Martha, Jorge y Vladimir, porque sin importar el tiempo se que están ahí para los buenos y malos ratos.

A la gente de Jalisco, Morelos y Edo de Méx y en particular a la gente de Michoacán que, a pesar de todo, siempre me permitieron entrar a muestrear a sus parcelas y mostraron tan buena disposición a ayudarme en mi búsqueda de sauces.

Nadie se sumerge dos veces en el mismo río.

Heráclito de Éfeso

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE CUADROS	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	v
I. INTRODUCCIÓN	
1.1 <i>El análisis de la variación genética como herramienta para estudiar la historia evolutiva de las especies</i>	1
1.2 <i>Estimación de la diversidad genética</i>	2
1.3 <i>Estructura genética de las poblaciones</i>	3
1.4 <i>Biogeografía y filogeografía evolutiva</i>	5
1.5 <i>Filogeografía de plantas</i>	5
1.6 <i>Flujo genético en plantas</i>	6
1.7 <i>Marcadores moleculares</i>	7
1.8 <i>Dinámica de las comunidades riparias</i>	8
II ANTECEDENTES	
2.1 <i>Ecosistemas dulceacuícolas del centro de México: Ameca, Balsas y Lerma.</i>	10
2.2 <i>El género Salix</i>	12
2.2.1 <i>Hibridación</i>	13
2.2.2 <i>Salix humboldtiana</i>	16
2.3 <i>Justificación</i>	18
III HIPÓTESIS	20
IV OBJETIVOS	20
V MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1 <i>Colecta de material y extracción de ADN</i>	21
5.2 <i>Marcadores moleculares</i>	23
5.3 <i>Identificación de clones</i>	24
5.4 <i>Delimitación de grupos genéticos</i>	24
5.4.1 <i>Estructura genética</i>	27
5.4.2 <i>Análisis de Varianza Molecular</i>	28
5.5 <i>Índices de diversidad genética en grupos genéticos</i>	28
5.6 <i>Determinación de parentesco entre individuos</i>	30
5.7 <i>Migración y Aislamiento por distancia</i>	30
VI RESULTADOS	
6.1 <i>Delimitación de grupos genéticos</i>	34
6.1.1 <i>Estructura genética</i>	36
6.1.2 <i>Análisis de Varianza Molecular</i>	37
6.2 <i>Diversidad genética</i>	38

6.3 <i>Migración y aislamiento por distancia</i>	40
VII DISCUSIÓN	
7.1 <i>Identificación de clones</i>	42
7.2 <i>Variación genética</i>	43
7.3 <i>Migración y aislamiento por distancia</i>	49
VIII CONCLUSIONES	52
LITERATURA CITADA	53
ANEXOS	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Experimento de cruzas de <i>Drosophila melanogaster</i> de Greenberg y Crow (1960)	4
Figura 2. Representación esquemática de la regeneración arbórea (principalmente Salicaceas) en la zona activa de ríos a) trenzados y b) meándricos.	9
Figura 3. Sistemas dulceacuícolas del centro de México y eventos geológicos.	12
Figura 4. Filogenia basada en el análisis de secuencias de <i>ITS</i> utilizando máxima verosimilitud.	15
Figura 5. <i>Salix humboldtiana</i> .	16
Figura 6. Distribución de <i>S. humboldtiana</i> en México.	18
Figura 7. Ubicación de las 20 localidades colectadas para <i>Salix humboldtiana</i> y las regiones hidrológicas a las que pertenecen.	22
Figura 8. Complejo de poblaciones fuente-receptor.	31
Figura 9. Escenarios de migración entre regiones hidrológicas para los datos de microsatélites nucleares de <i>Salix humboldtiana</i> .	33
Figura 10. Estructuración de la variación genética en <i>Salix humboldtiana</i> .	35
Figura 11. Probabilidad de asignación de cada individuo de <i>Salix humboldtiana</i> utilizando los diferentes tipos de microsatelites.	36
Figura 12. Prueba de Mantel para los estimados de R_{ST} .	40
Figura 13. Esquema de la integración de <i>Salix humboldtiana</i> al pulso de inundación-sequía	45

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Relaciones de parentesco para las poblaciones de <i>Salix humboldtiana</i> .	37
Cuadro 2. Diferenciación genética de grupos genéticos (Geneland).	37
Cuadro 3. Índices de fijación y porcentajes de variación del AMOVA tomando en cuenta diferentes niveles de estructuración: por cuencas y por regiones.	38
Cuadro 4. Índices de diversidad genética para cada población de <i>Salix humboldtiana</i> calculados con siete microsatélites nucleares polimórficos.	39
Cuadro 5. Modelos de migración para <i>S. humboldtiana</i> en tres regiones hidrológicas en el centro de México.	41
Cuadro 6. Índices de diversidad en diferentes especies del género <i>Salix</i> y otras especies de árboles obtenidos a partir de microsatélites nucleares.	44

RESUMEN

Salix humboldtiana es un árbol ripario con amplia distribución en América, desde el norte de México hasta la Patagonia (Argentina). A pesar de que el género *Salix* es un componente importante de este tipo de ecosistemas en México, existen pocos estudios relacionados con diversidad y flujo genético entre poblaciones o entre diversas especies del género, tanto introducidas como nativas. El objetivo de este estudio fue determinar si existe estructuración genética en las poblaciones de esta especie en tres regiones hidrológicas del país: Ameca, Balsas y Lerma. Asimismo, se exploró si dentro de las regiones hidrológicas existen grupos genéticos diferentes y si hay flujo genético entre regiones/grupos. En total, se caracterizaron 117 individuos de 20 localidades diferentes. Dependiendo del método utilizado se encontraron entre tres (Structure) y ocho (Geneland) grupos genéticos. Estos grupos concuerdan con dos niveles jerárquicos de estructuración, un nivel general basado en las regiones hidrológicas y dentro de éstas una estructuración basada en las cuencas dentro de cada región. Utilizando siete microsatélites nucleares (cuatro dinucleótidos simples y tres compuestos) y uno de cloroplasto se identificaron 79 alelos, de los cuales 28 resultaron ser únicos para alguno de los ocho grupos genéticos obtenidos con Geneland. La diversidad genética de la especie (H_o) fue de 0.508, la cual se encuentra dentro de los valores encontrados para otras especies del género *Salix*. Mediante el programa MIGRATE el modelo de migración que presentó la mayor probabilidad fue donde los grupos genéticos de Ameca y Lerma y Ameca y Balsas presentan flujo genético entre ellos. Sin embargo, tomando en cuenta la estructuración genética obtenida utilizando los datos del cloroplasto y los microsatélites nucleares dinucleótidos, los grupos Ameca y Balsas se asocian formando un solo grupo, por lo que se sugiere que esta compartición de alelos entre dichos grupos se debe a la retención de polimorfismos ancestrales por separación incompleta de linajes y no a procesos de migración. Debido a que la probabilidad de los diferentes modelos fue muy baja, dichos resultados deben ser interpretados con precaución. Esto puede deberse a dos factores: la baja cantidad de loci polimórficos encontrados (siete loci) y/o la posible ausencia de localidades intermedias entre las regiones estudiadas. Finalmente, la estructuración de los datos tomando en cuenta todos los loci nucleares, mostraron consistentemente tanto en Geneland como Structure que las localidades de Cotija y Tocumbo (parte del río Itzicuario), y Jiquilpan (río Sahuayo), presentan genotipos mezclados entre dos grandes grupos Lerma y

Ameca. Lo anterior puede significar que el flujo genético entre estos dos grupos es más reciente y pudo haber sucedido después de que se separaran las cuencas por actividad volcánica.

ABSTRACT

Salix humboldtiana is a riparian tree distributed from northern Mexico to Patagonia (Argentina). While the genus is an important component of these ecosystems in Mexico, there are very few studies related to genetic diversity and gene flow among different populations or species both introduced or native. The objective of my study was to determine if there is genetic structuring among populations from three hydrology regions in the country: Ameca, Balsas and Lerma. Also, I explored if within hydrology regions I could identify distinct genetic groups and if there is gene flow among regions and/or groups. In total I genotyped 117 individuals from 20 localities. Depending on the approach used I found between three (Structure) and eight (Geneland) genetic groups. These groups correspond with two hierarchical levels, one based on hydrological regions and a nested one based on the watershed structure within these regions. Using seven nuclear microsatellites (four consisting of simple dinucleotides and three compounded) and one from the chloroplast I identified 79 alleles from which 28 were unique to one of the eight Geneland groups. Species genetic diversity (H_o) was 0.508, which is close to the estimates found for other *Salix* species. Using the program MIGRATE the migration model with the highest probability was the one in which the genetic groups from Ameca and Lerma and from Ameca y Balsas show gene flow among them. On the other hand and taking into account the genetic structure found with the chloroplast microsatellites and the nuclear dinucleotide microsatellites, Ameca and Balsas formed a single group which suggests that this allele sharing is due to retention of ancestral polymorphisms due to incomplete lineage sorting and not to migration processes. Since the probability of different models was very low, these results should be interpreted with caution. This could be due to two factors: the low number of polymorphic loci found (seven loci) and/or to the possible absence of intermediate sampling localities within the studied regions. Finally, data structure taking into account all nuclear loci showed consistently both with Geneland and Structure that sampling localities Cotija y Tocumbo (part of Itz'icuaro river), and Jiquilpan (Sahuayo river), showed admixed genotypes from the two main groups Lerma and Ameca. This could mean that gene flow among these two groups is more recent and could have happened after the watersheds got separated due to volcanic activity.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 *El análisis de la variación genética como herramienta para estudiar la historia evolutiva de las especies.*

Se entiende por variación genética toda aquella alteración que modifique la secuencia de nucleótidos del material genético o la estructura de los cromosomas. Esta variación ocurre en la forma de sustituciones nucleotídicas, inserciones o deleciones de fragmentos como los transposones, o duplicaciones del material genético (Wayne y Miyamoto, 2006). La variación genética de una población está determinada por su historia evolutiva y es consecuencia de las interacciones entre diferentes factores, generando la evolución de las poblaciones (Hedrick 2005).

La mutación es la fuente fundamental de variación genética, ya que conduce a cambios directos en el genoma y a la creación de nuevos alelos en las poblaciones (Freeman y Herron 2002, Griffiths *et al.* 2004). El flujo génico es el proceso por el cual los genes se mueven de una población a otra, mediante la migración de gametos o individuos.

Dependiendo de su intensidad y duración, el flujo génico permite la diferenciación u homogenización de las poblaciones, estableciendo una relación entre éste y la estructura génica (Griffiths *et al.* 2004, Rodríguez *et al.* 2004). La recombinación permite mezclar los genes que forman pares alélicos y repartirlos en distintas combinaciones. Al igual que como ocurre con la mutación, la recombinación se considera como una fuente de variación hereditaria (Griffiths *et al.* 2004). La deriva génica se interpreta como cambios al azar en las frecuencias de los alelos o de los haplotipos de una generación a otra debido al tamaño finito de las poblaciones. Mientras más pequeña sea una población la deriva génica actuará más rápido fijando o desapareciendo un alelo de la población (Futuyma 2005). Por otra parte, la selección natural es el proceso por el cual los alelos en ciertas combinaciones genotípicas, aumentan la sobrevivencia y la reproducción de los individuos, lo cual lleva a que dentro de dichas poblaciones aumente gradualmente la frecuencia de dichos alelos en generaciones sucesivas (Hartl y Clark 2007).

La genética de poblaciones es considerada como el estudio de la variación genética en las poblaciones, así como de los procesos evolutivos que afectan a dicha variación en tiempo y espacio (Hedrick 2005). Para poder hacer el estudio de dichos cambios la genética de poblaciones se basa en un modelo donde ninguno de las fuerzas evolutivas existe (mutación, migración, selección, deriva génica y apareamiento selectivo): el equilibrio de Hardy-Weinberg (HW). Dicho modelo permite explicar los aspectos fundamentales de la genética de poblaciones, describiendo las condiciones genéticas de las poblaciones cuando éstas se encuentran en equilibrio, es decir, sin cambios en las frecuencias alélicas a través de las generaciones (Griffiths *et al.* 2004). Otros supuestos del modelo incluyen la existencia de poblaciones con: organismos diploides, generaciones discretas (no existe solapamiento de generaciones), sin diferencias entre las frecuencias de machos y hembras y genes no ligados al sexo. A partir de esta la comparación con este “modelo nulo” de evolución, se pueden investigar y deducir las causas que originan que una población se desvíe de dicho equilibrio, prediciendo los procesos evolutivos que afectan la estructura genética en las poblaciones (Freeman y Herron 2002, Allendorf y Luikart 2006). El equilibrio de Hardy-Weinberg se expresa mediante la expansión del binomio:

$$(p+q)^2 = p^2 + 2pq + q^2 = 1, \quad p + q = 1$$

El cual incluye las frecuencias genotípicas esperadas en una población diploide para un solo locus, y describe la frecuencia genotípica para los homocigotos, así como la del heterocigoto:

$p = f(A)$ frecuencia del alelo A; $q = f(a)$ frecuencia del alelo a

$p^2 = f(AA) = D$ frecuencia del genotipo AA; $q^2 = f(aa) = R$ frecuencia del genotipo aa

$2pq = f(Aa) = H$ frecuencia del genotipo heterocigoto Aa

1.2 Estimación de la diversidad genética.

Existen diferentes formas de estimar la diversidad genética de una población. Una de ellas y la más importante es la heterocigosis, que es una medida que describe la variación genética en un único locus o en un número determinado de loci, y puede ser estimada de diferentes maneras (Hedrick 2005). Por ejemplo, la heterocigosis esperada, es la proporción de

heterocigos en una población cuando esta se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg (H_E); dado que los individuos de especies diploides presentan dos estados alélicos idénticos (homocigoto) o diferentes (heterocigoto) para un locus determinado (Hedrick 2005).

$$H_E = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

Donde:

H_E = heterocigosis esperada

p_i^2 = proporción de homocigotos esperados para el alelo i

Estimador de la heterocigosis observada (H_o): en poblaciones con apareamiento aleatorio, la heterocigosidad observada es cercana a la heterocigosidad esperada bajo el modelo teórico, pero en aquellas poblaciones que presentan desviaciones con respecto al equilibrio de Hardy-Weinberg, la heterocigosidad observada puede ser calculada como (Hedrick 2000):

$$H_o = \sum_{i < j} p_{ij}$$

Donde:

H_o = heterocigosis observada

p_{ij} = frecuencia del genotipo i

1.3 Estructura genética de las poblaciones

Las poblaciones naturales generalmente no se encuentran genéticamente aisladas, ya que regularmente intercambian genes en menor o mayor grado. Este fenómeno se conoce como flujo génico y homogeneiza las frecuencias génicas entre las subpoblaciones de una especie (Futuyma 2005). Por otro lado, cuando una especie llega a tener una distribución muy amplia, puede ocupar sitios separados por barreras geográficas que impiden el movimiento de genes, lo cual subdivide a las poblaciones y lleva a la diferenciación de las mismas (Hedrick 2005).

Bajo algunas condiciones climáticas y geográficas, las poblaciones pueden crecer y expandir su distribución geográfica y es posible que logren dispersarse a otras áreas. Estas variaciones en el tamaño de las poblaciones, y las dinámicas de extensión y contracción de las áreas donde se distribuyen, pueden contribuir a crear diferencias geográficas en la frecuencia de los alelos a través de procesos como la deriva génica, los cuellos de botella o el efecto fundador (Bensch y Hasselquist 1999). Otro fenómeno que contribuye al cambio en las frecuencias genotípicas es el sistema de apareamiento que existe dentro de las poblaciones que componen una especie, ya que es dentro de las mismas donde ocurren la mayoría de los apareamientos (Hartl y Clark 2007). Si las poblaciones de una especie son pequeñas y se encuentran aisladas de otras poblaciones es probable que la mayoría de los apareamientos ocurran entre individuos genéticamente relacionados; a este fenómeno se le conoce como endogamia. Cuando esto sucede, la frecuencia de homocigotos en la población se incrementa y la frecuencia de los heterocigotos disminuye en relación a las proporciones del apareamiento al azar (Hardy-Weinberg), lo cual puede llevar a la disminución de la variabilidad y de la adecuación media de la población produciendo depresión por endogamia (Figura 1; Hartl y Clark 2007). Los cambios genotípicos causados por la endogamia afectan todos los loci en el genoma, pero su efecto en las frecuencias genotípicas puede desaparecer rápidamente si el sistema de apareamiento se modifica (Hedrick 2005).

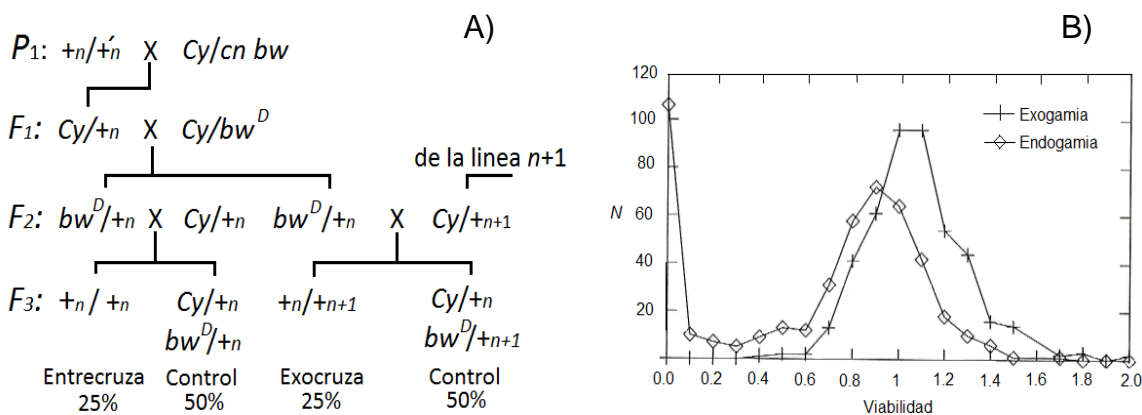


Figura 1. Experimento de cruza de *Drosophila melanogaster* de Greenberg y Crow (1960). A) Diseño experimental de cruza. El objetivo de dichas cruza era generar líneas de moscas que fueran completamente homocigas en el segundo cromosoma. B) La viabilidad de dichas moscas es comparada con otras en las que los segundos cromosomas son elegidos independientemente en la naturaleza. Imágenes modificadas de Gillespie (2004).

1.4 Biogeografía y filogeografía evolutiva

La biogeografía evolutiva integra datos filogenéticos, moleculares, paleontológicos y de distribución para descubrir patrones biogeográficos y evaluar los cambios históricos que los han moldeado (Morrone 2010). La filogeografía es una rama de la biogeografía que trata de los procesos que rigen las distribuciones geográficas de los linajes genealógicos o filogenéticos, principalmente dentro y entre especies con relaciones cercanas. Esta disciplina tiene que ver con la distribución espacial de los linajes de genes, así como de eventos históricos y filogenéticos (Avise *et al.* 1987, Avise 2000); o bien es mencionada como parte de la biología evolutiva, siendo el parte aguas entre la microevolución (relaciones tocogenéticas) y la macroevolución (relaciones jerárquicas; Domínguez-Domínguez 2009).

En un principio la filogeografía se utilizó como una herramienta para establecer patrones evolutivos entre las poblaciones de una misma especie. Sin embargo, también es útil para descubrir eventos históricos, como la fragmentación de hábitats o la expansión en la distribución de las especies, eventos de migración, extinción de linajes genéticos en determinadas áreas, etc. (Hardy *et al.* 2002). Adicionalmente es posible utilizarla para inferir parámetros demográficos históricos como la presencia, intensidad y duración de cuellos de botella, el tamaño efectivo de las poblaciones, la secuencia de colonización, las trayectorias evolutivas, o para identificar unidades prioritarias para la conservación. Finalmente, el estudio comparado de los patrones filogeográficos de varias especies o poblaciones co-distribuidas contribuye a plantear hipótesis sobre posibles eventos comunes de vicarianza o dispersión y a identificar las causas geológicas, ecológicas o etológicas que pudieron haber influido en ellos (Lanteri y Confalonieri 2003). Tal es el caso de la gran diversidad de especies de cíclidos en el lago Victoria (zona centro-oriental de África) (Verheyen *et al.* 2003).

1.5 Filogeografía de plantas

Las plantas cuentan con una gran variedad de características interesantes para realizar estudios de filogeografía (Avise, 2007). En particular, permanecen inmóviles y, por lo tanto, la distribución espacial tiene una importancia central en su estudio y facilita considerablemente su muestreo (Silvertown y Charlesworth 2001). Sin embargo, las plantas con semilla pueden mover sus genes a través de dos formas durante fases cortas pero críticas en su desarrollo: antes de la fertilización a través del gametofito masculino (polen) y después en el esporofito

joven a través de semillas. En las angiospermas y gimnospermas el polen juega un papel importante al conectar las poblaciones a través del flujo génico, mientras que las semillas (u otras partes vegetales) son necesarias para el establecimiento y permanencia de nuevas poblaciones. En consecuencia, los genes heredados por vía materna (los cuales no se transmiten a la siguiente generación por el polen) pueden ser de gran importancia para esclarecer las dinámicas espacio temporales de las poblaciones en plantas (Petit y Vendramin 2007). Sin embargo, enfocarse en un gen o genes heredados de forma uniparental puede llevar a conclusiones erróneas ya que sólo reflejan una parte de la historia evolutiva de la especie (Godinho *et al.* 2008).

En un estudio filogeográfico no sólo es importante considerar el tipo de herencia del o de los marcadores moleculares a utilizar, sino también la resolución cronológica de los mismos. Mientras más rápida sea la tasa de mutación de un marcador, más recientes serán los eventos que se puedan estudiar. En el pasado, la mayoría de los estudios filogeográficos se realizaban con marcadores de ADN mitocondrial y ADN de cloroplasto (Avice 2000). Sin embargo, dichos marcadores además de tener una herencia uniparental, suelen tener tasas de sustitución lentas, con respecto a otros marcadores nucleares como los microsatélites. Para tener una visión más amplia de los procesos evolutivos que han influenciado a una especie es recomendable hacer uso de marcadores con diferentes tipos de herencia y tasas de mutación (Koskinen *et al.* 2002, Huertz *et al.* 2004).

1.6 Flujo genético en plantas

Por otro lado, la estructuración genética de las poblaciones y en última instancia el establecimiento de linajes evolutivos independientes se encuentra fuertemente influido por los procesos de intercambio genético, dentro y entre poblaciones (Hamrick y Schnable 1985). Existe una gran cantidad de factores ligados a la ecología reproductiva de las plantas que influyen en la naturaleza de dicho intercambio. Por ejemplo, el sistema de apareamiento, el cual puede ir de un sistema en donde no existen barreras reproductivas que impiden el flujo génico entre poblaciones o especies diferentes como es el caso de varias especies del género *Quercus* (Schaal *et al.* 1998). En el otro extremo se encuentran especies como *Taraxacum officinale*, que en poblaciones de Norte América se reproduce predominantemente por apomixia (partenogénesis). En dichas poblaciones, la reproducción

asexual ha dado como resultado una sobrerrepresentación de genotipos ampliamente distribuidos (Van der Hulst *et al.* 2000).

El mecanismo por el cual los genes migran también puede ser importante para determinar el intercambio genético. Los patrones de dispersión se ven influenciados por variaciones espaciales y temporales en los sistemas de apareamiento (Hamrick 1987; Hamrick y Godt 1990). Por ejemplo, las variaciones en las tasas de entrecruzamiento y/o de autopolinización pueden depender de variaciones geográficas o estacionales en la distribución de los polinizadores, conduciendo a diferentes patrones de intercambio genético entre poblaciones dentro de la misma especie a través del tiempo (Schaal *et al.* 1998).

1.7 Marcadores moleculares

Se denominan marcadores moleculares a aquellas biomoléculas, básicamente ADN o proteínas, que pueden funcionar como caracteres cualitativos o cuantitativos (relacionados con diferentes rasgos genéticos heredables), permitiendo detectar diferencias y similitudes (polimorfismos), presentes en los organismos de los que provienen. Estos marcadores permiten evaluar la variación presente entre organismos de poblaciones de una especie (Avice 1994, Li 2000, Freeman *et al.* 2002).

Uno de los marcadores que más recientemente han sido utilizados, no sólo para estudios genéticos, sino para estudios ecológicos que involucran la estimación de tasas de migración, tamaños poblacionales, cuellos de botella, estudios de paternidad y consanguinidad, entre otros, son los microsatélites. Los loci de microsatélites son repeticiones en *tandem* de segmentos cortos de ADN, típicamente de 1-5 bases en longitud. Los microsatélites tienen ciertas ventajas sobre otros tipos de marcadores ya que combinan alta variabilidad con altas tasas de mutación y una herencia codominante (microsatellites nucleares). Su polimorfismo radica en las diferencias en el número de repeticiones, que permite diferenciar alelos por su longitud. Esto hace que los microsatélites sean considerados como un marcador molecular muy útil para detectar variación genética, a tal grado que es posible identificar individuos de una población con unos pocos loci (Jarne *et al.* 1996, Goldstein y Schlotterer 2000, Loughheed *et al.* 2000, Selkoe y Tioonen 2006).

1.8 Dinámica de las comunidades riparias

Se conoce como bosque de galería, bosque ripario o vegetación ribereña, a las comunidades arbóreas que se desarrollan a lo largo de corrientes de agua más o menos permanentes, las cuales mantienen la integridad de los ríos, arroyos y riberas (Rzedowski 1994; Norris 2001). Debido a la proximidad y la interacción de los cuerpos de agua, la vegetación ribereña tiene una forma lineal característica y constituye una zona de transición entre los sistemas terrestres y acuáticos (Naiman y Décamps 1997, Naiman et al. 2001, Rosales et al. 2001, Ward et al. 2002)

Los grandes ríos siempre han sido sistemas difíciles de estudiar debido a sus dimensiones y su sorprendente dinámica espacial y temporal. Junk *et al.* (1989) postulan que la dinámica del sistema formado por el río más su llanura aluvial está controlada fundamentalmente por el llamado “pulso de inundación”. Este concepto fue reformulado posteriormente por Neiff (1990) para quien la fase de sequía es tan importante como la de inundación en el control de muchos procesos del sistema, resultando por esto el concepto de “pulso de inundación-sequía” o, simplemente *pulso*. Creando un sistema dinámico en el cual los disturbios en las comunidades de dicho hábitat son comunes (Liotta 2001).

El patrón temporal de pulsos en los corredores riparios se encuentra estrechamente relacionado a las condiciones climáticas, en particular con la distribución estacional de precipitación y cuando ocurre, con la duración del deshielo (Karrenberg *et al.* 2002). Por ejemplo, en los sistemas donde la mayor proporción del flujo es producto del deshielo, regularmente existe un fuerte patrón estacional. Dichos regímenes de descarga han sido descritos para muchos ríos de Norte América (Mahoney Rood 1998, Cooper *et al.* 1999, Taylor, Wester y Smith 1999). En dichos ecosistemas, el periodo máximo de caudal es altamente predecible y la historia de vida de los organismos se encuentra ajustada a la regularidad en el ambiente. En otros sistemas, como por ejemplo el río Tagliamento (Italia), la estacionalidad se encuentra lejos de ser predecible. En dicho río se combinan dos factores: el flujo proveniente del deshielo en primavera y otros causados por la aparición de copiosas lluvias, las cuales pueden ocurrir en cualquier momento del año (Figura 2; Edwards *et al.* 1999).

Dicha dinámica de sequia-inundación genera la existencia de parches de hábitat efímeros en donde el proceso de colonización y extinción es recurrente, condicionando a que varias especies de árboles desarrollen estrategias adaptativas para colonizar exitosamente dichos hábitats. Estas estrategias incluyen la dispersión de sus semillas por agua, viento y animales, así como la reproducción asexual producida por propágulos vegetativos o esquejes (ramas y troncos; Naiman y De´camps 1997). Los parches de vegetación pionera, en los cuales las Salicaceas juegan un rol importante, duran con frecuencia poco tiempo. Por ejemplo, se encontró que pocos árboles de la llanura aluvial activa del río Maggia (Suecia) excedían los 20 años (Bayard y Schweingruber 1991). En la zona activa del río Tagliamento, NE de Italia, la edad promedio de los árboles más viejos fue de sólo 8.4 años (Karrenberg *et al.* 2003) y hubo pocas islas cuya vegetación boscosa fuera mayor a 20 años. Sin embargo, donde las condiciones de descarga son estables por un periodo de tiempo más extendido, como en las terrazas más viejas de la llanura aluvial y en muchas llanuras costeras (Hupp 2000), las comunidades de árboles pioneros son reemplazadas por bosques secundarios como por ejemplo los de los géneros: *Acer*, *Ulmus* y *Fraxinus* (Barnes 1985, Ellenberg 1996, Friedman, Osterkamp y Lewis 1996) o, en las regiones boreales, por coníferas (p.ej. Farjon y Bogaers 1985, Helm y Collins 1997, Nakamura, Yajima y Shun 1997).

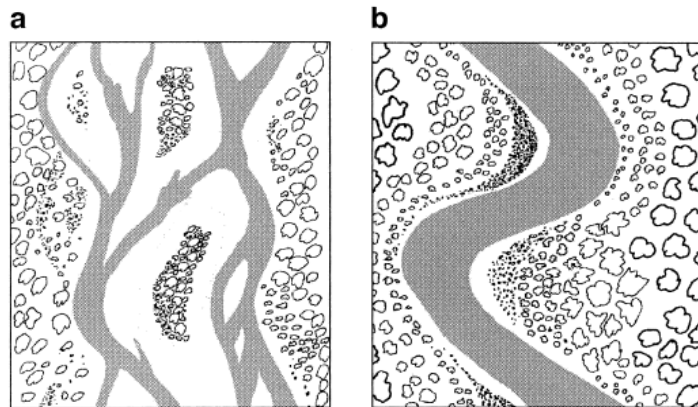


Figura 2. Representación esquemática de la regeneración arbórea (principalmente Salicaceas) en la zona activa de ríos a) trenzados y b) meándricos. En la imagen se aprecian árboles y arbustos de diferentes tamaños a lo largo del curso del agua (gris). En las corrientes con forma trenzada, las Salicaceas crecen principalmente en las islas y a lo largo del margen del río en la zona activa. Las especies de árboles crecen en grupos mixtos, sin embargo es posible observar una diferenciación entre las especies de arbóreas, las cuales tienden a crecer en el interior de los parches de vegetación, mientras que las arbustivas se encuentran confinadas a los parches en el margen. Generalmente el tipo de río trenzado corresponde a sistemas con fuerte estacionalidad en el flujo de agua. Tomado de Karrenberg (2002).

II. ANTECEDENTES

2.1 Ecosistemas dulceacuícolas del centro de México: Ameca, Balsas y Lerma.

Los ecosistemas de agua dulce en el centro de México se caracterizan por el dinamismo de su génesis, destrucción y compartimentalización inducida por la intensa actividad tectónica y volcánica de la región. Su rasgo principal es la Mesa Central, una elevación grande y aislada que incluye la geológicamente activa Faja Volcánica Transmexicana (TMVB por sus siglas en inglés), la cual es definida como el límite o área de transición entre las provincias Neártica y Neotropical (Corona *et al.* 2007).

Dentro de la Mesa Central la región hidrológica más importante es la del Lerma, la cual se encuentra incluida en su totalidad. Otras cuencas que se encuentran dentro de la Mesa Central son las del Valle de México, Chapala, Cuitzeo, Pátzcuaro, Zirahuen, Zacapu y Cotija; asimismo también incluye las partes altas y algunos tributarios de las regiones del Pánuco, Balsas, Coahuayana, Armería y Ameca, así como el río Verde, tributario del río Santiago. Dentro de estas cuencas se encuentra la mayor cantidad de zonas lacustres del país, las cuales se encuentran en altitudes que varían entre los 1400 y los 2600msnm (Domínguez-Domínguez 2009). La formación de dichos lagos se ha visto fuertemente influenciada por dos factores: el vulcanismo de la zona, el cual empezó desde el Mioceno (12-7 Ma), y a los cambios climáticos que han afectado la zona, principalmente durante el Pleistoceno (Ferrari *et al.* 1999, Israde-Alcantara *et al.* 2010).

Muchos de estos lagos, como el de Chapala y Sayula, se formaron durante el Pleistoceno debido a la interrupción de drenajes por efecto del vulcanismo, lo cual propició la formación de lagos con extensiones mayores a los de la actualidad (West 1964). Posteriormente, estos lagos se fueron reduciendo por la erosión de cabeceras de los ríos y la desecación causada por la acumulación de sedimentos, resultando en vasos lacustres planos (Barbour 1973).

Estos cambios en la conformación de las cuencas han servido para explicar el intercambio genético de poblaciones entre diferentes regiones. Mediante el análisis de sedimentos lacustres se ha inferido la existencia de una serie de conexiones entre el antiguo lago de Chapala y los lagos San Marcos, Zacoalco y Atotonilco (Figura 3). Esto sugiere la posibilidad de que la antigua salida del lago de Chapala fluía de Jocotepec a la cuenca de San Marcos

(Miller y Smith 1986). Otros estudios sugieren que los lagos del centro de México estaban conectados a la cuenca de Chapala. Este lago se encontraba unido a la cuenca del lago de San Marcos y que posteriormente se unía al Río Ameca, representando este río la desembocadura al mar del Río Lerma. (Tamayo y West 1964, Barbour 1973).

Otro fenómeno importante en la zona es la captura o piratería de ríos. Esto ocurre cuando las cabeceras de una cuenca, debido a eventos geológicos o de erosión, pasan a formar parte de otra cuenca. En la región de la Mesa Central la captura de tributarios del Lerma por parte del Balsas y del Pánuco ha sido ampliamente documentada por diversos autores (Miller y Smith 1986, Domínguez-Domínguez *et al.* 2006a, 2008a). Por ejemplo, se plantea que las cuencas de Tuxpan, Cupatitzio y Ario de Rosales, antiguos tributarios del Lerma, fueron capturados por el Balsas en diferentes eventos geológicos (Tamayo y West 1964). Así mismo, se postula que el lago de San Juanico se formó por el taponamiento de un tributario del lago de Chapala separándolo de este sistema (Álvarez 1963). Este tipo de conexiones no solo se basa en evidencias geológicas, sino que ha sido ampliamente discutida y corroborada por diversos estudios en organismos acuáticos de la zona (Mateos *et al.* 2002; Doadrio y Domínguez 2004, Webb *et al.* 2004, Domínguez-Domínguez *et al.* 2006 a, Domínguez-Domínguez 2009, Corona-Santiago 2013).

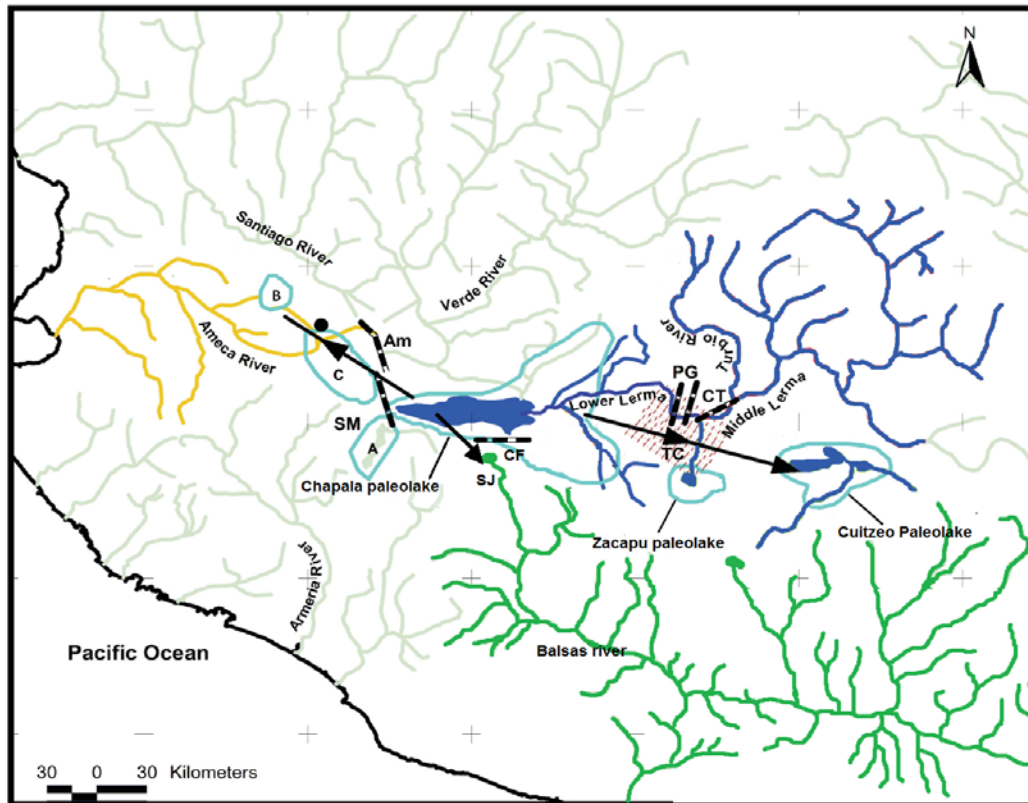


Figura 3. Sistemas dulceacuícolas del centro de México y eventos geológicos. En azul claro se indica la extensión de los paleolagos durante el Mioceno- Pleistoceno y con color azul oscuro, su extensión actual. **A:** Sayula, **B:** Magdalena **C:** Zacoalco-Ameca, **SJ:** San Juanico. Fallas y fosas representadas con líneas punteadas. **AM:** Ameca, **SM:** San Marcos, **CF** y **CT:** Chapala-Tula, **TC** Corredor volcánico Tarasco, **PG:** Fosa tectónica Penjamillo. Tomado de (Domínguez-Domínguez *et al.* 2008).

2.2 El género *Salix*

La palabra *Salix* deriva de las palabras celtas *sallis*: *sal* “cerca” y *lis* “agua” (Newsholme 2003). La familia de las Salicáceas contiene dos géneros *Populus* y *Salix*. El género *Salix* abarca entre 300 y 550 especies (Chao 1987, Cronquist 1988, Argus 1997, Fang *et al.* 1999, Ohashi 2001, Newsholme 2003, Heywood *et al.* 2006, Mabberley 2008), de las cuales más de 200 son híbridos (Newsholme 2003). Es un género ampliamente distribuido en las regiones frías y templadas del Hemisferio Norte, con algunas especies que se extienden a Sudamérica y África (por ejemplo *S. humboldtiana*, *S. mucronata*). La mayor diversidad de especies se encuentra en China (275 spp., Fang *et al.* 1999), el área que comprendía la Unión Soviética (107 spp., Skvortsov 1999), Norteamérica (103 spp., Argus 1997) y Europa

(65 spp., Argus 1979). Skvortsov (1999) argumenta que el género se encuentra más distribuido en el norte de Eurasia y de América, aunque México tiene alrededor de 30 especies.

El género *Salix* consiste principalmente de árboles y arbustos deciduos con inflorescencias en amentos, los cuales usualmente son rígidos y erguidos, extendidos, ocasionalmente recurvados o raramente caídos (Newsholme 2003). Cada amento está compuesto por un determinado número de flores compactas, todas soportadas por una escama floral. Las escamas florales son enteras, dentadas, glabras o con tricomas y varían de color dependiendo de la especie (Weberling *et al.* 1981). Los sauces generalmente son dioicos, aunque excepcionalmente las flores de un amento pueden ser bisexuales o una misma planta puede producir amentos con flores masculinas y femeninas por ejemplo: *S. martiana*, *S. acmophylla* (Rohwer y Kubitzki 1984, Rottenberg 2007). Su propagación en vida silvestre ocurre principalmente por semillas de manera sexual y asexualmente por medio de esquejes (ramas o tallos) que pueden echar raíz después de caer al suelo (Newsholme 2003).

Para el género *Salix*, Argus (2010) propone la existencia de cinco subgéneros: *Vetrix*, *Salix*, *Chamaetia*, *Longifolia* y *Protitea*. Para comprobar esto Hardig *et al.* (2010) realizaron una filogenia del género a partir de datos moleculares de secuencias ribosomales *ITS* (espaciador transcrito interno) y secuencias de cloroplasto del gen *matK*, las cuales muestran ciertas incongruencias. Los autores infieren que, dada la alta predisposición del género *Salix* a la hibridación, es muy probable que la introgresión y el sorteo de linajes sean los responsables de la distribución actual de haplotipos en el género. En ambas filogenias *S. humboldtiana* se encuentra en una posición de divergencia temprana dentro del género (Figura 4).

2.2.1 Hibridación

Es bien conocida la existencia de híbridos naturales dentro de la familia de las Salicaceas, siendo esta una de las pocas familias dentro de la cual la presencia de híbridos es muy frecuente (Ellstrand, Whitkus y Rieseberg 1996, Newsholme 2003). Es por ello que las relaciones filogenéticas dentro del género *Salix* son complicadas (Eckenwalder 1996, Whitham *et al.* 1996, Argus 1997, Skvortsov 1999, Hardig *et al.* 2010). Históricamente, los cambios radicales en el ambiente como las glaciaciones y las inundaciones han predisuesto

a que ocurran eventos de hibridación (Rood *et al.* 2007, Lamit *et al.* 2011, Karrenberg *et al.* 2002, Fussi *et al.* 2010). Sin embargo, la hibridación también puede ocurrir en áreas donde hay perturbaciones causadas por el hombre y la distribución de una especie se expande llegando a sobrelaparse con la de otra o donde se han plantado especies introducidas (Broeck *et al.* 2005).

En la naturaleza, la hibridación está estrechamente relacionada con la evolución reticulada dentro de la familia Salicaceae. Un ejemplo es el que se muestra en el caso de *Populus nigra* (sección *Aigeros*), en donde el genoma de cloroplasto se encuentra más cercanamente relacionado al de *P. alba* L. (sección *Populus*), mientras que sus genomas nucleares son divergentes. Esto sugiere la existencia de un evento antiguo de hibridación que implicó a *P. alba* como progenitor materno y a *P. nigra* como paterno y uno o varios eventos posteriores de retrocruza hacia poblaciones de *P. nigra* (Smith y Sytsma, 1990). En ocasiones, la introgresión se ve limitada a unas pocas poblaciones en la zona de contacto de dos especies. Por ejemplo, se ha observado que *S. alba* y *S. fragilis* intercambian genes únicamente en las poblaciones del Rin (Alemania), mientras que en otras cuencas (por ejemplo en Bélgica) las pozas genéticas de ambas especies se han mantenido independientes (Triest *et al.* 2000).

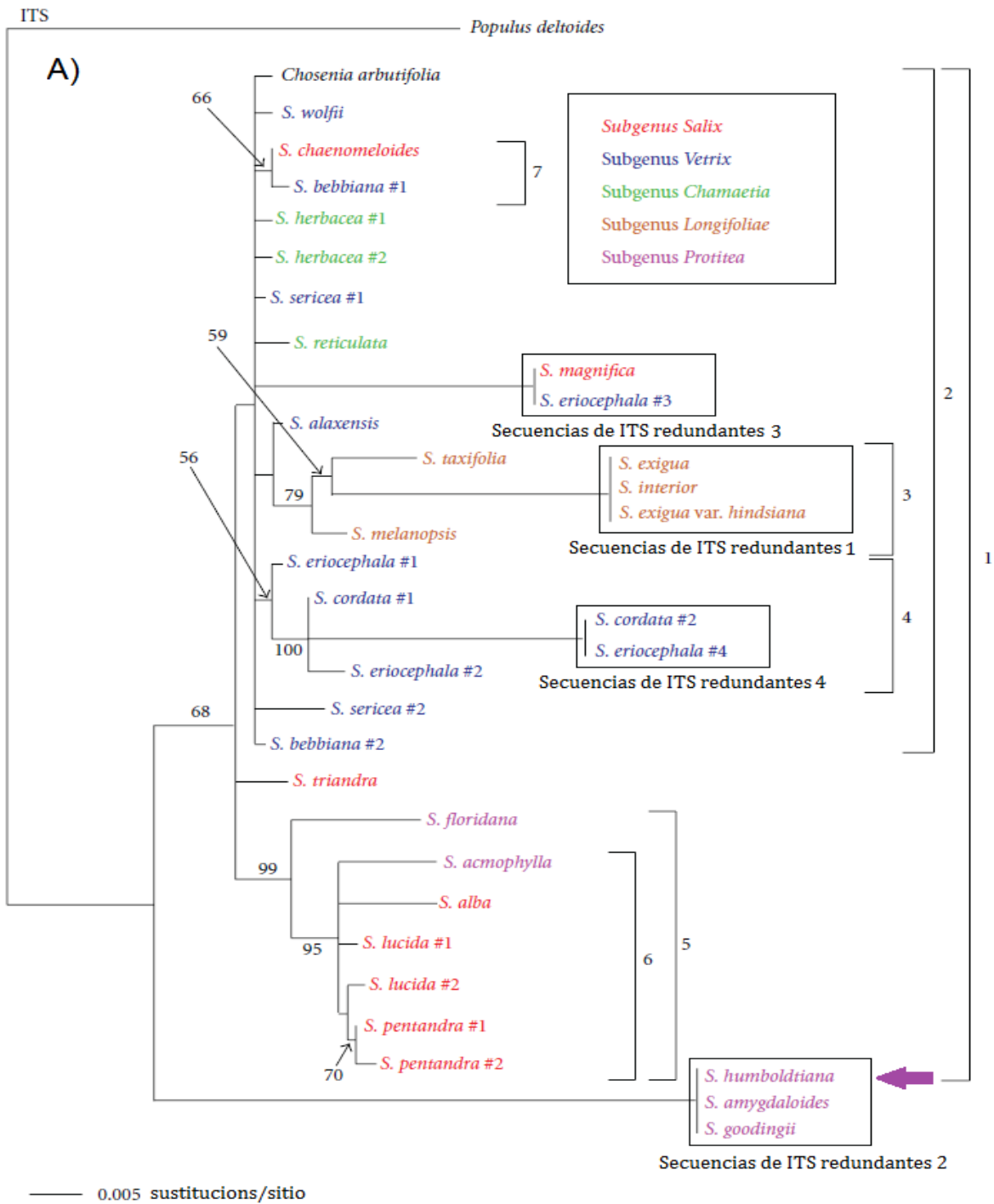


Figura 4. Filogenia basada en el análisis de secuencias de ITS utilizando máxima verosimilitud. Los números en las ramas se refieren a las probabilidades posteriores Bayesianas, sólo se muestran los valores mayores al 50%. Los colores corresponden a la clasificación de subgéneros propuesta por Argus (2010). Los cuadros representan a taxa con secuencias redundantes. La posición de *S. humboldtiana* dentro de la filogenia se encuentra señalada con una flecha. Tomado de Hardig *et al* 2010.

2.2.2 *Salix humboldtiana*

S. humboldtiana, mejor conocido como sauce criollo se caracteriza por estar conformado por árboles o arbustos perennifolios o caducifolios de 5 a 25m de altura. Presentan hojas simples y angostas con bordes aserrados y muy estrechos. Las flores se encuentran dispuestas en amentos laxos. Las flores masculinas son de color verde amarillento y contienen de 3 a 7 estambres, estas flores presentan un par de nectarios aunque algunas veces pueden presentar más. Por otro lado, las flores femeninas se forman en amentos más cortos y suelen ser verdes (Figura 5; Newsholme 2003).

S. humboldtiana, tiene varias adaptaciones morfológicas y fisiológicas para sobrevivir en ambientes riparios como son: la presencia de raíces adventicias utilizadas en la absorción de nutrientes y oxígeno, en la atenuación del escurrimiento y en el consiguiente aumento del



Figura 5. *Salix humboldtiana*. A: rama, B: detalle del amento femenino, C: flores femeninas, D: escama, E: rama turional, F: estípulas, G: detalle del peciolo con estípula, H: detalle nervadura de la cara adaxial de la hoja Tomado de (Méndez 2012).

nivel del suelo (Depetris *et al.* 1992); la capacidad de reordenar el sistema radicular y el follaje en respuesta a sedimentaciones a gran escala; la posibilidad de traslocar oxígeno desde el tronco a las raíces ubicadas en suelos que, después de inundados, se hacen anóxicos (Neiff 1986; Neiff *et al.*, 1985); y la gran capacidad de reproducirse vegetativamente a partir de ramas quebradas. Por otra parte, es notable la peculiaridad que presenta esta especie arbórea en su reproducción sexual, ya registrada por una serie de autores desde hace varias décadas (Burkart 1957; Franceschi y Lewis, 1979). Las semillas germinan alcanzando densidades de miles por metro cuadrado y producen plántulas que crecen rápida y uniformemente. Sin embargo, no es común encontrar bosques de *S. humboldtiana* dispersos a lo largo de toda la llanura aluvial (Liotta 2001). Esto debido a que la distribución de las poblaciones de sauce en la llanura aluvial está limitada por su nicho de generación (Grubb 1977), definido aquí como el conjunto de las condiciones necesarias para el establecimiento de plántulas. Estas condiciones sólo se encuentran en los bancos de arena o islotes de reciente formación, donde el sustrato húmedo y poco consolidado, con buena carga de nutrientes y alta disponibilidad de luz permiten el rápido crecimiento de las plántulas, con densidad suficiente de semillas (arrastradas por el agua y el viento; Neiff *et al.* 1985; Niiyama 1990). Debe tenerse en cuenta que la aparición de bancos adecuados para la colonización no es un fenómeno continuo. Por ejemplo, en un estudio realizado para poblaciones de *S. humboldtiana* en una zona de 212 km² del Paraná (Argentina) la formación de nuevos bancos con dichas características corresponde a sólo un 0.16% de la superficie total (Liotta 2001).

Esta especie se distribuye de manera natural desde el norte México hasta el sur de Argentina. En nuestro país, dentro de la vertiente del Golfo se localiza desde el sur de Nuevo León hasta Tabasco, Campeche y Chiapas; mientras que en la vertiente del Pacífico habita desde Durango hasta Oaxaca, en un rango de altitud muy variado siendo en general de los: 300 a 2,100 (2,500) msnm, aunque es posible encontrarla desde los 0 msnm (Figura 6).

Al ser una especie con fuerte asociación a ambientes riparios, es sensible a las sequías y a la contaminación ambiental (atmosférica y edáfica) así como al frío, ya que las heladas causan daños importantes a los tejidos (Batis *et al.* 1999). Como la mayoría de las especies de sauce con un habito arbóreo, *S. humboldtiana* tiene un genoma diploide con un número básico de cromosomas de 19 (Hunziker 1958).



Figura 6. Distribución de *S. humboldtiana* en México. Los puntos de referencia fueron obtenidos a partir de los sitios de colecta de la Red Mundial de Información sobre Biodiversidad 2012) y localización de las regiones hidrológicas consideradas en este estudio: Ameca: Naranja, Balsas: Verde, Lerma: Azul.

Como ya ha sido mencionado anteriormente, el género *Salix* presenta un alto número de especies híbridas. Se ha reportado la hibridación de *S. humboldtiana* con otras especies que han sido introducidas en Argentina desde Asia y Europa (Hunziker 1962). Debido a esto, es posible que esta especie pueda hibridar con otras con las que comparte áreas de distribución en México sin embargo, tal posibilidad no ha sido estudiada.

2.3 Justificación

La mayoría de los estudios filogeográficos en plantas se han enfocado en el efecto que tuvieron las glaciaciones del Pleistoceno sobre los cambios en la variación y distribución de las especies. Pocos se han enfocado en el estudio de las especies de plantas que conforman los ecosistemas riparios. Estas son un modelo interesante para realizar estudios filogeográficos ya que, debido a su dependencia de cuerpos de agua, tienden a presentar un patrón de hábitats dispersos, separados por grandes áreas inhabitables (por ejemplo: grandes planicies elevadas entre los valles de los ríos; Macaya-Sanz *et al.* 2012). Como

resultado, las poblaciones de las especies riparias tienden excepcionalmente al aislamiento y generalmente presentan una marcada estructura genética a nivel regional (Cottrell *et al.* 2005, Fussi *et al.* 2010, Kikuchi *et al.* 2011 Macaya- Sanz *et al.* 2012).

La historia biogeográfica de las regiones dulceacuícolas dentro de la Mesa Central es inherente a los cambios tectónicos, volcánicos y climáticos que han afectado la zona desde el Mioceno temprano (West 1964, Ferrari *et al.* 2000). Estos procesos de interconexión, captura, compartimentalización y aislamiento de cuerpos de agua han afectado las relaciones evolutivas y filogeográficas de diversas especies dulceacuícolas (Domínguez-Domínguez 2009). A pesar de ser una zona de gran interés evolutivo, la mayoría de los estudios filogeográficos en dicha región se han enfocado a vertebrados, principalmente a los peces de la familia Goodeidae (Pérez-Rodríguez *et al.* 2009, Domínguez -Domínguez 2009, Corona-Santiago 2013) y son pocos los que se han enfocado en las plantas de ecosistemas riparios.

A pesar de que el género *Salix* es un componente importante de este tipo de ecosistemas en México, existen pocos estudios relacionados con diversidad genética y flujo genético entre poblaciones de nuestro país. El estudio filogeográfico de *S.humboldtiana* puede ayudar a entender los procesos evolutivos que han afectado las cuencas y a otras especies riparias ya que, a diferencia de los peces dulceacuícolas, cuenta con mecanismos que permiten la migración de genes sin la existencia de una interconexión entre cuerpos de agua.

III. HIPÓTESIS

Dado que las poblaciones de *S. humboldtiana* se encuentran fuertemente asociadas a la presencia de cuerpos de agua, se espera que la estructura de las poblaciones se encuentre estrechamente relacionada con la distribución y los cambios geológicos y climáticos de las cuencas y las regiones hidrológicas. En particular, y considerando la historia de las cuencas, es posible que las poblaciones cercanas a cabeceras de cuencas compartan alelos que serían producto de migración. Principalmente, se espera que esto ocurra en la región occidental del área de estudio donde confluyen las tres regiones hidrológicas y debido a los cambios geológicos que ha sufrido la región el fenómeno de captura de cuencas es recurrente. Por otro lado se espera que al comparar entre regiones exista un aislamiento por distancia.

IV. OBJETIVOS

- Determinar si la estructura genética de las poblaciones de *S. humboldtiana* que se encuentran en las regiones hidrológicas de Ameca, Balsas y Lerma utilizando microsatélites nucleares y de cloroplasto se encuentra asociada a la estructura geográfica de las mismas.
- Determinar si dicha estructuración se encuentra dividida de manera jerárquica dentro de la región e inferir si hubo flujo génico entre regiones hidrológicas y cuencas.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Colecta de material y extracción de ADN

Se colectaron entre 6 y 19 individuos por localidad de *S. humboldtiana* en diferentes cuencas de las regiones hidrológicas del Ameca, Balsas y Lerma (Figura 7, Anexo 1). Las muestras fueron guardadas en bolsas de papel o Ziploc® y el material fue secado utilizando sílica gel. Se extrajo el ADN de 133 individuos utilizando el protocolo de extracción CTAB (Vázquez-Lobo 1996; Anexo 2).

Debido a la posible existencia de hibridación con otras especies y dado que esto podría afectar la estimación de la estructura y diversidad de la especie, se tomaron en cuenta las siguientes características para diferenciar a *S. humboldtiana* de *S. bonplandiana*, especie que comparte áreas de distribución con la primera.

1. Hojas con el envés verde, igual que el haz, lineares o linear-lanceoladas, frecuentemente falcadas, de (3) 5 a 14(16) cm de largo y de 5 a 15mm de ancho, con ápice largamente atenuado, base aguda, y margen serrulado.....*S. humboldtiana*.
2. Hojas con el envés glauco, lanceoladas o angostamente lanceoladas a elípticas. Últimas ramillas glabras o glabrescentes; hojas con el envés glabro, raramente piloso; pecíolos rojizos o verde-rojizos; inflorescencias axilares.....*S. bonplandiana*.
(Carranza 2005).

Cualquier individuo que presentara caracteres intermedios entre especies fue descartado de la muestra

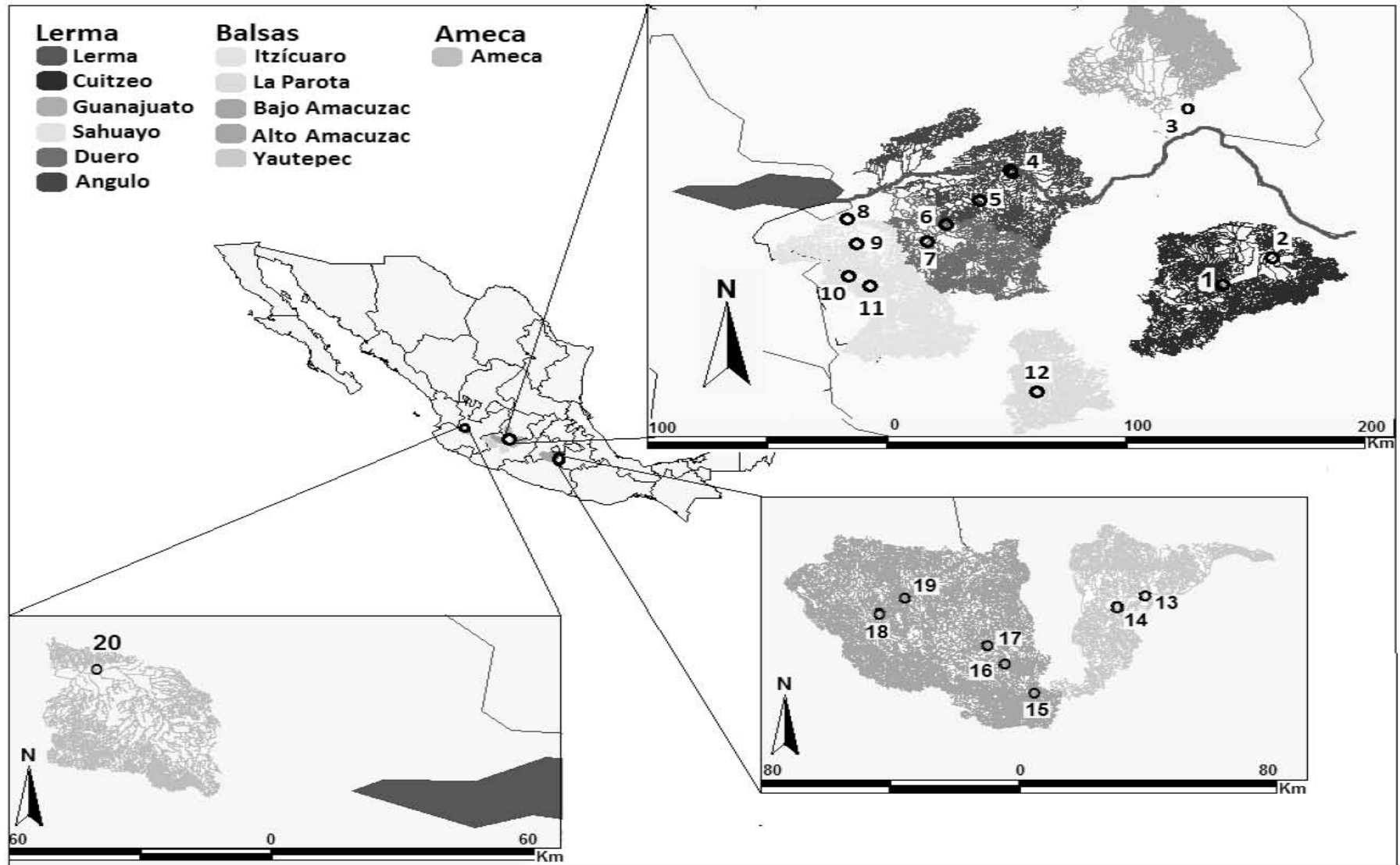


Figura 7. Ubicación de las 20 localidades colectadas para *Salix humboldtiana* y las regiones hidrológicas a las que pertenecen. Azul: región de Lerma, Verde: región Balsas, Naranja: región Ameca. Las diferentes tonalidades de colores muestran también el nombre de cada subcuenca, a que región pertenece y el número de corresponde al nombre de la localidad muestreada en dicha área (Anexo1).

5.2 Marcadores moleculares

Para analizar la estructura y diversidad genética de *S. humboldtiana* se probaron 16 pares de *primers* para amplificar microsatélites nucleares; estos fueron diseñados inicialmente para las especies de *Salix burjatica* (marcadores SB; Barker *et al.* 2003) y *Salix arbutifolia* (marcadores Cha; Hoshikawa *et al.* 2009). Adicionalmente se probaron los 10 marcadores para microsatélites (ccmp) de cloroplasto diseñados para dicotiledóneas (Weising y Gardner 1999; Anexo 3).

El programa de PCR utilizado para los marcadores Cha y ccmp2 de cloroplasto fue: una desnaturalización a 95°C por 5min, seguida de 30 ciclos a 95°C por 1min, luego entre 50 y 53 °C por un 1min y terminando con 72 °C por 1min; para los marcadores SB fue: una desnaturalización a 94°C por 5min, seguida de 35 ciclos a 94°C por 40seg, luego 53°C por 40seg y terminado con 72°C por 1 min. Luego de esto se realizó una extensión final a 72 °C por 8 min para los dos programas. Cada *primer* en dirección *forward* estaba marcado con un colorante fluorescente, esto permite analizar el tamaño del fragmento de diferentes loci simultáneamente. Los productos de PCR fueron enviados al servicio de análisis de fragmentos en el Roy. J. Carver Biotechnology Center en la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign donde se analizaron en un secuenciador automático ABI Prism 3730 xl (Applied Biosystems) para estimar el tamaño de los fragmentos utilizando un marcador de pares de bases Liz 500® (Applied Biosystems) como referencia. Los archivos resultantes se analizaron con el programa Peak Scanner v 1.0 (Applied Biosystems) para determinar el tamaño del producto. Una fracción de 40 individuos (5 individuos por localidad) fue analizada por duplicado para descartar errores de lectura.

Los alelos nulos son considerados como aquellas versiones alélicas que no generan un producto identificable (Hedrick 2005). Esto sucede cuando, debido a mutaciones en las regiones que flanquean al motivo, no se lleva a cabo la unión de los *primers* a dicha región y no se genera un producto de amplificación (Brookfield 1996, Allendorf y Luikart 2007), lo que genera que los heterocigotos con un alelo nulo sean genotipados como homocigotos. Para calcular la frecuencia de dichos alelos nulos dentro de la muestra se utilizó el programa FreeNa v 1 (Chapuis y Estoup 2007)

5.3 Identificación de clones

Debido a que el género *Salix* tiene como forma de dispersión secundaria la propagación a través de esquejes, fue necesario determinar que individuos eran clonales dentro de cada población. La identificación de los genotipos (“clones”) es especialmente importante en estudios con organismos que se reproducen partenogenéticamente o con reproducción vegetativa. En estos casos, diferentes individuos (algunas veces referidos como *rametos*) pueden tener un genotipo multilocus idéntico (referidos como *genetos*) y son considerados clones. Para esto se utilizó el programa GenoDive v 2.0b23 (Meirmans y Van Tienderen 2004), que emplea un algoritmo para asignar una identidad genotípica a cada individuo. El algoritmo de asignación de clones trabaja, en un principio, calculando una matriz de distancias genéticas entre individuos, utilizando una medida de distancia que supone reproducción asexual. Esto se puede lograr por medio de dos modelos evolutivos diferentes: el modelo de alelos infinitos o el modelo mutacional paso a paso (Meirmans y Van Tienderen 2004). Debido a que los marcadores utilizados para este estudio son microsatélites se utilizó este último. En este modelo se supone que los alelos que difieren en sólo unas pocas repeticiones en longitud tienen una ancestría más reciente que los alelos que difieren en muchas repeticiones (Slatkin 1995, Goldstein *et al.* 1995). A partir de la matriz generada, los individuos son asignados a clones utilizando un umbral de distancias. Dicho umbral indica la distancia máxima que está permitida para que dos individuos sean considerados clones con el mismo genotipo (Rogstad *et al.* 2002, Meirmans y Van Tienderen 2004). El valor de incertidumbre elegido fue de 1, indicando que sólo fueron considerados como individuos clonales aquéllos con genotipos idénticos. De aquellos individuos con genotipos idénticos (24 individuos) solo se eligió uno al azar y los demás fueron descartados de los análisis posteriores.

5.4 Delimitación de grupos genéticos

Se define como estructura genética a la cantidad y distribución de la variación genética dentro y entre poblaciones de una determinada especie (Hedrick 2005). Ésta depende de diversos factores como la historia natural de las poblaciones, la subdivisión de la población o el flujo génico entre las mismas (Gillespie 2004). El género *Salix* presenta diversos mecanismos de dispersión, los cuales varían en distancia dependiendo de la estructura que

se dispersa (polen, semilla o propágulo vegetativo), para definir los grupos genéticos se realizó una partición de la población global definida con base en el genotipo de cada individuo (*i.e. a posteriori*) en lugar de la localidad en donde fue muestreado.

Existen diversos algoritmos que, tomando en cuenta el genotipo, infieren grupos genéticos de individuos más relacionados entre sí, los cuales pueden ser considerados poblaciones. En este trabajo se utilizaron dos: (i) el implementado en Geneland y (ii) el implementado en Structure.

Geneland (Guillot *et al.* 2005, Guillot *et al.* 2009) permite inferir el número de poblaciones presentes en una determinada área utilizando inferencias Bayesianas y por medio de simulaciones de cadenas de Markov de Monte Carlo (MCMC, por sus siglas en inglés). El programa infiere discontinuidades genéticas haciendo uso tanto de las coordenadas geográficas como del genotipo multilocus de cada individuo (Guillot 2009). Geneland genera mapas mediante la creación de polígonos de Voronoi construidos a partir de la ubicación geográfica de cada individuo. Así, la delimitación de las poblaciones a partir de la unión de estos polígonos depende directamente de la probabilidad de cada individuo a pertenecer a una población u otra. Para la asignación de cada individuo a una población, Guillot *et al.* (2005b) sugieren inferir el valor de K (grupos genéticos) explorando entre diferentes posibilidades y después fijar el valor escogido tomando en cuenta la mayor probabilidad de pertenencia de cada individuo a un grupo.

La incertidumbre en la ubicación de los rametos muestreados incrementa significativamente el error al detectar límites entre grupos genéticos (Guillot *et al.* 2005). Sin embargo, el programa permite contemplar un valor de incertidumbre asociado a las coordenadas geográficas de los individuos. Se eligió un valor de incertidumbre de 20 km, ya que este valor se ha reportado como la dispersión media de clones para el género (Slavov *et al.* 2004, Budde *et al.* 2011).

Primero se realizaron 30 corridas independientes de Geneland con un valor de K entre 1 y 12, tomando en cuenta las subcuencas muestreadas, suponiendo la existencia de alelos nulos y utilizando el valor de incertidumbre antes mencionado. Después, se exploró con valores de K de entre 5 y 9 con los siguientes parámetros: un *burn in* de 100,000 cadenas, seguido de 1.0×10^6 iteraciones MCMC en 60 corridas independientes. Se utilizó el modelo de mezcla con frecuencias alélicas correlacionadas. Se calculó la media del logaritmo de la

probabilidad posterior de cada corrida independiente y se eligieron las diez que presentaron los valores más altos.

Otra forma de inferir la estructura poblacional, es asignar individuos a las poblaciones e identificar migrantes e individuos con ancestría mixta por medio del programa Structure (Pritchard *et al.* 2000). Este supone la agrupación de individuos basándose en las frecuencias alélicas de todos los loci; después, el programa va asignando los individuos probabilísticamente a cada población o grupo genético. Es decir, supone un modelo en el cual existe un número K de poblaciones (donde K puede ser desconocido), cada una de las cuales está caracterizada por un conjunto de frecuencias alélicas en cada locus. Los individuos en la muestra son luego asignados a las poblaciones según su genotipo, o conjuntamente a dos o más poblaciones si este indica que hubo migración o introgresión. Este algoritmo presupone que dentro de las poblaciones los loci se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg y en equilibrio de ligamiento (Pritchard *et al.* 2000).

Los análisis se realizaron con 50 corridas independientes de 12 estimados probabilísticos diferentes considerando valores de K entre 1 y 12, utilizando el modelo de *admixia* con frecuencias alélicas correlacionadas entre poblaciones. Se eligieron los siguientes parámetros: *burnin* de 100, 000 iteraciones, seguidas de un millón de cadenas MCMC. El valor más probable de K , resultado del análisis en Structure, fue determinado utilizando el método propuesto por Evanno *et al.* (2005) e implementado en el programa *Structure Harvester* 0.3 (Earl *et al.* 2012). En lugar de utilizar el logaritmo de la probabilidad de los datos para cada valor de K , este método utiliza un estadístico *ad hoc*, ΔK , que se basa en la diferencia del cambio en la probabilidad posterior entre cada valor sucesivo de K . Luego, con el programa Clump v 1.1.2 (Jakobsson y Rosenberg 2007) se determinó la asignación de los individuos a cada grupo genético, para finalmente graficar los resultado con el programa Distruct v.1.1 (Rosenberg 2004).

Debido a que se utilizaron algunos microsatélites compuestos (SB 201, SB 233 y Cha 580) con dos repeticiones de dinucleótidos diferentes (Anexo 3), en los cuales puede haber homoplasia, se realizó una corrida de Structure con los mismos parámetros y eliminando estos tres marcadores para verificar si los resultados eran consistentes con los de Structure y Geneland utilizando todos los loci.

Para los datos de cloroplasto, se realizó el análisis de definición de grupos genéticos utilizando el programa Structure. Esto sólo para comparación con los datos nucleares, ya que este locus fue poco informativo (ver Resultados).

5.4.1 Estructura genética

La diferenciación genética puede ser calculada de diferentes maneras dependiendo del modelo de mutación presupuesto. El índice de F_{ST} (Wright 1951), también llamado índice de fijación, es la medida de diferenciación genética que compara a las subpoblaciones con la población total y permite medir el grado de divergencia entre las frecuencias alélicas de las subpoblaciones suponiendo un modelo mutacional de alelos infinitos. (Hedrick 2005). Como consecuencia, este modelo supone que no existe homoplasia y que los alelos idénticos comparten la misma ancestría (Kimura y Crow 1964).

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

donde H_T es la heterocigosidad esperada en el total de la población y H_S es la heterocigosidad esperada dentro de las subpoblaciones

Por otro lado, el estimador R_{ST} propuesto por Slatkin (1995) utiliza un modelo generalizado de mutación paso a paso (SMM), el cual se basa en la proporción de diferencias que existen entre los alelos; por esta razón es más adecuado para estimaciones con datos de microsatélites. Bajo este modelo, cada mutación crea un nuevo alelo añadiendo o eliminando una unidad de repetición del microsatélite con la misma probabilidad: $u/2$. Como resultado, los alelos que difieran mucho en tamaño se encontrarán menos relacionados entre sí que aquellos con tamaños similares (Slatkin 1995, Balloux *et al.* 2002).

$$R_{ST} = \frac{S - S_w}{S}$$

donde S_w es la varianza promedio del tamaño de alelos en cada población y S es la varianza estimada del tamaño de alelo en todas las poblaciones

Los estadísticos R se basan en este modelo, sin embargo, ninguno de los modelos parece ajustarse perfectamente a todos los loci, por lo que es común que se reporten ambos

estimadores de diferenciación F_{ST} y R_{ST} cuando se trabaja con microsatélites o una combinación de ambos (Lugon-Moulin *et al.* 1999). Para calcular los índices F_{ST} y R_{ST} entre pares de grupos genéticos se utilizó el programa Arlequin v 3.5.1.2 (Excoffier *et al.* 2005) con 10000 permutaciones y una probabilidad (p) de 0.05. Adicionalmente, con el programa FreeNa se estimó la F_{ST} de Weir (1996) mediante el método ENA (Excluding Null Alleles; Chapuis y Estoup 2007), el cual permite corregir cualquier efecto generado por la presencia de alelos nulos.

5.4.2 *Análisis de Varianza Molecular*

Para evaluar la estructura genética se utilizó un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.* 1992, Harlt y Clark 2007 y Clarck 1997). Este análisis evalúa la cantidad de estructura genética en diferentes niveles jerárquicos de agrupación y utiliza métodos permutacionales basados en las diferencias entre sumas de cuadrados de pares de observaciones, generando una matriz de distancias cuadráticas de varianza molecular a diferentes niveles jerárquicos de agrupación (diferencias entre poblaciones y entre los individuos). Este análisis se realizó en el programa Arlequin v 3.5.1.2 (Excoffier *et al.* 2005). Los grupos que se utilizaron para realizar este análisis fueron los obtenidos a partir de Geneland y Structure.

5.5 *Índices de diversidad genética en grupos genéticos*

Para calcular los índices de diversidad genética se tomaron en cuenta los grupos genéticos obtenidos a través de Geneland. Este método, al realizar la asignación de individuos no sólo por su similitud genética sino también por su ubicación geográfica, tiende a adecuarse mejor al contexto biológico de la especie, ya que es más probable que las poblaciones se estructuren o migren entre cuencas cercanas que entre cuencas lejanas. La identificación del número total de alelos de cada grupo y los alelos privados para cada población fueron estimados con el programa GenAIEx v 6.5 (Peakall y Smouse 2006).

El desequilibrio de ligamiento consiste en la asociación no aleatoria entre los alelos de diferentes pares de loci (Hedrick 2000). Para determinar si algún par de loci presentaba desequilibrio de ligamiento se utilizó una prueba exacta de Fisher con el programa Genepop

versión 4.07 (Rousset 2008) que aplica el método de Montecarlo basado en cadenas de Markov (MCMC por sus siglas en inglés). Los parámetros ingresados en dicho programa fueron 10,000 desmemorizaciones, 200 lotes (*batches*) y 1000 iteraciones. Todo esto bajo la hipótesis nula de que los genotipos son independientes uno del otro, con una significancia (q) de 0.001. Se utilizó la prueba de FDR (False Discovery Rate por sus siglas en inglés) para determinar la significancia de cada prueba con comparaciones múltiples. Esta prueba es más efectiva para rechazar errores tipo I que la corrección secuencial de Bonferroni (Verhoeven *et al.* 2005). El valor de q corresponde al valor de p recalculado con la prueba FDR. Se utilizó el programa QVALUE versión 1.0 (Storey 2002) para calcular los valores de q .

Con el programa Genepop v 4.07 (Rousset 2008) también se estimó la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg en los siete loci para cada uno de los grupos genéticos obtenidos en Geneland. Para determinar si el desequilibrio era debido a un exceso o deficiencia de heterocigotos, se realizó la prueba de Raymond y Rousset (1995) para cada locus por población a partir de un método de cadenas de Markov. Con este mismo análisis se calcularon, para cada locus por población, los coeficientes de endogamia F_{IS} (Weir y Cockerham 1984). Este coeficiente se define como la probabilidad de que dos alelos en un individuo sean idénticos por estado; un valor positivo indica una deficiencia de heterocigotos y un valor negativo indica un exceso (Harlt y Clark 2007, Hedrick 2005). Los parámetros utilizados fueron los siguientes: 10,000 dememorizaciones, 200 lotes (*batches*) y 1000 iteraciones con una q menor a 0.005. La heterocigosis observada (H_O) y esperada (H_E) fueron calculadas utilizando el programa Arlequin v 3.5.1.2 (Excoffier *et al.* 2005).

Para determinar si el muestreo de cada grupo representaba adecuadamente la diversidad contenida en la población se realizaron curvas de rarefacción para cada uno de los grupos genéticos obtenidos en Geneland. En dichas curvas se tomaron en cuenta la cantidad de alelos encontrados por locus para cada grupo genético. Esto se realizó para ver si los índices de diversidad eran producto de las fuerzas evolutivas o simplemente el resultado de un muestreo deficiente. Para realizar las curvas se utilizó el programa Diversity v 1.6.1 (Hunt Mountain software).

5.6 Determinación de parentesco entre individuos

La capacidad de inferir las relaciones genealógicas (parentesco) entre individuos de una población es una herramienta importante con amplias aplicaciones en los estudios evolutivos y de conservación (Blouin 2003). Los métodos para el análisis de parentesco se pueden dividir en dos grandes categorías: (i) métodos cuantitativos de conectividad, que analizan la probabilidad de que dos individuos se encuentren relacionados con respecto a la identidad por descendencia de sus alelos y (ii) métodos cualitativos de relación, que clasifican a los individuos por categorías en una genealogía (progenitor- descendiente, hermanos, medios hermanos, etc.; Marshall *et al* 1998, Blouin 2003). El programa ML-RELATE (Kalinowski *et al.* 2006), el cual usa pruebas de máxima verosimilitud y ofrece ambos tipos de resultado de conectividad y de relación, se utilizó para estimar la relación de parentesco entre los individuos dentro de cada población y dentro de cada región hidrológica.

5.7 Migración y aislamiento por distancia

Para determinar si existe una relación entre la estructuración genética y la distancia geográfica se realizó una prueba de Mantel con el programa XLSTAT 2013 (Addinsoft 2007). Esta correlaciona la distancia geográfica con los valores pareados de diferentes estimadores de diversidad. Para realizar esta prueba se utilizó el logaritmo natural de la distancia geográfica y los valores pareados de los dos estimados de diferenciación genética: F_{ST} , R_{ST} .

Para calcular el flujo génico se utilizó el programa Migrate (Beeril y Felsestein 2001), el cual se basa en la teoría de coalescencia para calcular tasas de migración asimétricas entre poblaciones que tienen tamaños efectivos diferentes (N_e). El programa genera diferentes analogías probables con diferentes longitudes de ramas utilizando iteraciones MCMC, para así poder calcular simultáneamente la tasa de migración (M) entre diferentes poblaciones y el tamaño efectivo (Θ) de cada una de ellas. El valor de M indica qué tan importante es la migración sobre la mutación para originar nuevas variantes en cada grupo. Si M es mayor a 1 se infiere que la migración contribuye más que la mutación a la variación genética total.

Una de las ventajas de Migrate es que permite detectar si existe flujo génico asimétrico entre poblaciones y diferencias entre tamaños poblacionales utilizando un modelo completo con n tamaños poblacionales y $n(n-1)$ tasas de migración. Es posible también explorar diferentes

escenarios de migración si se tiene alguna noción de la dirección del flujo genético o del tamaño poblacional. Esto se logra utilizando una matriz de migración–conexión (Figura 8).

Para simplificar el modelo, los escenarios de migración se calcularon únicamente entre los grupos genéticos obtenidos con Structure, ya que las cadenas de MCMC tomando en cuenta las ocho poblaciones obtenidas por Geneland no convergieron dados los pocos datos disponibles para realizar el análisis a esta escala.

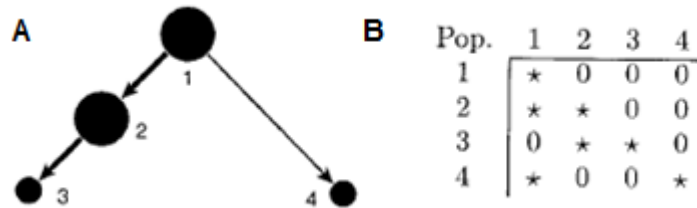


Figura 8. Complejo de poblaciones fuente-receptor. (A) Las flechas indican la dirección de la migración y el tamaño de los círculos es proporcional al tamaño de las poblaciones. (B) Matriz de conexión correspondiente utilizada en MIGRATE. La matriz contiene las especificaciones para Θ en la diagonal y fuera de esta las especificaciones para M . * Indica que este parámetro será estimado sin restricciones y 0 que no existe flujo genético entre dichas poblaciones (tomado de Beerli y Felsenstein 2001).

Los parámetros finales fueron elegidos después de explorar diferentes resultados preliminares: un modelo de mutación browniano para microsatélites, una estrategia de análisis con inferencia bayesiana, un *burnin* de 10,000 iteraciones seguido de una cadena de 50,000 iteraciones con muestreos cada 100 generaciones. Se utilizaron cuatro cadenas calientes con temperaturas de 1.0, 1.5, 3.0 y 1.0×10^6 , respectivamente. Los demás parámetros fueron los que venían pre-establecidos en el programa. Para generar los escenarios de migración se tomaron en cuenta los siguientes eventos de conexión: la conexión entre el lago de Chapala y el río Ameca a través de los lagos de San Marcos, Zacoalco y Atotonilco (Miller y Smith 1986) al principio del Pleistoceno (Dominguez-Dominguez *et al.* 2008), la captura de tributarios del Lerma por parte del Balsas como son las cuencas de Tuxpan, Cupatitzio y Ario de Rosales 1Ma-700 000 años (Álvarez 1972, Corona-Santiago 2013), y la formación del lago de San Juanico por el taponamiento de un tributario del lago de Chapala cuando en el Pleistoceno (Álvarez 1963, Tamayo y West 1964; Figura 3). Asimismo, se tomó en cuenta la direccionalidad del flujo genético en sistemas riparios: preferentemente río abajo (Karrenberg *et al.* 2003). De acuerdo a esto, los escenarios de

migración elegidos fueron: 1) todos los grupos tienen migración entre sí; 2) solo hay migración entre Lerma y Ameca; 3) migración entre Ameca y Balsas; 4) hay Migración entre Lerma y Ameca, y entre Ameca y Balsas; 5) solo existe migración entre Lerma y Balsas (Figura 9). Se tomaron los mismos parámetros para todos los modelos. Para comparar los modelos y elegir el más probable se usó el logaritmo del Factor Bayes (LBF). El factor Bayes es proporcional a la verosimilitud marginal (mL) y permite la comparación de modelos con o sin anidar, sin la necesidad de presuponer la normalidad de los datos o tener un muestreo amplio. En comparación con la máxima verosimilitud, la mL es la integral de la función de verosimilitud sobre un rango completo de parámetros (Beerli y Palczewski 2010). Para poder calcular la probabilidad de cada escenario de migración primero se eligió un modelo de migración basado en la mayor probabilidad y el criterio de Kass y Raftery (1995) utilizando las siguientes formulas:

$$LBF = 2 \ln (mL (\text{modelo}_1)) - \ln (mL(\text{modelo}_2)).$$

$$\text{Prob}(\text{modelo } i) = \frac{mL \text{ modelo } i}{\sum_j^n mL \text{ modelo } j}$$

*LBF (Logaritmo del factor bayes)

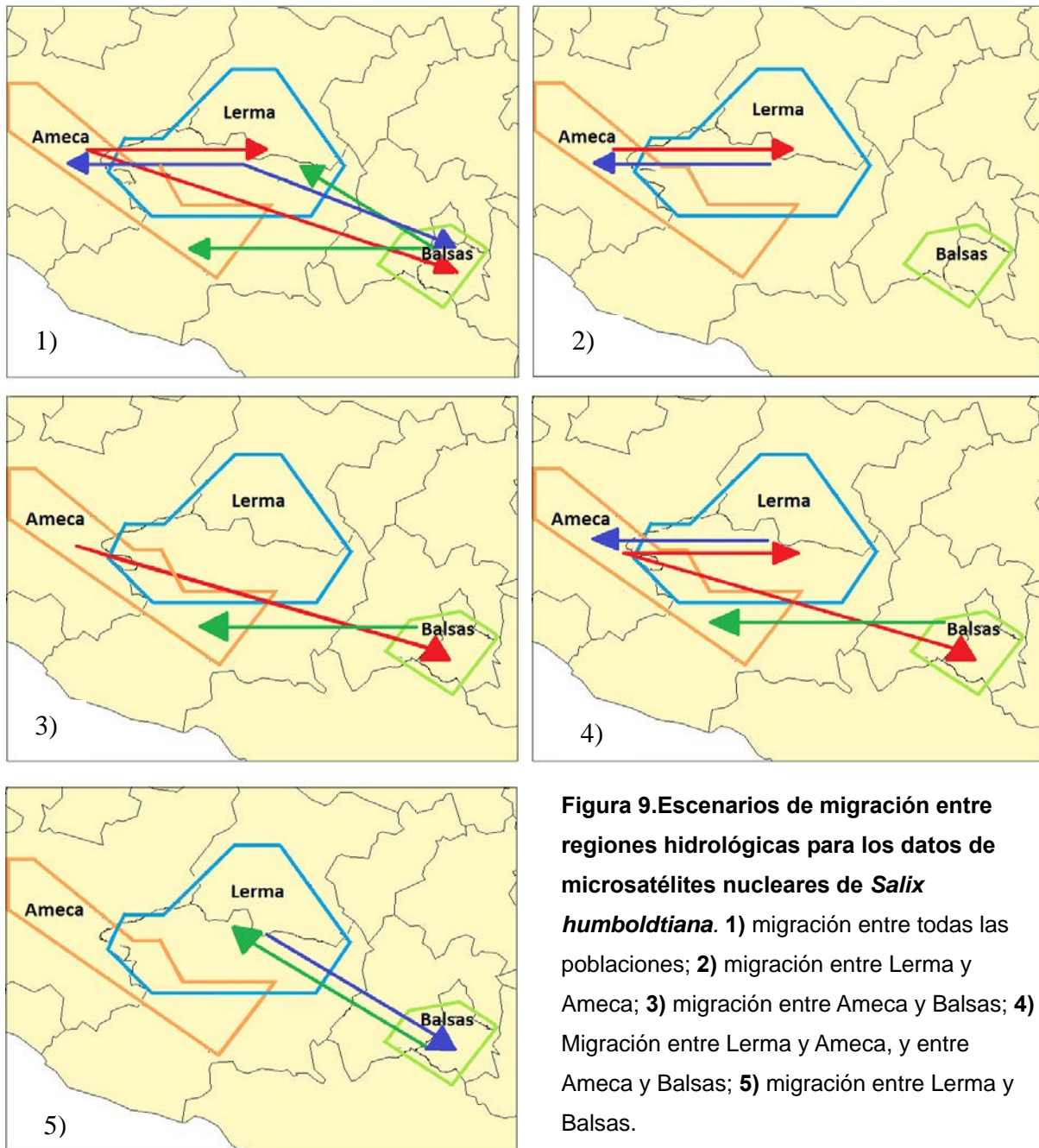


Figura 9. Escenarios de migración entre regiones hidrológicas para los datos de microsatélites nucleares de *Salix humboldtiana*. 1) migración entre todas las poblaciones; 2) migración entre Lerma y Ameca; 3) migración entre Ameca y Balsas; 4) Migración entre Lerma y Ameca, y entre Ameca y Balsas; 5) migración entre Lerma y Balsas.

VI. RESULTADOS

De los dieciséis microsatélites nucleares y los diez loci de cloroplasto que se probaron, sólo siete y uno resultaron ser polimórficos, respectivamente (Anexo 3). En total fueron caracterizados genéticamente 132 individuos pertenecientes a 20 localidades dentro de las tres regiones hidrológicas. Dentro de estos, 108 individuos tuvieron genotipos únicos y los otros 24 se repartieron en 9 genotipos clonales. Cada genotipo clonal se encuentra restringido a una cuenca en particular. La localidad con más individuos clonales fue la de Queréndaro (5), seguida de Sahuayo (3). Las localidades de Charo, Cotija, Penjamo, Tocumbo, Zamora y Jiquilpan no presentaron clones. La distribución de estos clones, así como el genotipo clonal, se muestran en el Anexo 4. De estos individuos sólo se retuvo uno por genotipo para realizar los análisis posteriores.

6. 1 Delimitación de grupos genéticos

En el 90% de las corridas con Geneland se obtuvo un total de 9 grupos genéticos. Sin embargo, al observar que algunos individuos tenían una probabilidad de asignación menor a 0.5, se eligió una K de 8, en donde la mayoría de los individuos mostraron altas probabilidades de asignación ($p < 0.6$). La división de estos grupos se encuentra asociada a la estructura de las cuencas que conforman cada región hidrológica (Figura 7 y 10). Sin embargo, el grupo genético Sahuayo-Itzicuario está conformado por individuos de distintas localidades que pertenecen a cuencas y regiones hidrológicas diferentes (Balsas, Río Itzicuario) y Jiquilpan (Lerma, Río Sahuayo).

Al realizar el análisis de los siete loci nucleares con Structure se obtuvieron tres grupos genéticos que se nombraron como las tres regiones hidrológicas a las que corresponden (Ameca, Balsas y Lerma; Figura 10, Anexo 5). También, se muestra que las localidades más al norte de la región del Balsas, pertenecientes a la cuenca del Río Itzicuario (Cotija, Tocumbo), tienen varios individuos con genotipos mezclados. Estos individuos se asocian a dos regiones hidrológicas: Lerma y Ameca.

Adicionalmente la estructuración dada para los alelos del locus de cloroplasto *ccmp2* y del análisis retirando los loci con microsatelites compuestos mostraron la formación de dos grandes grupos: Lerma y Ameca-Balsas (Figura 11, Anexo 5).

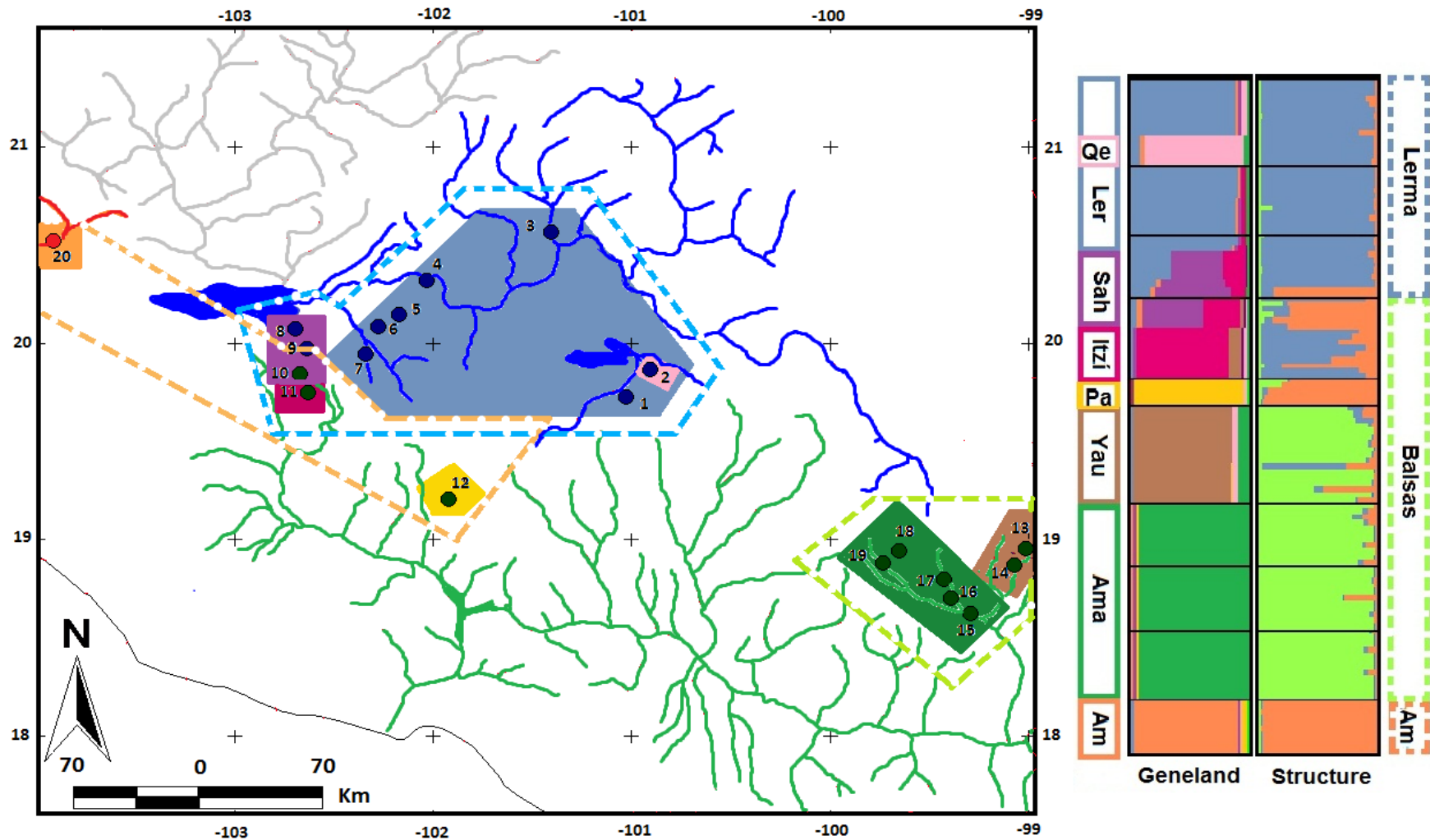


Figura 10. Estructuración de la variación genética en *Salix humboldtiana*. Del lado izquierdo se observa la gráfica de probabilidad de asignación de cada individuo a un grupo genético a partir de siete microsatélites nucleares en 20 localidades distribuidas en tres regiones hidrológicas del Centro de México: Ameca, Balsas y Lerma. En el mapa se representan dichos grupos y las localidades. El color de los puntos indica la pertenencia de dicha localidad a cada región. Los polígonos en color sólido indican los grupos genéticos obtenidos a partir de Geneland ($K=8$) y los de líneas punteadas los encontrados con Structure ($K=3$). **Ler:** Lerma; **Qe:** Querendaro; **Sah:** Sahuayo-Itzúcaro; **Itz:** Itzúcaro; **Pa:** Parota; **Yau:** Yautepec; **Ama:** Amacuzac; **Am:** Ameca

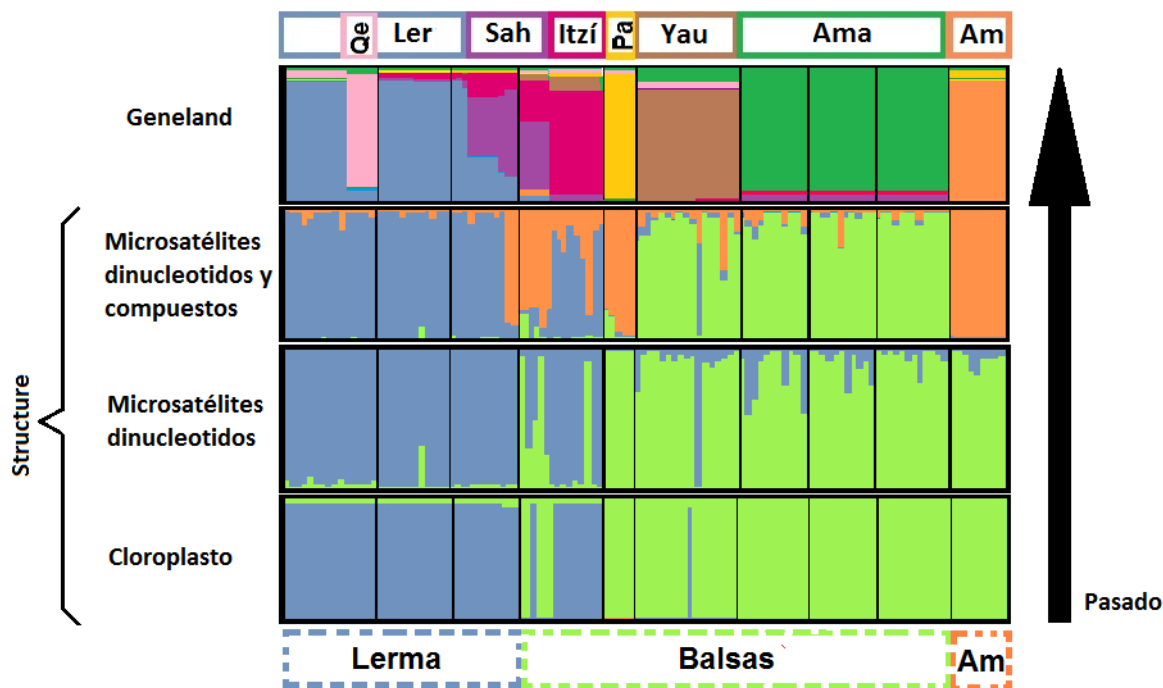


Figura 11. Probabilidad de asignación de cada individuo de *Salix humboldtiana* utilizando los diferentes tipos de microsatélites. Cloroplasto: utilizando el locus *ccmp2*; **Microsatélites dinucleotidos:** Cha 475, Cha 528, Cha 591 y Cha623 ; **Microsatélites compuestos:** Sb201, Sb233 y Cha 580. El análisis de Geneland sólo se realizó utilizando los 7 microsatélites.

En el análisis de parentesco al interior de cada grupo genético se observó que la mayoría los individuos resultaron no estar relacionados (80.92%; Cuadro 1). Sin embargo, un porcentaje significativo de individuos fueron hermanos (10.73%) y medios hermanos (5.39%). Este tipo de relaciones de parentesco fueron los más frecuentes en todos los grupos genéticos, a excepción del grupo La Parota donde la relación padre-hijo se presentó en el 10% de los casos.

6. 1.1 Estructuración genética

El estimado de R_{ST} , que es mejor para estimar diferenciación en microsatélites, mostró una estructuración de 0.432 cuando se calculó para las poblaciones delimitadas a través de Geneland (estructuración por cuencas; Cuadro 2). Por otra parte, los resultados de F_{ST} muestran también una estructuración significativa (0.223) cuando se utilizan los grupos genéticos de Geneland.

Cuadro 1. Relaciones de parentesco para las poblaciones de *Salix humboldtiana*. Las relaciones se realizaron dentro de cada población utilizando sólo los loci nucleares. Los resultados están presentados como el porcentaje de individuos que presento dicha relación dentro de cada población. **Ler:** Lerma; **Qe:** Querendaro; **Sah:** Sahuayo-Itzícuaru; **Itzí:** Itzícuaru; **Pa:** Parota; **Yau:** Yautepec; **Ama:** Amacuzac; **Am:** Ameca.

Parentesco	Ler	Qe	Sah	Itzí	Pa	Yau	Ama	Am
Sin relación	84.05%	73.33%	80.77%	86.11%	90%	78.68%	73.97%	81.5%
Padre-hijo	2.53%	0	5.13%	0	10%	2.20%	5.52%	5.55%
Medios Hermanos	9.057%	0	3.85%	2.77%	0	4.41%	10.34%	5.55%
Hermanos	4.34%	26.6%	10.26%	11.11%	0	14.70%	10.15%	8.33%

Cuadro 2. Diferenciación genética de grupos genéticos (Geneland). Diferenciación genética obtenida a partir de los alelos de 7 microsátélites nucleares en 8 poblaciones de la especie *Salix humboldtiana*. Arriba de la diagonal se muestran los valores de F_{ST} y por debajo los de R_{ST} .

$R_{ST} \setminus F_{ST}$	Ler	Qe	Sah	Itzí	Pa	Yau	Ama	Am
Ler		0.112	0.132	0.082 ^{ns}	0.401	0.219	0.325	0.231
Qe	0.070 ^{ns}		0.240	0.201	0.568	0.284	0.417	0.250
Sah	0.521	0.648		0.127	0.407	0.309	0.386	0.249
Itzí	0.278	0.375	0.131		0.366	0.210	0.276	0.195
Pa	0.561	0.535	0.332	0.281		0.487	0.465	0.400
Yau	0.387	0.224	0.390	0.300	0.097 ^{ns}		0.132	0.302
Ama	0.800	0.780	0.753	0.735	0.474	0.360		0.380
Am	0.345	0.476	0.339	0.146	0.506	0.433	0.812	

p<0.05, ns: no significativo

6.1.2 Análisis de Varianza Molecular

El AMOVA se realizó tomando en cuenta tanto la estructuración obtenida a partir de Geneland (cuencas), como la de Structure (regiones hidrológicas). Para ambas comparaciones se utilizó el estimado de R_{ST} . Para los grupos genéticos obtenidos a partir de Geneland, el valor más elevado de variación se obtuvo al comparar entre los grupos

genéticos (58.69%) y en segundo lugar al comparar los individuos de la muestra (29.14%; Cuadro 3). Lo mismo sucedió al utilizar los grupos genéticos producidos a partir de Structure (variación entre grupos: 52.62%), sin embargo la varianza que existe entre los individuos dentro de los grupos genéticos (21.74%) aumenta y se acerca a la varianza entre los individuos (25.65%). Estos resultados indican que podría haber dos niveles jerárquicos de estructuración, uno global mostrado en Structure y uno local que se observa en Geneland.

Cuadro 3. Índices de fijación y porcentajes de variación del AMOVA tomando en cuenta diferentes niveles de estructuración: por cuencas y por regiones.

	Geneland		Structure	
	R_{ST}	gI	R_{ST}	gI
Entre las poblaciones	58.69	7	52.62	2
Entre individuos dentro de los grupos genéticos	12.17	109	21.74	114
Todos los individuos entre si	29.14	117	25.65	117
F_{IS}	0.295		0.459	
F_{ST}	0.587		0.526	
F_{IT}	0.709		0.744	

Todos los valores son significativos $P < 0.05$

6.2 Diversidad genética

La diversidad total para todas las localidades muestreadas fue de 79 alelos para los siete loci de microsatélite nucleares y de tres alelos para el locus de cloroplasto. Para los microsatélites nucleares los grupos Lerma (47 alelos), Sahuayo-Itzícuaró (36 alelos), Itzícuaró (31 alelos) y Amacuzac (33 alelos) fueron los que presentaron una mayor diversidad. En total se encontraron 28 alelos privados distribuidos mayoritariamente en el Lerma (8 alelos), San Alejo (7 alelos) y Yautepec (5 alelos) (ver Anexo 6). Los valores globales de heterocigosis observada (H_O) fueron de 0.508 y para la heterocigosis esperada (H_E) de 0.728. En el Cuadro 4 se muestran los índices desglosados para cada población. Se detectaron alelos nulos en algunas poblaciones (Anexo 7a). La población que presentó mayor frecuencia de dichos alelos fue la de Yautepec en los loci Cha528 (0.1468), Cha475 (0.3286), SB 201 (0.2488) y SB233 (0.3268). Los estimados de F_{ST} calculados según Weir y Cockerham (1984) y los estimados con la corrección ENA no difirieron significativamente cuando se retiraron los alelos nulos (Anexo 7a; valores de t de Student $T = 0.248$, d.f. 12, $p =$

0.404), por lo que su presencia parece no haber afectado los estimados de estructura genética.

La mayoría de las poblaciones se encontraron en equilibrio Hardy-Weinberg, aunque Yautepec y Lombardía presentaron valores de F_{IS} muy elevados debido a una deficiencia de heterocigos. Por otro lado, la población de Amacuzac mostró una deficiencia de heterocigos al tomar en cuenta el promedio de todos los loci nucleares (Anexo 7a). Al comparar los pares de loci, la mayoría de estos estuvieron en equilibrio de ligamiento (Anexo 7b).

Cuadro 4. Índices de diversidad genética para cada población de *Salix humboldtiana* calculados con siete microsatélites nucleares polimórficos. La división de las poblaciones es la obtenida a partir de Geneland que corresponde a las cuencas hidrológicas. Los colores corresponden a los de la Figura 8. N número de individuos por población, N_a número de alelos, P_a número de alelos privados H_E : heterocigosis esperada; H_o : heterocigosis observada; F_{IS} índice de endogamia

	N	N_a	P_a	H_E	H_o	F_{IS}
Lerma	24	47	8	0.711	0.679	-0.148 ^{HW}
Queréndaro	6	21	1	0.670	0.777	-0.601 ^{HW}
R. Sahuayo/ R. Itzicuario	13	38	2	0.719	0.637	-0.5223 ^{HW}
R. Itzicuario (Tocumbo)	9	31	2	0.687	0.619	-0.178 ^{HW}
R. Amacuzac	34	33	7	0.461	0.397	-0.591 ^{DH}
R. Yautepec (Yautepec)	17	26	5	0.546	0.388	0.446 ^{DH}
R. La Parota (Lombardía)	5	10	1	0.577	0.266	0.820 ^{DH}
R. Ameca (San Antonio)	9	21	2	0.561	0.503	-0.079 ^{HW}
Media	12.03	28.37	3.5	0.728	0.508	0.204

HW: la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg; DH: la población tiene un déficit de heterocigos.

Por otro lado, en las curvas de rarefacción se pudo ver que en la mayoría de los grupos se alcanzó el total de alelos muestreados para la población. Sólo en la población de La Parota la curva de diversidad no alcanzó una asíntota, lo cual nos indica que el tamaño de muestra es bajo y que todavía podrían quedar alelos por muestrear dentro de la población (Anexo 7c).

6.3 Migración y aislamiento por distancia

Para realizar la prueba de aislamiento por distancia se eligió el estadístico de R_{ST} , ya que dicho estadístico es el más adecuado para realizar análisis con datos de microsatélites (Slatkin 1995) dado que estos marcadores se ajustan mejor a un modelo de mutación “stepwise” o paso a paso (SMM, por sus siglas en inglés). Para realizar dicha prueba se tomaron en cuenta las distancias genéticas y geográficas entre las doce cuencas que se encuentran dentro de las regiones hidrológicas (Figura 12; Anexo 9). La prueba de Mantel fue significativa ($r= 0.498$, $p<0.0001$) indicando un aislamiento por distancia.

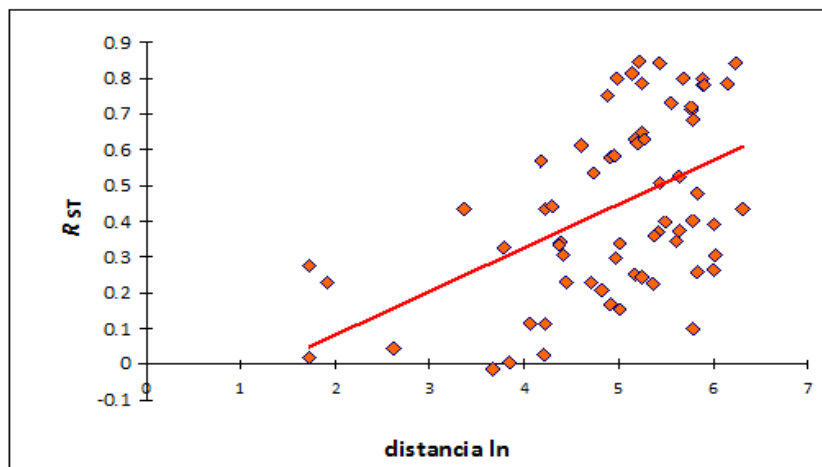


Figura 12. Prueba de Mantel para los estimados de R_{ST} Los datos se obtuvieron a partir del genotipo de *Salix humboldtiana* utilizando las distancias genéticas entre subcuencas. Las distancias geográficas son el ln de las distancias en Km entre subcuencas.

El escenario de migración que tuvo la mayor probabilidad de acuerdo a los estimados de Bezier fue el 4: Migración entre Lerma y Ameca y entre Ameca y Balsas. Debido a que la probabilidad de dicho modelo fue muy baja, ya que las cadenas no llegaron a coalescer dada la poca información contenida en los loci, no fue posible calcular la tasa de migración (M) o el tamaño efectivo de migrantes (Nm) entre pares de localidades (Cuadro 5).

Cuadro 5. Modelos de migración para *S. humboldtiana* en tres regiones hidrológicas en el centro de México. El escenario más probable se encuentra resaltado con gris.

Modelo de migración	Bezier ImL	Media armónica ImL	Probabilidad de Bezier
1) Migración entre todas las poblaciones	-442555.36	-574.77	0.12137727
2) Migración entre Lerma y Ameca	-823537.33	-11841.13	0.22586714
3) Migración entre el Ameca y el Balsas	-1164043.32	-15528.33	0.31925588
4) Migración entre Lerma y Ameca, y entre Ameca y Balsas	-396062.45	-661.50	0.10862591
5) Migración entre Lerma y Balsas	-819915.50	-16064.9	0.2248738

VII. DISCUSIÓN

En el presente estudio se describió la variación, estructuración y la posible existencia de flujo genético de *S. humboldtiana* en tres regiones hidrológicas de la Mesa Central de México, utilizando marcadores moleculares con distintas tasas de mutación y con herencia biparental (nuclear) y uniparental (cloroplasto).

7.1 Identificación de clones

La proporción entre reproducción clonal y sexual dentro de las poblaciones tiene una gran influencia en la estimación de la diversidad genética así como la definición de grupos genéticos. Por lo anterior, fue importante identificar los individuos clonales dentro de las poblaciones para evitar una subestimación de la diversidad. En total se caracterizaron genéticamente 132 individuos de los que 15 resultaron ser clones, cada genotipo clonal se encontraba en uno de los 8 grupos genéticos definidos por Geneland, lo que muestra que la dispersión clonal solo ocurre dentro de las cuencas. La localidad que presentó un mayor número de individuos clonales fue la de Queréndaro, seguida por la de Sahuayo (Anexo 4); ambas localidades se encuentran en la proximidad de ciénagas y estos ambientes tienden a ser más estables, ya que los disturbios causados por el flujo de agua son menos frecuentes que en las llanuras aluviales (Malason 1993). En general, la proporción entre reproducción sexual y asexual se encuentra regulada por las condiciones ambientales que prevalecen dentro de una población (Honnay y Bossuyt 2005). Es por eso que dichas proporciones difieren en poblaciones de la misma especie de *Salicaceae* (Karrenberg *et al.* 2002). Por ejemplo, en especies de sauce como *S. alaxensis* y *S. interior* en el Río Tanana en Alaska, la reproducción clonal se encuentra asociada a condiciones extremas, mientras que la reproducción sexual predomina en sitios más estables (Krasny *et al.* 1988). La supervivencia y el establecimiento de semillas en *Salix* se encuentra controlado por varios factores como la presencia de zonas de tierra desnuda y suficiente humedad en el suelo, condiciones que son más frecuentes en sistemas lóticos (Karrenberg *et al.* 2002). Por lo tanto, cuando no existen condiciones favorables para el establecimiento de semillas, la reproducción vegetativa provee una estrategia alternativa de regeneración que es mucho menos sensible en sus requerimientos ambientales debido a las reservas de carbohidratos y a los primordios

preformados en raíces y brotes (Schier *et al.* 1976). Aunque *S. humboldtiana* presenta reproducción clonal, se ha reportado que su mecanismo principal de reproducción es a través de semillas y que, en comparación con otras especies de *Salix*, la regeneración y el establecimiento de esquejes es relativamente más bajo (Thomas *et al.* 2012).

7.2 Variación genética

La diversidad de alelos observada para toda la muestra con los siete loci nucleares (79 alelos diferentes en total) y los 3 alelos del locus de cloroplasto se encuentra dentro del rango de la diversidad encontrada en otras especies de *Salix* con el mismo tipo de marcadores (Cuadro 6; Barker *et al.* 2003, Kikuchi *et al.* 2011). En promedio se observó una H_0 de 0.508. Sin embargo, la heterocigosis observada a nivel de grupos genéticos fue muy variable (Cuadros 4 y 6) y esto también ocurre en otras especies de sauces. Una posible explicación para esta variación de la diversidad genética entre grupos genéticos es que dichos grupos tengan un tamaño efectivo menor. Por ejemplo en *S. hukaoana* dicha variación se atribuye a la fragmentación y reducción del hábitat de algunas poblaciones (Kikuchi *et al.* 2011). Tomando en cuenta otros estudios realizados en el género *Salix*, se observa que en general los sauces tienden a presentar una diversidad promedio de baja a moderada con respecto a otras especies de árboles perennes de larga vida con entrecruzamiento y dispersión por viento (Nybom 2004, Petit y Hampe 2006, Petit y Vendramin 2007; ver Cuadro 6).

Los sauces a pesar de ser en su mayoría árboles, tienen características demográficas que impiden una gran acumulación de variación genética. Los sauces no son tan longevos como otros árboles; en la mayoría de las especies la edad máxima de supervivencia no supera los 20 años (Karrenberg *et al.* 2002, Liotta 2001), mientras que ciertas especies como *Cercidiphyllum japonicum* o diversas especies de coníferas pueden vivir cientos de años (Jones *et al.*, 2006, Sato *et al.* 2006, Suzan *et al.* 2007). Por otro lado, la mayoría de las especies de *Salix* son dioicas, lo que reduce el tamaño efectivo de las poblaciones con respecto a plantas que pueden ser hermafroditas (Hedrick 2005). Además, *S. humboldtiana* es una especie pionera y se ha encontrado que las plantas de los primeros estadios de sucesión tienden a tener menor diversidad genética, ya que el establecimiento de una población por lo general ocurre a través de pocos individuos (Hamrick *et al.* 1996, Hamrick *et al.* 1992, Nybom *et al.* 2004).

Cuadro 6. Índices de diversidad en diferentes especies del género *Salix* y otras especies de árboles obtenidos a partir de microsatélites nucleares.

Especie	H_o	H_E	Estudio
<i>Salix</i>			
<i>S. humboldtiana</i>	0.266-0.777	0.461-0.719	Este estudio
<i>S. purpurea</i>	0.517-0.686	0.509-0.724	Lin <i>et al.</i> 2009
<i>S. eriocephala</i>	0.430-0.704	0.544-0.764	
<i>S. hukaoana</i>	0.300-0.810	0.290-0.617	Kikuchi <i>et al.</i> 2011
<i>S. daphnoides</i>	0.258- 0.713	0.153- 0.865	Sochor <i>et al.</i> 2013
<i>S. alba</i>	0.100-0.700	0.065-0.820	
<i>S fragilis</i>	0.000-0.500	0.000-0.725	King <i>et al.</i> 2010
<i>S. alba x S. fragilis</i>	0.176-0.941	0.396-0.773	
Otras especies de árboles			
<i>Cercidiphyllum japonicum</i>	0.755-0.842	0.774-0.857	Sato <i>et al.</i> 2006
<i>Fraxinus excelsior</i>	0.776-0.837	0.684-0.814	Heuertz <i>et al.</i> 2004
<i>Quercus petrea</i>	0.780-0.870	0.880-0.910	Cottrell <i>et al.</i> 2003
<i>Quercus robur</i>	0.770-0.810	0.870-0.920	

El establecimiento de las poblaciones de varias especies de sauces se encuentra ligado con el proceso de pulso inundación-sequía y de erosión del río (Naiman y Décamps 1997). Por ejemplo, en el Río Paraná se ha observado la importancia de la erosión como factor de control de las poblaciones de *S. humboldtiana* (Liotta 2001). En dicho estudio se encontró que en todos los bosques de sauce se observa que los efectos de la erosión limitan la permanencia de los individuos en el largo plazo, generando un proceso de colonización y extinción en donde las semillas se establecen en los bancos recién formados, que posteriormente por procesos de sedimentación se transformaran en albardones con organismos adultos en donde actuarán las fuerzas erosivas (Figura 13). La colonización de los bancos por los brinzales asegura la permanencia de las poblaciones de sauces, ya que si los bosques se perpetuasen en los mismos sitios, en algunas decenas de años la elevada tasa de cambio geomorfológico los haría desaparecer junto con los albardones en los que se encuentran (Liotta 2001).

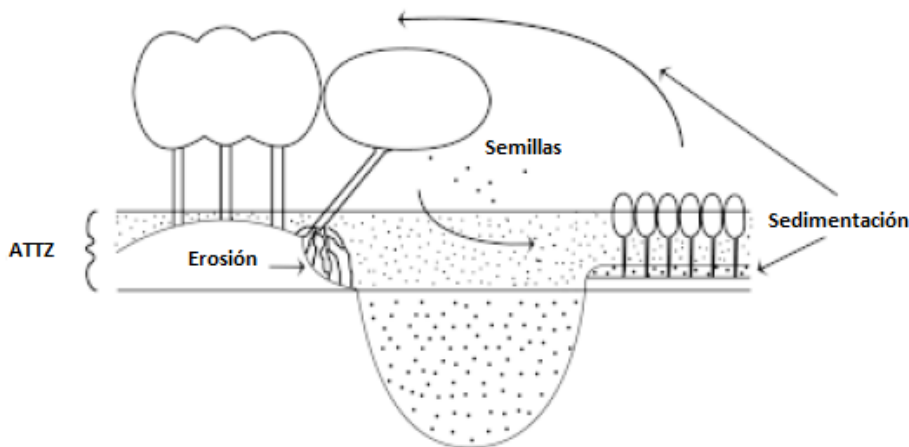


Figura 13. Esquema de la integración de *Salix humboldtiana* al pulso de inundación-sequía. ATTZ: zona de transición acuática-terrestre (tomado de Liotta 2001).

Es importante señalar que aunque en este estudio no se analizó el efecto de las especies introducidas sobre las poblaciones de *S. humboldtiana* no es posible descartar su efecto sobre la diversidad genética de la especie. Por ejemplo, en diversos ríos de la Patagonia, en donde *S. humboldtiana* se distribuye naturalmente, se ha observado un desplazamiento de la especie por parte de otro tipo de sauces introducidos de Asia (*S. babylonica*) y Europa (*S. alba* y *S. fragilis*; Correa 1998). Este desplazamiento ha sido de tal magnitud que *S. humboldtiana* se ha vuelto relictual en algunas zonas (Zalba y Villamil 2002). Debido a que dichas especies también se han introducido en México es posible que ocurra el mismo fenómeno con esta y otras especies nativas. Aunque en este estudio no se observó un desplazamiento de *S. humboldtiana* por parte de estas especies si fue posible detectar que, en algunos sitios, la especie era muy escasa o había sido desplazada por otras especies de árboles riparios. Otro problema es la formación de híbridos entre *S. babylonica* y *S. humboldtiana* (Hunziker 1962), lo que puede constituir una amenaza al pool genético de las especies nativas e incluso puede llevar a la extinción de especies raras o endémicas (Primack 2002). Aunque en campo no se observó un solapamiento de poblaciones de *S. babylonica* con *S. humboldtiana* ya que, la primera se distribuye a una mayor altitud (2300-2500 msnm) si comparte distribución con otras especies de *Salix* nativas con las cuales podría hibridar, por lo que, es importante realizar estudios sobre la diversidad genética de diferentes especies de sauce.

La diferenciación genética de las poblaciones de *S. humboldtiana* se encuentra fuertemente asociada a la estructura de las cuencas y esto coincide tanto para los marcadores nucleares como para el de cloroplasto. Los índices de estructuración R_{ST} , F_{ST} , así como los resultados de Structure y Geneland, muestran que esta diferenciación es marcada y se encuentra ordenada de una manera jerárquica. En primer lugar, encontramos que los individuos de *S. humboldtiana* analizados con Structure (sin tomar en cuenta la localidad de donde provengan) están más relacionados genéticamente con otros individuos de la misma región hidrológica. Por otra parte, utilizando Geneland, el cual toma en cuenta la procedencia de cada individuo así como su área de dispersión, encontramos ocho grupos genéticos que coinciden con las cuencas donde se encontraron los individuos (Figuras 10 y 11). Aunque el análisis de Geneland tiene como limitante la asignación de individuos no sólo por su similitud genética sino también por su ubicación geográfica, esta explicación tiene también un sentido biológico, ya que es más probable que las poblaciones se estructuren o migren entre cuencas cercanas que a cuencas lejanas. Por otro lado, los análisis de estructuración de cloroplasto y de los loci dinucleotidos perfectos realizados con Structure muestran la formación de dos grupos genéticos: Lerma y Ameca-Balsas. Cuando un microsatélite consta de dos tipos de repeticiones en tándem diferentes, puede existir homoplasia de tamaño de fragmento, la cual consta en que dos alelos pueden ser iguales en tamaño pero no en secuencia; es decir tienen diferente identidad por descendencia (Estoup *et al.* 2002). El efecto de la homoplasia puede llevar a subestimar la estructura y el flujo genético. Sin embargo, varios estudios afirman que ésta o la presencia de alelos nulos no representan problemas significativos para análisis genéticos, ya que son compensados por el alto grado de polimorfismos en los microsatélites (Machado *et al.* 2010). Para el caso de *S. humboldtiana* los loci compuestos no se ven afectados por la homoplasia. En lugar de subestimarse la estructura genética utilizando los loci compuestos, estos son precisamente los que distinguen a la región Ameca de la del Balsas y son los loci que contienen mayor diversidad de alelos (Figura 11).

En el AMOVA, el porcentaje de mayor variación se encontró al comparar los grupos obtenidos con Structure (52.62%) y los detectados con Geneland (58.69%). No obstante, para los grupos de Structure la diferencia que hay entre el porcentaje de variación entre todos los individuos de la muestra (25.64%) y dentro de cada grupo genético (21.74%) es similar. Al realizar la prueba con los grupos obtenidos por Geneland la variación cambia; la

variación de los individuos dentro de los grupos genéticos es de 12.17% y al comparar entre todos los individuos de la muestra es de 29.14% (Cuadro 3). Esto quiere decir que efectivamente los individuos dentro de una región hidrológica se encuentran diferenciados de los de las otras y, a su vez, estos son más similares dentro de cada cuenca. Existen procesos ligados a la germinación y la supervivencia de las semillas que pueden ser un factor determinante para que exista estructuración genética. En primer término, las semillas que se dispersan a largas distancias pueden tener mayores probabilidades de supervivencia que aquellas que caen cerca de la planta madre, debido a que las primeras escapan de la mortalidad causada por procesos denso-dependientes, como la competencia, la depredación y algunas enfermedades (Janzen 1970, Clark y Clark 1984). En segundo lugar, los sauces usualmente se establecen en un sustrato húmedo con sedimentos finos, pero estos micrositios son espacial y temporalmente limitados (Karrenberg *et al.* 2002; Woods y Cooper 2005). Por lo anterior, las semillas se concentran en tales sitios de disturbio creando parches de medios hermanos, incrementando la estructuración de las poblaciones (Sato *et al.* 2006). El análisis de parentesco entre cuencas mostró que la mayoría de los individuos no se encuentran relacionados. Aun así, hay un porcentaje alto de individuos que presentan la relación de hermanos o medios hermanos (26.6% max; Cuadro 1). Un estudio del establecimiento de nuevas plántulas de *S. humboldtiana* en el delta del Paraná mostró que estas se establecen en bancos de arena e islas nuevas donde nacen en masas densas, a la vez que se menciona un reclutamiento bajo en islas ya pobladas (Bukarte 1957). Generalmente las semillas de sauce son liberadas de las capsulas y estas se aglomeran en grupos que viajan juntos. Lewis y Francashi (1979) indicaron que cada banco es colonizado una sola vez y que todos los individuos son coetáneos, por lo que, si las semillas de una misma planta llegan a un sitio apto para la germinación, muchos de los individuos estarán emparentados. Más aún, los sauces usualmente liberan sus semillas por un corto periodo de tiempo y la longevidad de estas es extremadamente corta (menos de un mes), lo que hace que la regeneración o colonización de nuevos lugares a partir de semillas sea poco efectiva (Karrenberg *et al.* 2002, Gage y Cooper 2005). Para hacer un análisis de parentesco más fino, sería recomendable realizar un análisis de autocorrelación espacial (p e.j. Sato *et al.* 2006) tomando en cuenta los subgrupos que se forman en los banco de arena a lo largo del río y comprobar si los individuos de un banco tienden a estar más relacionados entre sí que con los individuos de otros bancos dentro de la misma cuenca. En este estudio no fue posible hacer este análisis, ya que solo se tomaron las coordenadas geográficas de cada localidad y

no la ubicación de cada individuo, además de que sólo se incluyeron individuos adultos, esto podría implicar que dentro de una misma cuenca existan subgrupos de individuos emparentados.

Después de determinar que los grupos genéticos concuerdan con las cuencas, se encontró que la mayoría de los grupos genéticos se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg. Por otro lado, dos grupos presentaron un índice de endogamia elevado: Yautepec (0.446) y La Parota (0.820). Generalmente la deficiencia de heterócigos se atribuye a una restricción en el tamaño poblacional, una alta proporción de individuos clonales o un desfase en la proporción de sexos y una subsecuente endogamia (Ueno *et al.* 2007, Crawford *et al.* 1983). Sin embargo, otros factores como la selección, una alta frecuencia de alelos nulos o el efecto Wahlund pueden también causar un déficit de heterócigos (Chapuis y Estoup 2007, Lee *et al.* 2011). Debido a que se no se utilizaron en el análisis los individuos clonales para calcular los índices de diversidad, se puede descartar que estos valores sean un artefacto causado por la presencia de clones dentro de los grupos. Además, los grupos con mayor presencia de clones (Querendaro y Sahuayo) se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg. Otra posibilidad es que falten alelos por muestrear dentro de la población. Por ejemplo, el alto índice de endogamia de la población de la Parota puede estar relacionado al tamaño de muestra utilizado ($n=5$) y esto se observa en las curvas de rarefacción (Anexo 7b). Debido a que la endogamia, al igual que la deriva, tiene un efecto global sobre todo el genoma, se esperaría que si las poblaciones sufrieran de alguno de estos factores todos los loci presentarían deficiencia de heterócigos. Al analizar el equilibrio de Hardy-Weinberg en cada locus y cada grupo (Anexo 7a) se encontró que en la población de Yautepec varios loci tienen deficiencia de heterócigos (Cha 528, Cha 475, SB 201, SB 233), sin embargo, los demás loci se encuentran en equilibrio. Dichos loci también presentan una frecuencia alta de alelos nulos dentro del grupo genético, por lo que la deficiencia de heterócigos en dichas poblaciones puede ser atribuida a la presencia de dichos alelos (Anexo 7a). Como ya se mencionó antes, los sauces suelen encontrarse dispersos a lo largo de la llanura aluvial y no forman un bosque continuo a lo largo de esta. Por otro lado, es muy posible que dentro de los grupos genéticos haya un efecto Wahlund, en el que existen subpoblaciones que funcionan como subunidades de apareamiento en donde alelos diferentes se encuentren fijados o sean más frecuentes en un grupo que en otro. Este fenómeno ya se ha reportado en otras

especies de sauce como *S. daphnoides* (Sochor *et al.* 2013) y *S. hukaona* (Kikuchi *et al.* 2011).

7.3 Migración y aislamiento por distancia

Uno de los objetivos del presente estudio fue investigar si existe flujo génico entre cuencas o regiones hidrológicas cercanas y si estas presentan aislamiento por distancia. La prueba de Mantel de aislamiento por distancia para todas las localidades dio una correlación positiva para el estadístico de R_{ST} . Las poblaciones se encuentran aisladas como lo muestran los índices de diferenciación entre cuencas (Cuadro 2, Anexo 9), por lo que las localidades que se encuentran en un mismo río tienen o han tenido flujo genético entre ellas, pero es poco probable que migren hacia otras cuencas a pesar de pertenecer a la misma región hidrológica, causando que las poblaciones se aislen y diferencien. Se ha observado que las especies de plantas que tienen distancias de dispersión de polen o semillas bajas o moderadas tienden a presentar aislamiento por distancia y autocorrelación espacial de genotipos para loci neutrales (Malecot 1948, Sokal y Wartenberg 1983, Epperson 1989). Tradicionalmente que las especies del género *Salix* se dispersan a grandes distancias (Boedeltje *et al.* 2003, Tackenberg *et al.* 2003, Tabacchi *et al.* 2005, Seiwa *et al.* 2008, Hörandl *et al.* 2002). Sin embargo, se ha observado que en varios taxa, el flujo génico se encuentra restringido y que la dispersión de semillas es limitada (Kikuchi *et al.* 2011, Sochor *et al.* 2013). Las semillas de sauce se encuentran adaptadas para dispersarse tanto por viento como por agua, ya que la estructura plumosa de estas les permite mantenerse a flote por tensión superficial (Seiwa *et al.* 2008). La anemocoria es la primera vía de dispersión de semillas en sauce, pero se ha demostrado que tiene un rango limitado. Por ejemplo, Gage y Cooper (2005) mostraron que el 90% de las semillas dispersadas por viento no alcanzan distancias mayores a 200m a partir de las plantas madres. Por otro lado, las semillas de sauce que llegan a un lago o un río por vía aérea pueden ser dispersadas secundariamente río abajo por la corriente (Schneider y Scharitz 1988, Thebaud y Debussche 1991, Anderson *et al.* 2000, Jansson *et al.* 2005, Merritt y Wohl 2006). La hidrocoria es una estrategia de dispersión a larga distancia más efectiva para el flujo genético en los ambientes riparios (Kudoh y Whigham 1997; Lundqvist y Andersson 2001). Sin embargo, la dispersión por agua se limita a sitios que se encuentran conectados por agua superficial y con dirección río abajo de la planta madre (Soons 2006). Por ejemplo, en la especie *S. hukaona*, (Kikuchi *et al.*

2011) se observó que la hidrocoria es la responsable de incrementar el flujo genético entre poblaciones lejanas río abajo, mientras que las poblaciones río arriba tienen poca variación y el flujo genético sólo es local. En el caso del presente estudio, este fenómeno se puede observar en la región del Lerma. Dicha región contiene la mayor cantidad de localidades muestreadas, incluido el cauce principal. Es posible observar que tanto en número de alelos como de heterocigosis observada, las localidades del Lerma, y principalmente las cercanas al cauce principal, tienen mayor diversidad genética que aquellas que se encuentran más alejadas (Anexo 8)

El modelo de migración más probable es aquel en donde los individuos se mueven entre las regiones de Lerma y Ameca y entre Ameca y Balsas. A pesar de que la probabilidad de este modelo fue muy baja (0.10862), esta explicación tiene un sentido biológico. La estructuración de las cuencas tanto de los genotipos del locus de cloroplasto como de los microsatélites nucleares perfectos, muestra que las regiones del Ameca y el Balsas tienden a asociarse y que la región del Lerma se encuentra diferenciada (Figura 11). Debido a que los marcadores de ADN mitocondrial y de cloroplasto, así como los microsatélites perfectos, tienden a tener tasas de mutación más lenta en comparación con microsatélites compuestos (Godinho *et al.* 2008, Hardy *et al.* 2003, Di Rienzo *et al.* 1994, Cristescu *et al.* 2010), es posible suponer que estas regiones formaban parte de un mismo sistema o tenían contacto en el pasado y después se dividieron. Además, es probable que esta compartición de alelos entre estos grupos se deba a la retención de polimorfismos ancestrales por separación incompleta de linajes y no a procesos de migración. La cabecera del Río Itzicuaró, donde se encuentran las localidades de Cotija y Tocumbo, pertenece actualmente a la región del Balsas. Sin embargo, se cree que antiguamente esta cuenca era un tributario del lago de Chapala (lugar donde desemboca el río Sahuayo; Figura 4) y que se separó de éste en el Terciario (Miller y Smith 1986, Rosas-Elguera *et al.* 2002, 2003). Este evento no solo se encuentra sustentado por evidencia geológica sino que también se ha encontrado que varias especies de dichas cuencas comparten haplotipos (Domínguez-Domínguez *et al.* 2008). Por ejemplo, en un estudio realizado con ADN mitocondrial en diferentes especies de goodeidos (Domínguez-Domínguez 2009) se demuestra la existencia de un único haplotipo en los individuos de esta región, el cual sólo se encuentra a un paso mutacional del haplotipo encontrado en la cuenca de Chapala. Existen otros estudios en peces que apoyan esta hipótesis debido a que ambas cuencas comparten especies hermanas y a que estos eventos de conexión se han visto en

otras cabeceras de cuencas como la cuenca del río Cupatzió y su conexión con cuencas del Lerma (Zirahuen y Pátzcuaro) (Álvarez del Villar 1963, Pérez-Rodríguez *et al.* 2009, Domínguez -Domínguez 2009, Corona-Santiago 2013). Por otro lado, y volviendo a nuestro estudio en *Salix*, la estructuración de los datos tomando en cuenta todos los loci nucleares, mostraron consistentemente tanto en Geneland como Structure que las localidades de Cotija y Tocumbo (parte del río Itzícuaru), y Jiquilpan (río Sahuayo), presentan genotipos mezclados entre dos grandes grupos (Lerma y Ameca; Figuras 10 y 11). Lo cual puede significar que existió flujo genético mucho después de que se separaran las cuencas por actividad volcánica (Rosas-Elguera *et al.* 2002, 2003). Una forma de poder distinguir entre la separación incompleta de linajes y el flujo génico sería estimando los niveles de flujo génico a través de métodos de coalescencia de manera diferencial. Por ejemplo realizando el análisis de flujo génico tanto de cloroplasto, como de los loci nucleares con el programa Migrate. Debido a que en este estudio la diversidad de alelos tanto para cloroplasto como para los microsatélites nucleares fue muy baja no fue posible calcular el flujo génico entre grupos genéticos ya que las cadenas no convergieron. Se sugiere aumentar el número de loci

VIII. CONCLUSIONES

Salix humboldtiana es una especie que presenta una heterocigosis (0.508) dentro del rango encontrado para otras especies de sauces y la cual está asociada a su dinámica poblacional de colonización y extinción en parches. A pesar de presentar una reproducción vegetativa, la presencia de individuos clonales fue baja y se puede suponer que la especie se reproduce predominantemente a través de semillas.

Según el algoritmo utilizado (Strucuture o Geneland) se obtuvieron tres y ocho grupos genéticos que concuerdan con las regiones hidrológicas y la geografía de las cuencas, respectivamente. Estos resultados son consistentes con los índices de estructuración R_{ST} y F_{ST} que también mostraron valores de diferenciación entre los ocho grupos genéticos. Por otro lado, se puede concluir que la señal de migración entre la región del Balsas y del Ameca puede ser producto de una separación incompleta de linajes, ya que estas regiones forman un solo grupo al observar la estructura obtenida usando el marcador cloroplástico y los microsatélites nucleares simples. Al separarse el grupo Balsas-Ameca es posible que entre el grupo Ameca y Lerma si haya habido migración, como lo muestran los resultados utilizando todos los loci.

Este es el primer estudio que se realiza para medir la diversidad y estructuración de *S. humboldtiana* en México. Aunque la especie no se encuentra clasificada como vulnerable, se ha observado en otras áreas de su distribución que esta es desplazada por especies de sauce introducidas (Thomas *et al.* 2012, Budde *et al.* 2011), lo cual podría estar ocurriendo en México para esta y otras especies del género, por lo que se sugiere realizar estudios de diversidad genética e hibridación en otras especies de sauce en México.

LITERATURA CITADA

Addinsoft. (2013). Xlstat. Obtenido de <http://www.xlstat.com/es/>

Alvarez del Villar, J. (1963). Ictiología Michoacana III Los peces de San Juanico y Tocumbo, Mich. Anales de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. 12: 11-138.

Andersson, E., Nilsson, C. & Johansson, M. E. (2000). Plant dispersal in boreal rivers and its relation to the diversity of riparian flora. Journal of biogeography 27(5): 1095-1106.

Argus, G.W.(1997). Infrageneric classification of New World *Salix* L. (*Salicaceae*). Systematic Botany Monographs.52: 1–121.

Argus, G. W. (2010). Salix. New York,, Flora of North America Editorial Committee.

Arriaga, C. L., Aguilar-Sierra, V. & Alcocer-Durand, J. ((2000)). Aguas continentales y diversidad biológica de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad México, DF.

Avice, J. C. (2000). Phylogeography: The history and formation of species, Cambridge, MA , Harvard University Press: 447.

Avice, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigel, C. A. Reeb and N. C. Saunders (1987). Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. Annual Review of Ecology and Systematics 18: 489-522

Balloux, F., Brunner, H., Lugon- Moulin, N., Hausser, J., & Goudet, J. (2000). Microsatellites can be misleading: An empirical and simulation study. Evolution 54(4): 1414-1422.

Balloux, F., Lugon-Moulin, N. & Hausser, J. (2000) Estimating interracial gene flow in hybrid zones: how reliable are microsatellites? Acta Theriologica, 45, 93–101.

Balloux, F. & Lugon-Moulin, N. (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite markers. Molecular Ecology 11(2): 155-165.

Barbour, C. D. (1973). A Biogeographical History of *Chirostoma* (Pisces: Atherinidae): A Species Flock from the Mexican Plateau. Copeia 1973(3): 533-556.

Barker, J. H. A., Pahlich, A., Trybush, S., Edwards, K. J., & Karp, A. (2003). Microsatellite markers for diverse *Salix* species. Molecular Ecology Notes 3(1): 4-6.

Barkley, N., Krueger, R., Federici, C. & Roose, M. (2009). What phylogeny and gene genealogy analyses reveal about homoplasy in citrus microsatellite alleles. Plant Systematics and Evolution 282(1-2): 71-86.

Batis, A. I., Alcocer, M.I., Gual, M., Sánchez, C. & Vázquez-Yanes, C. (1999). Árboles y Arbustos Nativos Potencialmente Valiosos para la Restauración Ecológica y la Reforestación. Instituto de Ecología, UNAM-CONABIO. México, D.F

- Beerli, P. (2006). Comparison of Bayesian and maximum-likelihood inference of population genetic parameters. Bioinformatics 22(3): 341-345.
- Beerli, P. & Felsenstein, J. (1999). Maximum-Likelihood Estimation of Migration Rates and Effective Population Numbers in Two Populations Using a Coalescent Approach. Genetics 152(2): 763-773.
- Beerli, P. & Felsenstein, J. (2001). Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. Proceedings of the National Academy of Sciences 98(8): 4563-4568.
- Beerli, P. & Palczewski, M. (2010). Unified Framework to Evaluate Panmixia and Migration Direction Among Multiple Sampling Locations. Genetics 185(1): 313-326.
- Beismann, H., Barker, J. H. A., Karp, A. & Speck, T. (1997). AFLP analysis sheds light on distribution of two *Salix* species and their hybrid along a natural gradient. Molecular Ecology 6(10): 989-993.
- Bensch, S. & Hasselquist, D. (1999). Phylogeographic population structure of great reed warblers: an analysis of mtDNA control region sequences. Biological Journal of the Linnean Society 66(2): 171-185.
- Blouin, M. S. (2003). DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. Trends in Ecology & Evolution 18(10): 503-511.
- Broeck, A. V., Villar, M., Van Bockstaele, E., & VanSlycken, J. (2005) Natural hybridization between cultivated poplars and their wild relatives: evidence and consequences for native poplar populations. Annals of Forest Science 62(7): 601-613.
- Brooks, D. R. & McLennan, D. A. (2001). A comparison of a discovery-based and an event-based method of historical biogeography. Journal of Biogeography 28(6): 757-767.
- Budde, K., Gallo, L., Marchelli, P., Mosner, E., Liepelt, S., Ziegenhagen, B. & Leyer, I. (2011). Wide spread invasion without sexual reproduction? A case study on European willows in Patagonia, Argentina. Biological Invasions 13(1): 45-54.
- Burkart, A. (1957) Ojeada sinóptica sobre la vegetación del Delta del río Paraná. Darwiniana 11: 457-561
- Carranza, E. (2005). Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Fascículo complementario XXI. Conocimiento actual de la flora y la diversidad vegetal del estado de Guanajuato, México. Instituto de Ecología, Pátzcuaro, Michoacán.
- Clark, D. A. & Clark, D. B. (1984). Spacing Dynamics of a tropical rain-forest tree- evaluation of the Janzen-Connell Mode American Naturalist 124(6): 769-788.
- Corona, A. M., Toledo, V. H. & Morrone, J. J. (2007). Does the Trans-mexican Volcanic Belt represent a natural biogeographical unit? An analysis of the distributional patterns of

Coleoptera. Journal of Biogeography 34(6): 1008-1015.

Corona-Santiago, D. K. (2013). Filogeografía de tres especies de Goodeidos endémicos del centro de México: *Allotoca diazi*, *A. meeki* y *A. catarinae* (Cyprinodontiformes: Goodeidae). Tesis de Maestría Facultad de Biología. UMSNH.

Correa MN (1998) Flora Patagonica. Colección Científica del INTA, Buenos Aires

Cottrell, J. E., Munro, R. C., Tabbener, H. E., Milner, A. D., Forrest, G. I., & Lowe, A. J. (2003). Comparison of fine-scale genetic structure using nuclear microsatellites within two British oakwoods differing in population history. Forest Ecology and Management 176(1): 287-303.

Crawford, N. G. (2010). smogd: software for the measurement of genetic diversity. Molecular Ecology Resources 10(3): 556-557.

Crawford, R. M. M., & Balfour, J. (1983). Female predominant sex ratios and physiological differentiation in arctic willows. The Journal of Ecology 149-160.

Cronquist, A. (1988). The evolution and classification of flowering plants, 2nd ed. Bronx, New York: New York Botanical Garden

Curtu, A.L., Finkeldey, R. & Gailing, O. (2004). Comparative sequencing of a microsatellite locus reveals size homoplasmy within and between european oak species (*Quercus* spp.). Plant Molecular Biology Reporter 22(4): 339-346.

Chapuis, M.P. & Estoup, A. (2007). Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. Molecular Biology and Evolution 24(3): 621-631.

Doadrio, I. & Domínguez-Domínguez, O. (2004). Phylogenetic relationships within the fish family Goodeidae based on cytochrome b sequence data. Molecular Phylogenetics and Evolution 31(2): 416-430.

Domínguez-Domínguez, O., Doadrio, I. & Pérez-Ponce de León, G. (2006a). Historical biogeography of some river basins in central Mexico evidenced by their goodeine freshwater fishes: a preliminary hypothesis using secondary Brooks parsimony analysis. Journal of Biogeography 33(8): 1437-1447.

Dominguez-Dominguez, O., Martinez-Meyer, E., Zambrano, L. & Perez-Ponce de Leon, G. (2006b). Using ecological-niche modeling as a conservation tool for freshwater species: the live-bearing fishes (Goodeidae) in Central Mexico. Conservation Biology 20(6): 1730-1739.

Dominguez-Dominguez, O., Alda, F., de Leon, G., Garcia-Garitagoitia, J. & Doadrio, I. (2008a). Evolutionary history of the endangered fish *Zoogoneticus quitzeoensis* (Bean, 1898) (Cyprinodontiformes: Goodeidae) using a sequential approach to phylogeography based on mitochondrial and nuclear DNA data. BMC evolutionary biology 8.(1): 161

Domínguez-Domínguez, O. Pedraza-Lara, C. Gurrola-Sánchez, N. Pérez-Rodríguez, R.

Alcaraz, L. Perea, S. Ornelas, C.P. Israde-Alcántara, I. Garduño-Monroy, V.H. Doadrio, I. Pérez-Ponce de León, G. & Brooks, D.R. (2008b). Historical biogeography of the Goodeinae (Cyprinodontiforms). En *Viviparous fishes II* (eds. Uribe-Aranzabal, M.C. y Grier, H). New Life Publications, Florida.

Domínguez-Domínguez, O. Pérez-Rodríguez, R., Escalera-Vázquez, L.H. & Doadrio, I. (2009). The genus *Notropis* Rafinesque, 1817 (Actinopterygii, Cyprinidae) from the Lerma River Basin in Central Mexico. Dos nuevas especies del género *Notropis Rafinesque*, 1817 (Actinopterygii, Cyprinidae), de la cuenca del río Lerma, México central. *Hidrobiológica* 19 (2):159-172.

Dorn, R. D. (1976). A synopsis of American *Salix*. *Canadian Journal of Botany* 54(24): 2769-2789.

Earl, D. & von Holdt, B. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4(2): 359-361.

Eckenwalder, J.E. (1996) Systematics and evolution of *Populus*. In: *Biology of Populus and its Implications for Management and Conservation* (eds. Stettler, R.F. Bradshaw H.D., Heilman P.E. y Hinckley T.M.), pp. 7–32. NRC. Research Press, Ottawa.

Ellstrand, N. C., R. Whitkus & L. H. Rieseberg (1996). Distribution of spontaneous plant hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93(10): 5090-5093.

Estoup, A., Jarne, P., Cornuet, J., 2002. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetic analysis. *Molecular Ecology* 11:1591–1604.

Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* 1: 47 - 50.

Fang, Z.F., Zhao, S.D. & Skvortsov, A.K. (1999). Salicaceae. pp. 139–274 in: Wu, Z.Y. & Raven, P.H. (eds.), *Flora of China*, vol. 4. Beijing: Science Press; St. Louis: Missouri Botanical Garden Press.

Ferrari, L. López-Martínez, M., Aguirre-Díaz G. & Carrasco-Núñez G. (1999) Space time patterns of Cenozoic arc volcanism in central México: from the Sierra Madre Occidental to the Mexican Volcanic Belt. *Geology*. 27:303-306.

Ferrari, L., Conticelli, S., Vaggelli, G., Petrone C. M. & Manetti P. (2000). Late Miocene volcanism and intra-arc tectonics during the early development of the Trans-Mexican Volcanic Belt. *Tectonophysics* 318(1–4): 161-185.

Fussi, B., Lexer, C. & Heinze, B. (2010) Phylogeography of *Populus alba* (L.) and *Populus tremula* (L.) in Central Europe: secondary contact and hybridisation during recolonisation from disconnected refugia. *Tree Genetics & Genomes*. 6. 439–450

Futuyma, D. (2005). *Evolutionary biology*. USA, Sinauer Associates.

- Gage, E. A. & Cooper D. J. (2005). Patterns of willow seed dispersal, seed entrapment, and seedling establishment in a heavily browsed montane riparian ecosystem. Canadian Journal of Botany 83(6): 678-687.
- Gaggiotti, O.E., Lange, O., Rassman, K. & Gliddon, C. (1999) A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. Molecular Ecology. 8. 1513–1520.
- García, M. A. (1982). El medio ambiente en México: temas, problemas y alternativas. México, DF. , Fondo de Cultura Económica.
- Gillespie, J. H. (2010). Population genetics: a concise guide, JHU Press.
- Godinho, R., Crespo, E. G., & Ferrand, N. (2008). The limits of mtDNA phylogeography: complex patterns of population history in a highly structured Iberian lizard are only revealed by the use of nuclear markers. Molecular Ecology 17(21): 4670-4683.
- Goldstein, D. B., Linares, A. R., Cavalli-Sforza, L. L., & Feldman, M. W. (1995). An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. Genetics 139(1): 463-471.
- Gornall, R. J., Hollingsworth, P. M. & Preston C. D. (1998). Evidence for spatial structure and directional gene flow in a population of an aquatic plant, *Potamogeton coloratus*. Heredity 80(4): 414-421.
- Guillot, G., Mortier, F. & Estoup, A. (2005). GENELAND: a computer package for landscape genetics. Molecular Ecology Notes 5(3): 712-715.
- Guillot, G., Estoup, A., Mortier, F. d. r. & o. Cosson, J. F. (2005). A Spatial Statistical Model for Landscape Genetics. Genetics 170(3): 1261-1280.
- Guillot, G., Leblois, R. Coulon, A. & Frantz, A. C. (2009). Statistical methods in spatial genetics. Molecular Ecology 18(23): 4734-4756.
- Guillot, G., Mortier, F. & Estoup, A. (2005). Geneland: a computer package for landscape genetics. Molecular Ecology Notes 5(3): 712-715.
- Hamrick, J.L. (1987). Gene Flow and distribution of genetic variation in plant populations. In: *Differentiation Patterns in Higher Plants* (ed. Urbanska, K.M.), pp. 53-67. Academic Press, London.
- Hamrick JL, N. J. (1996). Consequence of dispersal in plants. Population Dynamics in Ecological Space and Time. R. K. Rhodes OE, Smith MH. Chicago, The University of Chicago Press: 203–235.
- Hamrick, J.L. & Godt, M. J.W. (1990). Allozyme diversity in plant species. In *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources* (eds Brown AHD, Clegg, M.T. Kahler, A.L. Wier, B.S.) pp. 43-63. Sinauer Associates Inc., Sunderland, M.A.

- Hamrick, J.L. & Godt, M. J.W.(1996). Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences 351(1345): 1291-1298.
- Hamrick, J. L., Godt, M. J. W. & Sherman-Broyles S. L. (1992). Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. Population genetics of forest trees, Springer: 95-124.
- Hanski, I. (1998). Metapopulation dynamics. Nature 396(6706): 41-49.
- Hardig, T. M., Anttila, C. K. & Brunsfeld, S. J. (2010). A Phylogenetic Analysis of *Salix* (Salicaceae) Based on matK and Ribosomal DNA Sequence Data. Journal of Botany 2010.
- Hardig, T. M., Brunsfeld, S. J., Fritz, R. S., Morgan M. & Orians C. M. (2000). Morphological and molecular evidence for hybridization and introgression in a willow (*Salix*) hybrid zone. Molecular Ecology 9(1): 9-24.
- Hardy, M. E., Grady, J. M. & Routman, E. J. (2002). Intraspecific phylogeography of the slender madtom: the complex evolutionary history of the Central Highlands of the United States. Molecular Ecology 11(11): 2393-2403.
- Hartl, D. & Clark, A. (2007). Principles of population genetics. Sinauer Associates. USA. 652 pp.
- Hedrick, P. (2005). Genetics of Populations. Jones & Barlett Publishers. USA. 737 pp.
- Heywood, V. H., Brummitt, R. K., Culham, A. & Seberg, O. (2006). Flowering plant families of the World. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Heuertz, M., Hausman, J. F., Hardy, O. J., Vendramin, G. G., Frascaria-Lacoste, N., & Vekemans, X. (2004). Nuclear microsatellites reveal contrasting patterns of genetic structure between western and southeastern European populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.). Evolution 58(5), 976-988.
- Honnay O, Bossuyt B (2005) Prolonged clonal growth: escape route of route to extinction? Oikos 108: 427–432.
- Hörandl E, Florineth F, Hadacek F (2002) Weiden in Österreich und angrenzenden Gebieten. Universität für Bodenkultur, Wien
- Hoshikawa, T., Kikuchi, S., Nagamitsu, T., & Tomaru, N. (2009). Eighteen microsatellite loci in *Salix arbutifolia* (Salicaceae) and cross-species amplification in *Salix* and *Populus* species. Molecular Ecology Resources 9(4): 1202-1205.
- Huidobro, L., Morrone, J. J., Villalobos, J. L. & Álvarez, F. (2006). Distributional patterns of freshwater taxa (fishes, crustaceans and plants) from the Mexican Transition Zone. Journal of Biogeography 33(4): 731-741.

Hunziker, J.H. (1958). Estudios citogenéticos en *Salix humboldtiana* y en sauces híbridos triploides cultivados en la Argentina. *Revista de Investigaciones Agrícolas*. 12, 111-153.

Hunziker, J. H. (1962). The origin of the hybrid triploid willows cultivated in Argentina. *Silvae Genet* 11: 151-153.

Imbert, E. & Lefèvre, F. (2003). Dispersal and gene flow of *Populus nigra* (Salicaceae) along a dynamic river system. *Journal of Ecology* 91(3): 447-456.

Israde Alcántara, I., Velázquez-Durán, R., Lozano García, M., Bischoff, J., Domínguez Vázquez, G., & Garduño Monroy, V. H. (2010). Evolución Paleolimnológica del Lago Cuitzeo, Michoacán durante el Pleistoceno-Holoceno. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana* 62(3), 345-357

Jacquemyn, H., Honnay, O., Van Looy, K. & Breyne, P. (2006). Spatiotemporal structure of genetic variation of a spreading plant metapopulation on dynamic riverbanks along the Meuse River. *Heredity* 96(6): 471-478.

Jakobsson, M. & Rosenberg, N. A. (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23(14): 1801-1806.

Jansson, R., Zinko, U., Merritt, D. M. & Nilsson, C. (2005). Hydrochory increases riparian plant species richness: a comparison between a free - flowing and a regulated river. *Journal of Ecology* 93(6): 1094-1103.

Janzen, D. H. (1970). Herbivores and the number of the tree species in tropical forests. *American Naturalist* 104(940): 501.

Jones, F. , Hamrick, J., Peterson, C. & Squiers, E. (2006) Inferring colonization history from analyses of spatial genetic structure within populations of *Pinus strobus* and *Quercus rubra* . *Molecular Ecology* 15: 851-861.

Jost, L. O. U. (2008). GST and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology* 17(18): 4015-4026.

Kalinowski, S. T., Wagner, A. P. & Taper, M. L. (2006). MI - relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes* 6(2): 576-579.

Karrenberg, S., Edwards, P. J. & Kollmann, J. (2002). The life history of Salicaceae living in the active zone of floodplains. *Freshwater Biology* 47.(4) 733-748.

Karrenberg, S., Kollmann, J., Edwards, P. J., Gurnell, A. M., & Petts, G. E. (2003). Patterns in woody vegetation along the active zone of a near-natural Alpine river. *Basic and Applied Ecology* 4(2): 157-166.

Keller, L. F. & Waller, D. M. (2002). Inbreeding effects in wild populations. Trends in Ecology & Evolution 17(5): 230-241.

Kikuchi, S., Suzuki, W., & Sashimura, N. (2011). Gene flow in an endangered willow *Salix hukaoana* (Salicaceae) in natural and fragmented riparian landscapes. Conservation Genetics 12(1): 79-89.

Kimura, M. & Crow, J.F. (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite populations. Genetics. 49. 725–738.

Kimura, M. & Ohta, T. (1978) Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite populations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. 75. 2868–2872.

King, R., Harris, S. L., Karp, A., & Barker, J. H (2010). Characterisation and inheritance of nuclear microsatellite loci for use in population studies of the allotetraploid *Salix alba*–*Salix fragilis* complex. Tree Genetics & Genomes 6(2): 247-258.

Kudoh, H. & Whigham, D.F. (1997). Microgeographic genetic structure and gene flow in *Hibiscus moscheutos* (Malvaceae) populations. American Journal of Botany 84:1285–1293

Lamit, L. J., Wojtowicz, T., Kovacs, Z., Wooley, S. C., Zinkgraf, M., Whitham, T. G. & Gehring, C. A. (2011). Hybridization among foundation tree species influences the structure of associated understory plant communities. Botany 89(3): 165-174.

Lanteri, A. & Confalonieri, V (2003). Filogeografía: Objetivos, métodos y ejemplos. p. 185-194. En Morrone, J. y Llorente, J. (eds). Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía. CONABIO, México D.F.

Lee KM, Kim YY, Hyun JO (2011) Genetic variation in populations of *Populus davidiana* DODE based on microsatellite marker analysis. Genes Genomics 33:163–171

Leyer, I. (2006). Dispersal, diversity and distribution patterns in pioneer vegetation: The role of river-floodplain connectivity. Journal of Vegetation Science 17(4): 407-416.

Lewis, J.P. & Franceschi, E.A. (1979) Notas sobre la dinámica de la vegetación del valle del río Paraná. Ecosur 6(12): 145-163

Lia, V. V., Bracco, M., Gottlieb, A. M., Poggio, L. & Confalonieri, V. A. (2007). Complex mutational patterns and size homoplasy at maize microsatellite loci. Theoretical and Applied Genetics 115(7): 981-991.

Lin, J., Gibbs, J. P., & Smart, L. B. (2009). Population genetic structure of native versus naturalized sympatric shrub willows (*Salix*; Salicaceae). American journal of botany 96(4), 771-785.

Liotta, J. (2001). Rasgos biológicos de *Salix humboldtiana willd.* y regímenes de pulsos de inundación. Interciencia 26 (9) 397-403

- Liu, Y., Wang, Y. & Huang, H. (2006). High interpopulation genetic differentiation and unidirectional linear migration patterns in *Myricaria laxiflora* (Tamaricaceae), an endemic riparian plant in the Three Gorges Valley of the Yangtze River. American Journal of Botany 93(2): 206-215.
- Lundqvist, E. & Andersson, E. (2001). Genetic diversity in populations of plants with different breeding and dispersal strategies in a free - flowing boreal river system. Hereditas 135(1): 75-83
- Lugon-Moulin, N., Brünner, H., Wytttenbach, A., Hausser, J. & Goudet, J. (1999) Hierarchical analysis of genetic differentiation in a hybrid zone of *Sorex araneus* (Insectivora, Soricidae). Molecular Ecology. 8. 419–431.
- Macaya-Sanz, D., Heuertz, M., López-de-Heredia, U., De-Lucas, A. I., Hidalgo, E., Maestro, C., Prada, A., Alía, R. & González-Martínez, S. C. (2012). The Atlantic–Mediterranean watershed, river basins and glacial history shape the genetic structure of Iberian poplars. Molecular Ecology 21(14): 3593-3609.
- Machado, L. P. B., Mateus, R. P., Sene, F. M. & Manfrin, M. H. (2010). Microsatellite allele sequencing in population analyses of the South American cactophilic species *Drosophila antonietae* (Diptera: Drosophilidae). Biological Journal of the Linnean Society 100(3): 573-584.
- Malanson G.P. (1993) Riparian Landscapes. Cambridge University Press, Cambridge.
- Marshall, C. J. & Liebherr, J. K. (2000). Cladistic biogeography of the Mexican transition zone. Journal of Biogeography 27(1): 203-216.
- Mateos, M., Sanjur, O. I. & Vrijenhoek, R. C. (2002). Historical biogeography of the livebearing fish genus *Poeciliopsis* (Poeciliidae Cyprinodontiformes). Evolution 56(5): 972-984.
- Mateos, M. (2005). Comparative phylogeography of livebearing fishes in the genera *Poeciliopsis* and *Poecilia* (Poeciliidae: Cyprinodontiformes) in central Mexico. Journal of Biogeography 32(5): 775-780.
- Mateos, M., Sanjur, O. I. & Vrijenhoek, R. C. (2002). Historical biogeography of the livebearing fish genus *Poeciliopsis* (Poeciliidae : Cyprinodontiformes). Evolution 56(5): 972-984.
- Meirmans, P. G. & Van Tienderen, P.H. (2004). GENOTYPE and GENODIVE: two programs for the analysis of genetic diversity of asexual organisms. Molecular Ecology Notes 4: 792-794.
- Mejía-Madrid, H. H., Vázquez-Domínguez, E. & Pérez-Ponce de León, G. (2007). Phylogeography and freshwater basins in central Mexico: recent history as revealed by the fish parasite *Rhabdochona lichtenfelsi* (Nematoda). Journal of Biogeography 34(5): 787-801.

- Méndez, E. (2012). Revisión del género *Salix* (Salicaceae) en la Provincia de Mendoza, Argentina. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo 44: 157-192.
- Merritt, D. M. & Wohl, E. E. (2006). Plant dispersal along rivers fragmented by dams. River Research and Applications 22(1): 1-26.
- Miller, R. R. & Smith, M. L. (1986). Origin and geography of the fishes of Central Mexico. In The Zoogeography of North American Freshwater Fishes, New York, USA, Wiley-Intersciences publication.
- Moncayo-Estrada, R., Israde-Alcantara, I. & Garduno-Monroy, V. H. (2001). La cherehuita *Hubbsina turneri* De Buen (1941) (Pisces, Goodeidae). Origen, distribución y su uso en la regionalización de la cuenca del Lerma, UAM. Morrone, J. J. (2009). Evolutionary biogeography: an integrative approach with case studies., Columbia Univ. Press.
- Morrone, J. J. (2010). Fundamental biogeographic patterns across the Mexican Transition Zone: an evolutionary approach. Ecography 33(2): 355-361.
- Naiman, R.J. & Décamps, H. (1997). The ecology of interfaces: riparian zones. Annual Reviews of Ecology and Systematics 28:621–658
- Nathan, R. & Muller-Landau, H. C. (2000). Spatial patterns of seed dispersal, their determinants and consequences for recruitment. Trends in Ecology & Evolution 15(7): 278-285.
- Neiff J.J. (1986) Las grandes unidades de vegetación y ambiente insular del río Paraná en el tramo Candelaria - Itá-Ibaté. Revista de Asociación de Ciencias naturales del Litoral 17: 7-30.
- Neiff, J.J., Reboratti, H.J, Gorleri, M.C. & Basualdo, M. (1985) Impacto de las crecientes extraordinarias sobre los bosques fluviales del Bajo Paraguay. Bol. Comunicado Especial Río Bermejo. Cámara de Diputados de la Nación (Buenos Aires) 4: 13-30.
- Newsholme, C. (2003). Willows: the genus *Salix*. B. T. Batsford Ltd. London. pp. 10-43.
- Nybom, H. (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. Molecular Ecology 13(5): 1143-1155.
- Peakall, R. & Smouse, P. E. (2012). GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. Bioinformatics 28(19): 2537-2539.
- Pérez Ponce de León N, G., Zambrano, L., Domínguez- Domínguez, O., Pérez Rodríguez R., & Escalera Vázquez, L. H. (2009). Cambio en la distribución de goodeidos (Osteichthyes: Cyprinodontiformes: Goodeidae) en cuencas hidrológicas del centro de México. Revista Mexicana de Biodiversidad 79(002).
- Perrow, M. R. & Davy, A. J. (2002). Handbook of ecological Restoration. Restoration in Practice. Cambridge, Cambridge University Press.

Petit, R. J., & Hampe, A. (2006). Some evolutionary consequences of being a tree. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 187-214.

Petit, R. & Vendramin, G. (2007). Plant phylogeography based on organelle genes: an introduction. Phylogeography of Southern European Refugia. S. Weiss and N. Ferrand, Springer Netherlands: 23-97.

Primack RB (2002) Essentials of conservation biology. Sinauer Associates, Sunderland

Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics 155(2): 945 - 959.

Rohwer, J., & Kubitzki, K. (1984). *Salix martiana*, a regularly hermaphrodite willow. Plant systematics and evolution, 144(2), 99-101.

Rogstad, S. H., B. Keane, & J. Beresh. (2002). Genetic variation across VNTR loci in central North American *Taraxacum* surveyed at different spatial scales. Plant Ecology 161: 111-121.

Rood, S. B., Goater, L. A., Mahoney, J. M., Pearce, C. M. & Smith, D. G (2007). Floods, fire, and ice: disturbance ecology of riparian cottonwoods The review is one of a selection of papers published in the Special Issue on Poplar Research in Canada. Canadian Journal of Botany 85(11): 1019-1032.

Rosas-Elguera J., C.-N. G., López-Martínez M. & Salinas-Prieto J.C. (2002). Geología de los límites entre la Faja Volcánica Trans-Mexicana y la Sierra Madre del Sur (Bolque Michoacan). Resumenes Geos 22: 405-406.

Rosas-Elguera J., A.-V. L. M., Goguitchaichvili ,A., Urrutia-Fucugauchi, J., Salinas-Prieto, J.C. & Lee J.K.W. (2003). Counterclockwise Rotation of the Michoacan Block: Implications for the Tectonics of Western Mexico. International Geology Review. 45: 814-826.

Rosenberg, N. A. (2004). distruct: a program for the graphical display of population structure. Molecular Ecology Notes 4(1): 137-138.

Roussat, M. R. & F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. Journal of Heredity 86: 248-249.

Rousset, F. (2008). Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. Molecular Ecology Resources 8: 103-106.

Rottenberg, A. (2007). Fertility and sexual structure in a polygamous willow population. Plant Systematics and Evolution, 268(1-4), 257-260

Sato, T., Isagi, Y., Sakio, H., Osumi, K. & Goto,S.(2005). Effect of gene flow on spatial genetic structure in the riparian canopy tree *Cercidiphyllum japonicum* revealed by microsatellite analysis. Heredity 96(1): 79-84.

Schaal, B. A., Hayworth, D. A., Olsen, K. M., Rauscher, J. T. & Smith, W. A. (1998).

- Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. Molecular Ecology 7(4): 465-474.
- Seiwa, K., Tozawa, M., Ueno, N., Kimura, M., Yamasaki, M. & Maruyama, K. (2008). Roles of cottony hairs in directed seed dispersal in riparian willows. Plant Ecology 198(1): 27-35.
- Schier GA, Campbell RB (1976) Differences among *Populus* species in ability to form adventitious shoots and roots. Canadian Journal Forest Research 6: 253–261.
- Schneider, R. L. & Sharitz, R. R. (1988). Hydrochory and regeneration in a bald cypress-water tupelo swamp forest. Ecology 69(4): 1055-1063.
- Skvortsov, A.K. (1999) Willows of Russia and Adjacent Countries: Taxonomical and Geographical Revision (translated from: Skvortsov A.K. (1968) Willows of the USSR. Taxonomic and Geographic Revision. Nauka, Moscow). Joensuu University, Joensuu.
- Slatkin, M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. Genetics 139(1): 457-462.
- Slavov, G., DiFazio, S.P. & Strauss, S.H. (2004) Gene flow in forest trees: gene migration patterns and landscape modelling of transgene dispersion in hybrid poplar. In: Den Nijs HCM, Bartsch D, Sweet J (eds) Introgression from genetically modified plants into wild relatives. CABI Publishing, Wallingford.
- Smith, R. L. & Sytsma, K. J. (1990). Evolution of *Populus nigra* (Sect. Aigeiros): Introgressive Hybridization and the Chloroplast Contribution of *Populus alba* (Sect. *Populus*). American Journal of Botany 77(9): 1176-1187.
- Sochor, M., Vašut, R. J., Bártová, E., Majeský, L., & Mráček, J. (2013). Can gene flow among populations counteract the habitat loss of extremely fragile biotopes? An example from the population genetic structure in *Salix daphnoides*. Tree Genetics & Genomes, 1-13.
- Soons, M. B. (2006). Wind dispersal in freshwater wetlands: Knowledge for conservation and restoration. Applied Vegetation Science 9(2): 271-278.
- Suda, Y. & Argus, G. W. (1969). Chromosome numbers of some North American Arctic and Boreal *Salix*. Canadian Journal of Botany 47(6): 859-862.
- Suzan, H. A., Enriquez, G. & Malda, G. 2007. Population structure of the Mexican bald cypress (*Taxodium mucronatum* Ten.) in Queretaro. México. Forest ecology and Management 242: 243-249.
- Tamayo, L.T. & West, R.C. (eds). Handbook of Middle America Indians. University of Texas Press, USA.
- Thébaud, C. & Debussche, M. (1991). Rapid invasion of *Fraxinus ornus* L. along the Herault River system in southern France: the importance of seed dispersal by water. Journal of Biogeography: 7-12.

- Thomas, L. K., Tölle, L., Ziegenhagen, B., & Leyer, I. (2012). Are vegetative reproduction capacities the cause of widespread invasion of Eurasian Salicaceae in Patagonian river landscapes?. PloS one 7(12): e50652.
- Triest, L., de Greef, B., de Bondt, R. & van Slycken, J. (2000). RAPD of controlled crosses and clones from the field suggests that hybrids are rare in the *Salix alba-Salix fragilis* complex. Heredity 84(5): 555-563.
- Ueno, S., Tomaru, N., Yoshimaru, H., Manabe, T. & Yamamoto, S. (2000). Genetic structure of *Camellia japonica* L. in an old-growth evergreen forest, Tsushima, Japan. Molecular Ecology: 9(6): 647-656.
- Van der Hulst, R. G. M., Mes, T. H. M., Den Nijs, J. C. M., & Bachmann, K. (2000). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers reveal that population structure of triploid dandelions (*Taraxacum officinale*) exhibits both clonality and recombination. Molecular Ecology: 9(1), 1-8.
- Vazquez-Lobo, Y. A. (1996). Filogenia de hongos endófitos del género Pinus: Implementación de técnicas moleculares y resultados preliminares. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM.
- Verheyen, E., Salzburger, W., Snoeks, J., & Meyer, A. (2003). Origin of the superflock of cichlid fishes from Lake Victoria, East Africa. Science: 300(5617), 325-329.
- Webb, S. A., Graves, J. A., Macias-Garcia, C., Magurran, A. E., Foighil, D. Ó. & Ritchie, M. G. (2004). Molecular phylogeny of the livebearing Goodeidae (Cyprinodontiformes). Molecular Phylogenetics and Evolution 30(3): 527-544.
- Weir, B. S. & Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. Evolution 38(6): 1358 - 1370.
- Weising, K. & Gardner, R. C. (1999). A set of conserved PCR primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. Genome 42(1): 9-19.
- West, R. C. (1964). Surface configuration and associated geology of Middle America. In Handbook of Middle American Indians (eds Wachope, R. y West, R.C). pp. 33-82 University of Texas Press, USA.
- Whitham T.G., Floate K.D., Martinsen G.D., Driebe E.W. & Keim P. (1996) Ecological and evolutionary implications of hybridization: *Populus*-herbivore interactions. In: Biology of Populus and its Implications for Management and Conservation (eds R.F. Stettler, H.D. Bradshaw, P.E. Heilman & T.M. Hinckley), pp. 247–275. NRC. Research Press, Ottawa.
- Woods, S. W. & Cooper, D. J. (2005). Hydrologic factors affecting initial willow seedling establishment along a subalpine stream, Colorado, USA. Arctic, Antarctic, and Alpine Research 37(4): 636-643.

Zalba S, Villamil C (2002) Woody plant invasion in relictual grasslands. Biological Invasions 4:55-72

ANEXOS

Anexo 1

Localidades de colecta para la extracción de ADN foliar de *S. humboldtiana*. Se muestran las localidades, Estado de procedencia y subcuenca de la región hidrológica a la que pertenecen, así como el número de individuos colectados y las coordenadas geográficas en grados decimales. El color de la localidad representa la región hidrológica a la que pertenece la subcuenca: Azul: Lerma, Verde: Balsas, Naranja: Ameca (INEGI 2012).

<i>Localidad</i>	<i>Estado y cuenca</i>	<i>#loc</i>	<i>individuos</i>	<i>Latitud</i>		
				<i>N</i>	<i>O</i>	
Charo	Michoacán (L. Cuitzeo)	1	10	19.737	-101.027	
Queréndaro	Michoacán (L. Cuitzeo)	2	9	19.879	-100.908	
Pénjamo	Michoacán (Lerma)	3	6	20.352	-102.019	
		4	6	20.607	-101.412	
Zamora	Michoacán (Angulo)	5	1	20.169	-102.169	
		Michoacán (Duero)	6	1	20.109	-102.262
			7	1	19.960	-102.339
Sahuayo	Michoacán (Sahuayo)	8	5	20.097	-102.686	
Jiquilpan	Michoacán(Sahuayo)	9	6	19.995	-102.617	
				19.983	-102.646	
Cotija	Michoacán(Itzicuaru)	10	6	19.830	-102.666	
Tocumbo	Michoacán (Itzicuaru)	11	9	19.763	-102.618	
Lombardía	Michoacán (La Parota)	12	6	18.577	-99.298	
Yautepec	Morelos (Yautepec)	13	10	18.907	-98.990	
		14	9	18.874	-99.067	
El Estudiante	Morelos (Amacuzac)	15	8	18.577	-99.298	
Cuauachichinola	Morelos (Amacuzac)	16	10	18.683	-99.382	
Tetecala	Morelos (Amacuzac)	17	2	18.743	-99.425	
San Alejo	Edo de Méx. (Amacuzac)	18	12	18.848	-99.731	
La Finca	Edo de Mex (Amacuzac)	19	5	18.904	-99.660	
San Antonio Matute	Jalisco (Ameca)	20	11	20.563	103.954	
Total	12 Cuencas	20	133			

Anexo 2

Protocolo miniprep para aislamiento de DNA de plantas (Doyle, Doyle 1987) modificado por (Vázquez-Lobo, 1996).

1. Moler en un mortero un máximo de 500mg de tejido con nitrógeno líquido.
2. Cambiar el tejido pulverizado a un nuevo mortero y agregar 1ml de buffer CTAB2X (Tris-HCL 100mM pH8, NaCL 1.4M, EDTA 20mM, CTAB 2% y β ME 0.3%).
3. Recuperar en un tubo *ependorf* de 1.5ml y centrifugar a 13 000 rpm durante 8 min. a 4°C (puede ser a temperatura ambiente).
4. Eliminar el sobrenadante y resuspender con 600 μ l de buffer CTAB 2X. Incubar en un baño 10 min. a 60°C.
5. Agregar a cada tubo 600 μ l de cloroformo-octanol 24:1, agitar hasta homogeneizar y centrifugar a 7 000 rpm durante 12 min. A 4°C (o hasta que el sobrenadante quede transparente). Una vez recuperado el sobrenadante, este paso se puede repetir agregando sólo 550 μ l de cloroformo-octanol.
6. Trasladar el sobrenadante a un tubo nuevo y precipitar DNA con 2/3 del volumen final (550 μ l Aprox) de isopropanol frío. Incubar de 30 min a 24 h. a -20°C.
7. Centrifugar a 13 000 rpm durante 10 min. A 4°C. Eliminar el sobrenadante.
8. El pellet debe limpiarse con 500 μ l de etanol 70% frío y centrifugar a 13 000rpm durante 2 min. Repetir.
9. Eliminar el sobrenadante, secar en campana y resuspender el pellet con 200 μ l de ddH₂O estéril.

Anexo 3

Microsatélites polimórficos, monomórficos y sin producto de amplificación para *S. humboldtiana*. Se indican las características de los microsatélites así como la secuencia de los oligonucleótidos para cada locus y el marcador fluorescente utilizado. También se indican las condiciones generales de reacción como temperatura de alineamiento y concentración (mM) de MgCl₂ utilizados para amplificar. Marcadores Sb (Barker *et al.* 2003), Cha (Hoshikawa *et al.* 2009), ccmp (Weising y Gardner 1999)

Locus Número de acceso a GeneBank	Repetición	MgCl ₂ (mM)	T °C	Rango de tamaño de los alelos (pb)		Secuencias
				Esperado	Encontrado	
Loci polimórficos en <i>S. humboldtiana</i>						
Sb 201 AF442708	(CT) _n (CA) _n	2.5	50	193-244	172-288	F: CCTCTTTTTCTATTGTGGTCT ^{6FAM} R: GGCATGTATTTTTACTCCAAC
Sb 233 AF442711	(TA) _n (TG) _n	2.5	50	185-235	170-246	F: AAATTACCGTCCAACATAAAGA ^{NED} R: CATTAGCCATGAACAAGTAAA
Cha 475 AB455503	(GT) _n	1.5	50	151-176	130-146	F: AGGGAATGAGAGATGGTAGAGT ^{VIC} R: GGGAAAGTAAGTTGGTGTG
Cha 528 AB455507	(GT) _n	1.5	50	150-166	158-172	F: AGGAGGAAGTCAGATTCAC ^{6FAM} R: ATTCCATTA AAAAGTCAATCA
Cha 580 AB455509	(CT) _n (CA) _n	2	53	259-271	234-248	F: TTCGGTCTCGGAAACCTATG ^{NED} R: CCCCACAACGCAATATC
Cha 591 AB455510	(CT) _n	2	53	144-172	146-164	F: CCACGCATTACAAGTATCTC ^{PET} R: GCGAATTACAGCTAAGAC
Cha 621 AB455512	(GT) _n	2	53	146-154	128-365	F: TCCACCTGTAAGAACCTATC ^{6FAM} R: CCCTCCAGACTCATTGTC
*ccmp2	A _n	1.5	50	189	208-216	F: GATCCCGGACGTAATCCTG ^{NED} R: ATCGTACCGAGGGTTCGAAT
Loci nucleares monomórficos en <i>S. humboldtiana</i>						
Sb 80 AF442696	(TC) _n	3	53	115-143		F: TAATGGAGTTCACAGTCCTCC R: ATACAGAGCCCATTTCATCAC
Sb 194 AF442704	(CA) _n	2.5	53	108-152		F: TGTGAGATAAGATTTGTCGGT R: CCATAAATAAAAAACGTGAAC
Sb 196 AF442705	(GCC) _n	3	50	169-184		F: CTGTTTCCTGCCACTATTACC R: TATAATCTGTCTCCTTTTGGC
Sb 243 AF442694	(GCC) _n ATCATT CCCC[GCC] _n	2.5	50	102-113		F: ATTCCTTTCTTCATCAGTAGC R: GACAACGCCATTACATGACC
Cha 472 AB455502	(CT) _n	1.5	50	163-179	-	F: GCCTCACCAAAGAAGCATCAAC R: AACCAATTCCGTCGTCATTA
Loci nucleares que no amplificaron en <i>S. humboldtiana</i>						
Sb 24 AF442691	(TG) _n			114-281		F: ACTTCAATCTCTGTATTCT R: CTATTTATGGGTTGGTTCGATC
Sb 38 AF442692	(TG) _n			116-144		F: CCACTTGAGGAGTGTAAAGGAT R: CTTAAATGTAAAACCTGAATCT
Sb 93 AF442699	(GT) _n			159-185		F: GACGCACATACACCATTACAC R: TGTTAGAAAATTAGGCACGGA
Sb 199 AF442705	(TG) _n CG(TG) _n			102-140		F: CTATTTGGTCTCAATCACCTT R: CTTTACCTCAGAAAATCCAGA
Cha 522 AB455506	(GA) _n			86-144		F: AACGTAGCAAGTATAGCGA R: ATGTGGCAGAGATGTTTACAAG

Especies donde se han probado los primers Sb

S. aegyptiaca L. (*S. medemii* Boiss.), *S. alba* L. spp. *vitellina*, *S. appenina* Skv., *S. aurita* L., *S. candida* Flugge ex Willd., *S. caprea* L., *S. cinerea* L., *S. cordata* Michx., *S. daphnoides* Vill., *S. discolor* Muhl., *S. fragilis* L., *S. gigliana* Seem., *S. glaucophylloides* Fern., *S. gracilistyla* Miq., *S. hookeriana* Barratt, *S. himalayas* Heybr., *S. kotens* L., *S. kinuiyanagi* Kim., *S. koriyanagi* Kim., *S. miyabeana* Seem., *S. myricoides hastata* (*S. myricoides* x *S. hastata* Muhlenb. L.), *S. nigricans* Sm. (*S. myrsinifolia* Salisb.), *S. phyllicifolia* L., *S. purpurea* L., *S. rehderiana* Schneid., *S. eriocephala* Michx. (*S. rigida* Muhlenb.), *S. rossica* Nasarov, *S. sachalinensis* F. Schmidt, *S. serissaefolia* Kim., *S. sitchensis* (*S. bebbiana* Sarg.), *S. triandra* L. *S. aquatica* L., *S. aurita* L., *S. cordata* Michx., *S. hookeriana* Barratt, *S. koriyanagi* Kim., *S. nigricans* Sm. (*S. myrsinifolia* Salisb.), *S. sitchensis* (*S. bebbiana* Sarg.), *S. viminalis* x *S. schwerinnii*, *S. burjatica* x *S. viminalis*, *S. kotens* L., *S. kinuiyanagi* Kim., *S. koriyanagi* Kim., *S. schwerinnii* L., *S. aurita* x *S. cinerea* x *S. viminalis* L., *S. aurita* L., *S. dasyclados* L., *S. cinerea* L., *S. daphnoides* Vill. *S. glaucophylloides* Fern., *S. rehderiana* Schneid., *S. appenina* Skv., *S. aquatica* L., *S. discolor* Muhl., *S. kotens* L., *S. myricoides hastata* (*S. myricoides* x *S. hastata* Muhlenb. L.), *S. viminalis* x *S. schwerinnii*, *S. burjatica* x *S. viminalis*, *S. sachalinensis* F. Schmidt, *S. hookeriana* Barratt

Especies donde se han probado los primers Cha

S. pentandra, *S. urbaniana*, *S. reinii*, *S. jessoensis*, *S. hukaoana*, *S. rorida*, *S. arbutifolia*, *P. maximowiczii*

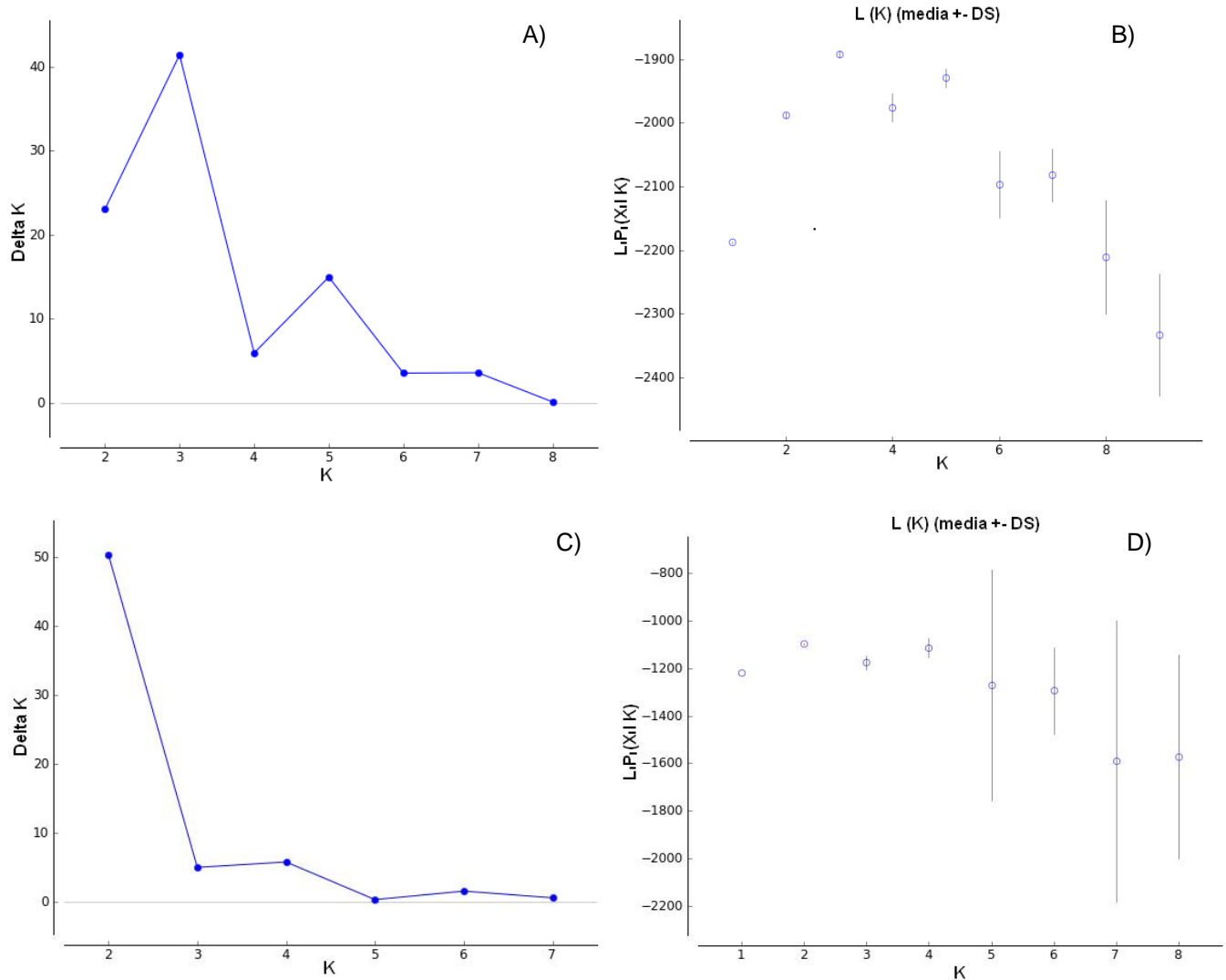
Anexo 4

Se muestran los individuos que se clasificaron como clonales para *S. humboldtiana* analizados con 7 microsatélites nucleares en las regiones hidrológicas del Ameca, Balsas y Lerma. Así como la localidad a la que pertenecen y el número de genotipo identificado como clonal.

Localidad	# de Genotipo clonal	Individuos
Querendaro	13	13, 14, 15 y 17 Que
	15	18, 19 Que
Sahuayo	86	1, 2, 3 y 5 Saha
Yautepec	23	8, 14 y 15 More
San Alejo	57	3 y 6 SnAle
Cuahuachichinola	72	7 y 9 Cuaua
La Finca	117	4 y 5 Finca
San Antonio Matute	50	6, 7 y 11 SnMat
Lombardia		1, 5 Lomb

Anexo 5

Comparación del número estimado de grupos diferentes obtenidos a partir de Structure después de realizar la prueba de Evano



A) Estimación de grupos genéticos (ΔK) obtenidos después de realizar la prueba de Evano utilizando los 7 loci de microsatélite. B) Probabilidad logarítmica posterior de determinados grupos genéticos ($LP(X | K)$ K=1 hasta K=12, con 60 corridas independientes para cada K).

C) Estimación de grupos genéticos (ΔK) obtenidos después de realizar la prueba de Evano cuando se retiraron los loci con microsatélites imperfectos. D) Probabilidad logarítmica posterior de determinados grupos genéticos ($LP(X | K)$ K=1 hasta K=12, con 60 corridas independientes para cada K).

Anexo 6

Lista de alelos privados para los loci de microsatélites nucleares por población, locus y su frecuencia

Población	Locus	Alelos	Frecuencia
LERMA	Cha580	242	0.031
	Cha591	158	0.031
	Sb201	174	0.023
	Sb201	208	0.045
	Sb201	212	0.182
	Sb201	216	0.023
	Sb233	230	0.053
	Sb233	242	0.053
QUERÉNDARO	Sb201	204	0.250
SAHUAYO/ITZÍCUARO	Cha591	156	0.143
	Cha 475	132	0.100
	Cha 475	142	0.200
	Sb233	202	0.050
ITZÍCUARO	Sb201	244	0.063
LAPAROTA	Sb233	194	0.250
YAUTEPEC	Cha 621	128	0.071
	Cha 621	136	0.036
	Sb201	172	0.167
	Sb201	188	0.167
	Sb233	246	0.125
AMACUZAC	Sb201	248	0.042
	Sb201	250	0.021
	Sb201	258	0.208
	Sb201	262	0.021
	Sb201	288	0.021
	Sb233	210	0.083
AMECA	Cha580	248	0.125
	Cha528	168	0.500

Anexo 7a

Valores de F_{IS} y frecuencia de alelos nulos para cada locus en cada grupo genético obtenido a partir de Geneland. La frecuencia de alelos nulos para cada locus en cada grupo genético se muestra entre paréntesis. Los valores en negritas indican un exceso o déficit de heterocigotos con una $q < 0.05$. Los espacios vacíos representan que para dicha población no fue posible calcular F_{IS} debido a que hay muy pocos alelos

	Ler	Qe	Sah	Itzí	Pa	Yau	Ama	Am
Cha580	0.037 (0.04)	-1.000 (0)	0.344 (0.0961)	0.050 (0)	- (0.001)	-0.425 (0)	0.218 (0.0614)	0.229 (0.0527)
Cha623	-0.648^{EH} (0)	0.412 (0.1429)	-0.462 (0)	-0.471 (0)	-0.200 (0)	-0.349 (0)	-0.488^{EH} (0)	-0.412 (0)
Cha591	0.147 (0.038)	-0.579 (0)	0.192 (0.0527)	-0.011 (0)	- (0.001)	-0.338 (0)	-0.094 (0)	-0.212 (0)
Cha528	-0.081 (0)	-0.539 (0)	0.020 (0.0123)	-0.153 (0)	- (0.001)	0.790^{DH} (0.1468)	0.605^{DH} (0.1633)	-0.297 (0)
Cha475	0.852 (0.3014)	- (0.001)	0.483^{DH} (0.1784)	1.000^{DH} (0.397)	- 0.001	1.000^{DH} (0.3286)	1.000 (0.3332)	-0.067 (0)
SB201	-0.077 (0)	-0.200 (0)	0.065 (0.0004)	-0.094 (0.0003)	1.000^{DH} (0.269)	0.686^{DH} (0.2488)	0.143 (0.0809)	0.418 (0.1277)
SB233	0.082 (0)	0.565 (0.1709)	0.146 (0.0446)	0.415 (0.1302)	0.790^{DH} (0.3301)	0.775^{DH} (0.3268)	-0.046 (0)	0.597^{DH} (0.2297)

DH: deficiencia de heterocigotos; **EH:** Exceso de heterocigotos.

Índices de diferenciación con y sin corrección ENA. Los valores de F_{ST} fueron calculados según Weir y Crockerham (1984) y después fueron recalculados (F_{ST-ENA}) utilizando la corrección de ENA descrita en Chapuis y Estoup (2007).

Locus	F_{ST}	F_{ST-ENA}
Cha580	0.221762	0.209823
Cha623	0.019724	0.017536
Cha591	0.222605	0.223073
Cha528	0.395292	0.351698
Cha475	0.271104	0.253843
SB201	0.191973	0.161961
SB233	0.304794	0.305445

Anexo 7b

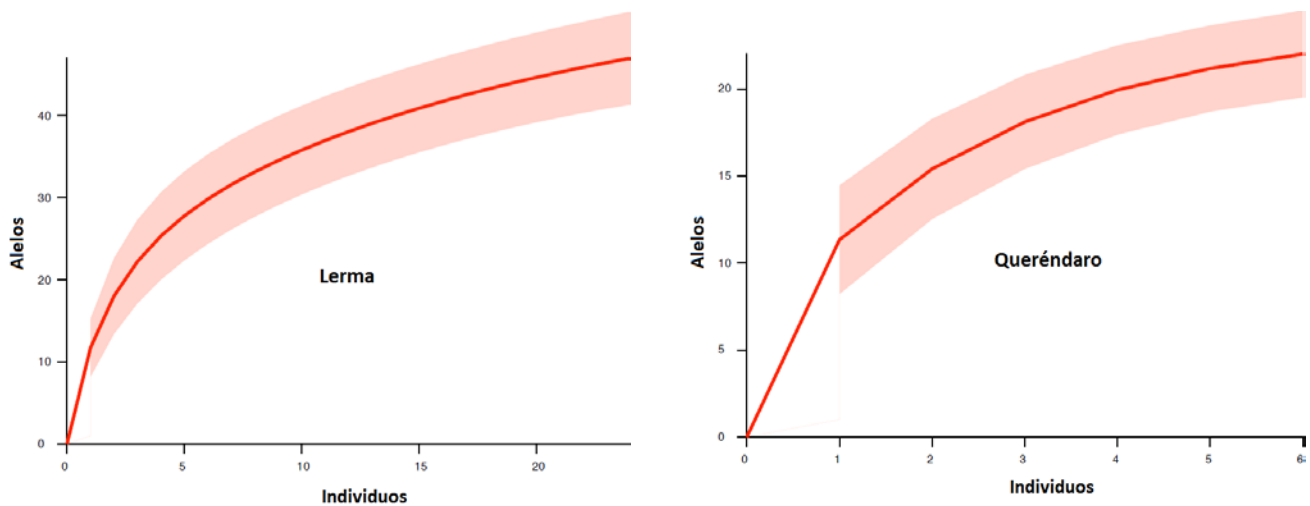
Desequilibrio de ligamiento. Debajo de la diagonal se muestra el valor de χ^2 y los grados de libertad, arriba de la diagonal se muestran los valores de q que fueron corregidos con la prueba de False Discovery Rate.

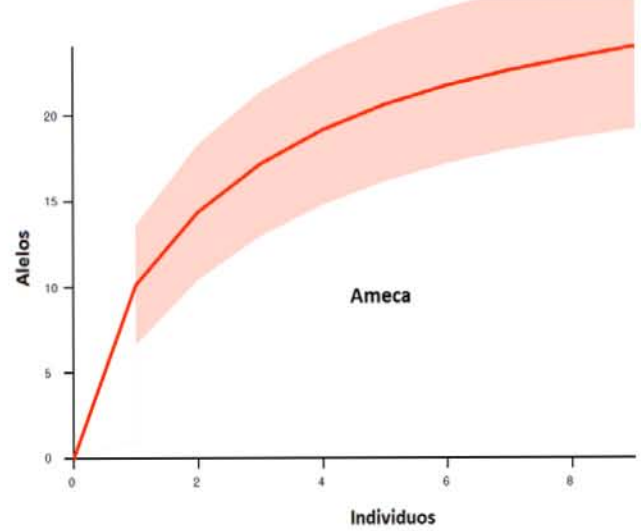
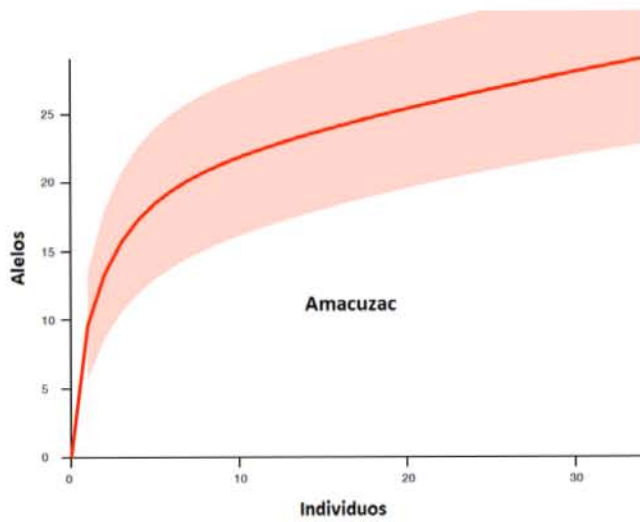
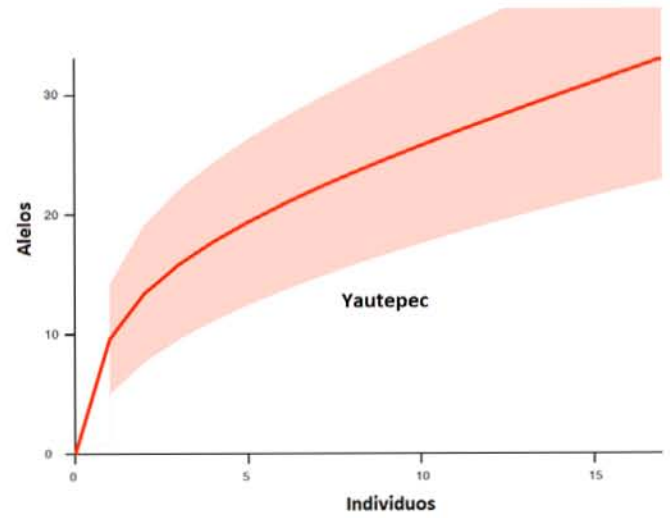
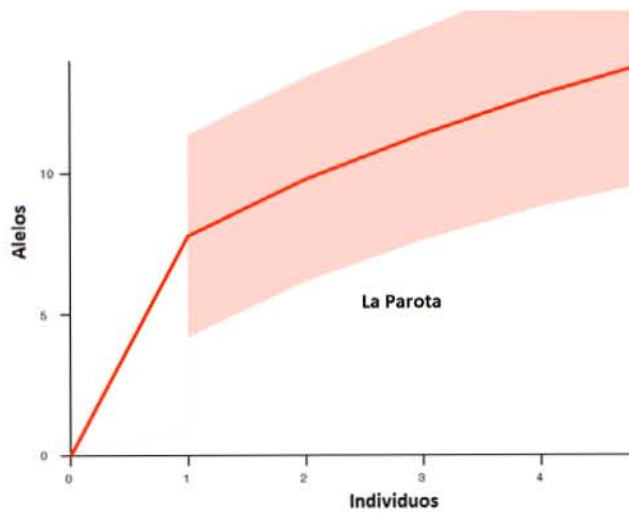
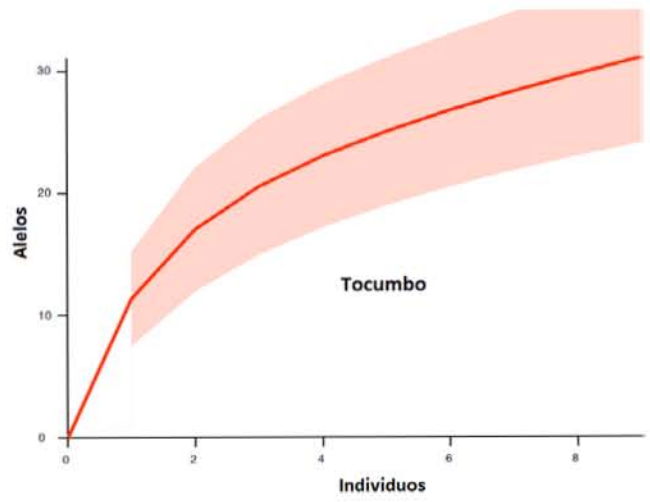
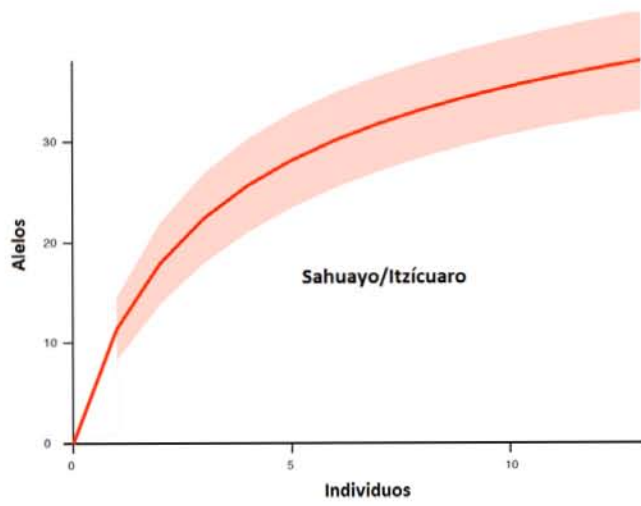
	Cha 580	Cha621	Cha591	Cha528	Cha475	Sb201	Sb233
Cha 580		0.831	0.831	0.831	No info	0.783	0.831
Cha621	1.186 (8)		0.831	0.831	0.831	0.806	0.831
Cha591	0.196 (4)	6.437 (12)		0.783	No info	0.186	0.806
Cha528	1.505 (4)	3.671 (6)	8.340 (8)		0.4437	0.045*	0.145
Cha475	Not possible	0 (2)	Not possible	3.619 (2)		0.750	0.444
Sb201	3.712 (4)	6.773 (8)	18.496 (10)	21.628 (8)	2.203 (2)		0.027*
Sb233	0.736 (2)	1.207 (8)	3.176 (4)	10.914 (4)	3.560 (2)	21.106 (6)	

* $q < 0.05$ ** $q < 0.01$

Anexo 7c

Curvas de rarefacción para cada grupo genético obtenido con Geneland.





Anexo 8

Análisis de diversidad tomando en cuenta los ríos de la región hidrológica del Lerma

Rio	He	Ho
Charo	0.733	0.796
Queréndaro	0.669	0.777
Lerma	0.70859	0.702
Duero	0.704	0.571
Sahuayo	0.66	0.696

Anexo 9

Matriz de diferenciación genética obtenida para el estadístico R_{ST} . Se tomaron en cuenta las doce cuencas hidrológicas dentro de las regiones hidrológicas. Arriba de la diagonal se muestra la matriz de distancia geográfica convertida a ln y debajo de la diagonal los valores de estructuración entre cada par de cuenca. **Cui:** Cuitzeo; **Que:** Queréndaro; **Ler:** Lerma; **Gua:** Guanajuato; **Sah:** Sahuayo; **Itzí:** Itzícuaró; **S.J:** San Juanico; **Par:** Parota; **Yau:** Yautepec, **A. Ama:** Alto Amacuzac; **B.Ama:** Bajo Amacuzac; **Ame:** Ameca.

R_{ST}/ln	Cui	Que	Ler	Gua	Sah	Itzí	S.J	Par	Yau	A. Ama	B. Ama	Ame
Cui		2.6086	4.712	3.846	5.177	5.177	5.207	4.607	5.426	4.979	5.217	5.788
Que	0.044		4.821	4.065	5.248	5.249	5.277	4.733	5.367	4.887	5.144	5.827
Ler	0.228	0.206		4.217	4.206	4.221	4.292	3.366	5.824	5.548	5.689	5.373
Gua	0.004	0.112	0.112		4.904	4.910	4.947	4.173	5.605	5.250	5.435	5.645
Sah	0.251	0.243	0.026	0.168		1.730	1.914	4.381	6.002	5.775	5.889	5.008
Itzí	0.630	0.648	0.434	0.580	0.274		1.721	4.368	6.002	5.774	5.889	5.011
S. J.	0.620	0.628	0.443	0.581	0.229	0.021		4.436	6.015	5.791	5.904	4.974
Par	0.611	0.535	0.434	0.569	0.341	0.332	0.230		5.788	5.496	5.644	5.434
Yau	0.371	0.224	0.258	0.343	0.265	0.390	0.305	0.097		4.413	3.780	6.317
A. Ama	0.798	0.751	0.732	0.783	0.712	0.719	0.683	0.397	0.305		3.663	6.156
B. Ama	0.846	0.815	0.798	0.842	0.781	0.798	0.779	0.523	0.327	-0.012		6.236
Ame	0.403	0.476	0.358	0.372	0.153	0.339	0.297	0.506	0.433	0.785	0.841	

Anexo 10

Matrices de escenarios de migración utilizados en el programa Migrate, para las regiones hidrológicas de Ameca, Balsas y Lerma.

1) Migración entre todas las poblaciones

		Destino		
		Lerma	Balsas	Ameca
O ri g e n	Lerma	⊖	*	*
	Balsas	*	⊖	*
	Ameca	*	*	⊖

2) Migración entre Lerma y Ameca

		Destino		
		Lerma	Balsas	Ameca
O ri g e n	Lerma	⊖		*
	Balsas		⊖	
	Ameca	*		⊖

3) Migración entre Ameca y Balsas

		Destino		
		Lerma	Balsas	Ameca
O ri g e n	Lerma	⊖		
	Balsas		⊖	*
	Ameca		*	⊖

4) Migración entre Lerma y Ameca y de Ameca a Balsas

		Destino		
		Lerma	Balsas	Ameca
O ri g e n	Lerma	⊖		*
	Balsas		⊖	*
	Ameca	*	*	⊖

5) Migración entre Lerma y Balsas

		Destino		
		Lerma	Balsas	Ameca
O ri g e n	Lerma	⊖	*	
	Balsas	*	⊖	
	Ameca			⊖

Anexo 11

Lista de claves de proyectos y responsables que proveyeron información en esta consulta REMIB.

Responsable del proyecto CONABIO: AC 2 54

*Formación del banco de datos del herbario (UCAM)
Morelos*

Número de registros aportados por el proyecto: 6
proyecto: 1

M en C. Pedro Zamora Crescencio
yecver@hotmail.com
Centro de Investigaciones Históricas y Sociales
Universidad Autónoma de Campeche
Morelos

Av Agustín Melgar s/n, Lindavista
Campeche, Cam, 24030, México
Tel/Fax: (981) 816 33 23
e-mail: pezamora@mail.uacam.mx
Año: 2005

Responsable del proyecto CONABIO: AE 13¹ 3

*Catálogo electrónico de especímenes depositados en el Herbario de la
datos de la colección de herbario*

Universidad de Texas en Austin, Fase IV

Número de registros aportados por el proyecto: 37
proyecto: 3

Dr. José Luis Panero
Herbarium
The University of Texas
Plant Resources Center,
Austin, Texas, ND, TX 78713, Estados
tel:001(512)232 2796, 2232, 1990 Fax: 001(512)471
e-mail: panero@mail.utexas.edu
Año: 2003

Responsable del proyecto CONABIO: B 123 7

*Lista florística de la Costa Grande del estado de Guerrero
Fase IV. Base de datos de la*

clase Magnoliopsida

M en C. Nelly Diego Pérez
Nacional de Ciencias Biológicas,

Laboratorio de Plantas Vasculares
Departamento de Biología
proyecto: 68

Facultad de Ciencias
Universidad Nacional Autónoma de México
Av Universidad # 3000, Ciudad
México, DF, 04510, México
Tel: 622 4921
e-mail: nelly@servidor.unam.mx
Año: 1997

Responsable del proyecto CONABIO: B 140

*Actualización de las bases de datos de colecciones, especies en peligro de
extinción, colecta y propagación de germoplasma*

Número de registros aportados por el proyecto: 3
Dr. Andrew Peter Vovides Papalouka

18

Departamento de Sistemática Vegetal
las regiones áridas y semiáridas
División de Vegetación y Flora
Instituto de Ecología AC

proyecto: 2
Km 2.5 Antigua Carretera a Coatepec #
351, Congregación El Haya

Responsable del proyecto CONABIO: B

Inventario florístico de la Sierra de Huautla,

Número de registros aportados por el

Dr. Oscar Roberto Dorado Ramírez
Departamento de Sistemática y Evolución
Centro de Investigación en Biodiversidad y
Universidad Autónoma del Estado de

Av Universidad # 1001, Chamilpa
Cuernavaca, Mor, 62210, México
01 (777) 329-70 19
e-mail: odorado@uaem.mx
Año: 1997

Responsable del proyecto CONABIO: BC

Actualización e incremento del banco de

del Jardín Etnobotánico de Oaxaca

Número de registros aportados por el

Ing. César Chávez Rendón
jetnobot@prodigy.net.mx
Jardín Etnobotánico de Oaxaca
Centro Cultural Santo Domingo
Reforma s/n esq Constitución, Centro
Oaxaca, Oax, 68000, México
01 (951) 51 6 79 15 y (951) 51 6 76 72
Año: 2006

Responsable del proyecto CONABIO: BC

Computarización del Herbario ENCB, IPN.

*familia Pinaceae y de distintas familias de la
depositadas en el Herbario de la Escuela*

IPN

Número de registros aportados por el

Dr. Rafael Fernández Nava
rfernannmex@gmail.com
Departamento de Botánica
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Instituto Politécnico Nacional
Prolongación de Carpio y Plan de Ayala
s/n, Casco de Santo Tomás
México, DF, 11340, México
5729 6000 ó 5729 6300 ext. 62331
e-mail: rfernann@ipn.mx
Año: 2007

Responsable del proyecto CONABIO: BE

Conservación del germoplasma vegetal en

de México

Número de registros aportados por el

Dra. Patricia Dávila Aranda
Unidad de Biotecnología y Prototipos

Xalapa, Ver, 91070, México
01 (228) 842 1800 ext 3007; fax (228) 818 6009
e-mail: andrew.vovides@inecol.edu.mx
Año: 1111

Responsable del proyecto CONABIO: A 7

Flora de la Reserva de la Biósfera Sierra de Manantlán, Jalisco-Colima, México

Número de registros aportados por el proyecto: 8
Ing. Francisco Santana Michel
Instituto Manantlán de Ecología y Conservación de la Biodiversidad
Departamento de Ecología y Recursos Naturales
División de Desarrollo Regional
Centro Universitario de la Costa Sur
Av Independencia Nacional # 151,
Autlán de Navarro, Jal, 48900, México
Tel: 01(317) 3825010; (317) 3810295 ext. 7152
e-mail: fsantanam@cucsur.udg.mx
Año: 1111

Responsable del proyecto CONABIO: BE 5

28

Inventario Florístico de la Reserva de la Biósfera La Sepultura del Corredor Fase

Biológico Sierra Madre del Sur. Fase II

proyecto: 2

Número de registros aportados por el proyecto: 2

M en C. Mario Sousa Sánchez
Herbario Nacional MEXU
Departamento de Botánica
Instituto de Biología
Universidad Nacional Autónoma de México
Av Universidad # 3000, Ciudad
México, DF, 04510, México
Tel: 622 9113 Fax: 5550 1760
e-mail: sousa@servidor.unam.mx
Año: 2006

4

Responsable del proyecto CONABIO: BK 31

Flora acuática vascular y de zonas inundables del área de protección de flora y

proyecto: 5

fauna Laguna de Términos, Campeche, México

Número de registros aportados por el proyecto: 10

Dr. Jaime Raúl Bonilla Barbosa
Laboratorio de Hidrobotánica
Departamento de Biología Vegetal
Centro de Investigaciones Biológicas
Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Av Universidad # 1001, Chamilpa
Cuernavaca, Mor, 62210, México
(777) 329-7029 extensión 3215

141

e-mail: bonilla@uaem.mx

Morelos, México

Año: 2007

proyecto: 8

Responsable del proyecto CONABIO: EC 9

Sistematización de la colección científica de flora del herbario Eizi Matuda de la Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas: segunda etapa

Número de registros aportados por el proyecto: 6

Dr. Miguel Ángel Pérez Farrera

Morelos

perezfarreram@yahoo.com.mx

Herbario Eizi Matuda

Escuela de Biología

Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas

Libramiento Norte Poniente s/n, Lajas

Tuxtla Gutiérrez, Chis, 29039, México

146

Tel y fax: 961-191210894

de la Península de Yucatán

Unidad de Biotecnología y Prototipos
División de Investigación y Posgrado
Facultad de Estudios Superiores Iztacala
Universidad Nacional Autónoma de México
Av de los Barrios # 1, Los Reyes Iztacala
Tlalnepantla, Mex, 54090, México
5623 1219; 5623 1134
e-mail: pdavilaa@servidor.unam.mx
Año: 2006

Responsable del proyecto CONABIO: F

Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán: II

Número de registros aportados por el

Dra. Patricia Dávila Aranda
Herbario Nacional MEXU
Departamento de Botánica
Instituto de Biología
Universidad Nacional Autónoma de México
Av Universidad # 3000, Ciudad
México, DF, 04510, México
5622 9113
e-mail: pdavilaa@servidor.unam.mx
Año: 1998

Responsable del proyecto CONABIO: FE

La familia Asteraceae en México, fase V

Número de registros aportados por el

Dr. José Luis Villaseñor Ríos
Departamento de Botánica
Instituto de Biología
Universidad Nacional Autónoma de México
Av Universidad # 3000, Ciudad
México, DF, 04510, México
Tel: 5622 9120, Fax: 5550 1760
e-mail: vríos@ibiologia.unam.mx
Año: 2008

Responsable del proyecto CONABIO: H

Flora acuática vascular del estado de

Número de registros aportados por el

Dr. Jaime Raúl Bonilla Barbosa
Laboratorio de Hidrobotánica
Departamento de Biología Vegetal
Centro de Investigaciones Biológicas
Universidad Autónoma del Estado de

Av Universidad # 1001, Chamilpa

Cuernavaca, Mor, 62210, México

(777) 329-7029 extensión 3215

e-mail: bonilla@uaem.mx

Año: 1999

Responsable del proyecto CONABIO: H

Actualización del banco de datos florístico

e-mail: miguel.perez@unicach.mx

Año: 1111

proyecto: 2

Responsable del proyecto CONABIO: F 19

Árboles de Chiapas: registro georreferenciado de los ejemplares depositados en el herbario de la Academia de Ciencias de California (CAS)

Zootecnia

Número de registros aportados por el proyecto: 18

Dr. Mario González Espinosa

Departamento de Ecología y Sistemática Terrestre

División de Conservación de la Biodiversidad

El Colegio de la Frontera Sur

Carretera Panamericana y Periférico Sur

s/n, María Auxiliadora

76

San Cristóbal de Las Casas, Chis, 29290,

e-mail: mgonzale@sclc.ecosur.mx

proyecto: 7

Año: 1998

Responsable del proyecto CONABIO: J 10

Catálogos florísticos de México por entidad federativa e información etnobotánica de la Colección del Herbario Nacional Biól. Luciano Vela Gálvez (INIF)

Número de registros aportados por el proyecto: 1

Biól. Marcela Verónica Gutiérrez Garduño

Herbario Nacional Forestal "Biól Luciano Vela Gálvez"

Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Conservación y

Mejoramiento de Ecosistemas Forestales

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias

Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural

Av Progreso # 5, Viveros de Coyoacán

México, DF, 04110, México

Tel: 554 3035, 554 0357, 554 7987, 658 3596 ext. 106, 554 3035 ext.

106 Fax: 658 3556, 658 0600

Año: 1999

Responsable del proyecto CONABIO: J 2

222

Inventario nacional de especies vegetales y animales de uso artesanal vascular de la reserva de la biosfera

Número de registros aportados por el proyecto: 20

Antrop. Carlos Bravo Marentes

proyecto: 13

amacup@mail.internet.com.mx

Asociación Mexicana de Arte y Cultura Popular AC

Río Amazonas # 19, Cuauhtémoc

México, DF, 06500, México

Tel: 566 6482 Tel/Fax: 592 7360

Año: 1999

Responsable del proyecto CONABIO: J 63

Sistema de apoyo a la toma de decisiones para la reforestación rural en México

Número de registros aportados por el proyecto: 11

M en C. Diego David Reygadas Prado

85

dreygadas@yahoo.com.mx

región de Nizanda en el Istmo de

Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales

proyecto: 1

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales,

Tel: 554 3035 ext. 111, 554 5833, 554 7987 ext. 111,

658 3596 ext. 111 Fax: 554 8849

Año: 1999

Responsable del proyecto CONABIO: J 84

Árboles mexicanos potencialmente valiosos para la restauración ecológica y la reforestación

Número de registros aportados por el proyecto: 19

(BAFLOPY)

Número de registros aportados por el

Dr. José Salvador Flores Guido

Departamento de Botánica

Facultad de Medicina Veterinaria y

Universidad Autónoma de Yucatán

Km 15.5 Carretera Mérida-Xmatkuil s/n,

Mérida, Yuc, 97100, México

Tel: 01(999) 9423216 Fax: (999) 9423205

e-mail: fguido@uady.mx

Año: 1999

Responsable del proyecto CONABIO: H

Flora acuática de Querétaro

Número de registros aportados por el

Dra. Mahinda Martínez y Díaz Salas

Licenciatura en Biología

Facultad de Ciencias Naturales

Universidad Autónoma de Querétaro

Cerro de las Campanas s/n, Juriquilla

Querétaro, Qro, 76010, México

Tel: 01(442) 192 1200 ext 5322

e-mail: gomezs@uaq.mx

Año: 1999

Responsable del proyecto CONABIO: L

Inventario de la vegetación acuática

Pantanos de Centla, Tabasco

Número de registros aportados por el

Dr. Alejandro Novelo Retana

Herbario Nacional MEXU

Departamento de Botánica

Instituto de Biología

Universidad Nacional Autónoma de México

Av Universidad # 3000, Ciudad

México, DF, 04510, México

Tel: 5622 9121(directo) Fax: 5622 9093

e-mail: Finado

Año: 2000

Responsable del proyecto CONABIO: L

Estudio de la diversidad florística de la

Tehuantepec, Oaxaca

Número de registros aportados por el

Dr. Jorge Arturo Meave del Castillo

Laboratorio de Ecología

Departamento de Biología

Facultad de Ciencias

Universidad Nacional Autónoma de México

Av Universidad # 3000, Ciudad

México, DF, 04510, México

Tel: 5622 4835 Fax: 5622 4828

Dr. Carlos Vázquez Yanes
Laboratorio de Ecología Fisiológica
Departamento de Ecología Funcional y Aplicada
17²

Instituto de Ecología
Herbario del Instituto de
Universidad Nacional Autónoma de México
Av Universidad # 3000, Ciudad
proyecto: 77
México, DF, 04510, México
e-mail: Finado
Año: 1999

Responsable del proyecto CONABIO: K 4

Actualización de las bases de datos del Herbario del Instituto de Ecología, AC (XAL)

Número de registros aportados por el proyecto: 63
1321, 91(28)18

Dr. Francisco Lorea Hernández
Herbario XAL

División de Vegetación y Flora

38

Instituto de Ecología AC
Catuzajá-Emiliano Zapata
Km 2.5 Antigua Carretera a Coatepec #
proyecto: 3
351, Congregación El Haya
Xalapa, Ver, 91070, México
Sociales
Tel: 01(228) 842 1800 ext 3003;
e-mail: francisco.lorea@inecol.edu.mx
Año: 1111

Responsable del proyecto CONABIO: L 138

Flora de la reserva de la biósfera de los Pantanos de Centla, en el estado de Tabasco, México

Número de registros aportados por el proyecto: 2

Biól. María de los Angeles Guadarrama Olivera
Herbario

División Académica de Ciencias Biológicas

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco

Km 0.5 carretera Villahermosa-Cárdenas

entronque Bosque de Saloya,

Villahermosa, Tab, 86000, México

Tel/Fax: 01 (93)54 4308

e-mail: molivera@cicea.ujat.mx

Año: 2000

Responsable del proyecto CONABIO: P 140

Sistematización del Herbario Nacional Forestal Biól Luciano Vela

Número de registros aportados por el proyecto: 13

Biól. Marcela Verónica Gutiérrez Garduño, Herbario Nacional Forestal "Biól Luciano Vela Gálvez", Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Conservación y Mejoramiento de Ecosistemas Forestales, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Av Progreso # 5, Viveros de Coyoacán, México, DF, 04110, México

Tel: 554 3035, 554 0357, 554 7987, 658 3596 ext. 106, 554 3035. 106 Fax: 658 3556, 658 0600

Año:1999

Página 3 de **Responsable del proyecto CONABIO: S 133**

12

Inventario de la vegetación acuática vascular de cuatro regiones hidrológicas focal), Chiapas, México

prioritarias del centro de México

proyecto: 2

Número de registros aportados por el proyecto: 10

Dr. Alejandro Novelo Retana

Herbario Nacional MEXU

Departamento de Botánica

Instituto de Biología

Universidad Nacional Autónoma de México

Av Universidad # 3000, Ciudad

e-mail: jorge.meave@ciencias.unam.mx

Año: 2000

Responsable del proyecto CONABIO: Q

Etapa final de la captura y catalogación del

Ecología, AC, Centro Regional del Bajío

Número de registros aportados por el

Lic Comp. Lamberto Aragón Axomulco

División de Vegetación y Flora

Instituto de Ecología AC

Km 2.5 Antigua Carretera a Coatepec #

351, Congregación El Haya

Xalapa, Ver, 91070, México

Tel: 91(28)16 0000, 91(28)18 6000 ext.

e-mail: aragonl@ecologia.edu.mx

Año: 2001

Responsable del proyecto CONABIO: R

La vegetación y flora de las Lagunas de

Número de registros aportados por el

Biól. Celso Gutiérrez Báez

Centro de Investigaciones Históricas y

Universidad Autónoma de Campeche

Av Agustín Melgar s/n, Lindavista

Campeche, Cam, 24030, México

Tel/Fax: 91(981)1 3070

e-mail: Cgutierr@balamku.uacam.mx

Año: 2001

Responsable del proyecto CONABIO: Y

Inventario florístico de la Fraileskana (zona

Número de registros aportados por el

Dr. Miguel Ángel Pérez Farrera

perezfarreram@yahoo.com.mx

Herbario Eizi Matuda

Escuela de Biología

Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas

Libramiento Norte Poniente s/n, Lajas

Tuxtla Gutiérrez, Chis, 29039, México

México, DF, 04510, México
Tel: 5622 9121(directo) Fax: 5622 9093
e-mail: Finado
Año: 2002

Tel y fax: 961-191210894
e-mail: miguel.perez@unicach.mx
Año: 2004

Responsable del proyecto CONABIO: S 58

Flora acuática vascular de las regiones hidrológicas R66 (Lagos Cráter del Nevado de Toluca) y R67 (Río Amacuzac-Lagunas de Zempoala), México
Número de registros aportados por el proyecto: 11

Dr. Jaime Raúl Bonilla Barbosa
Laboratorio de Hidrobotánica
Departamento de Biología Vegetal
Centro de Investigaciones Biológicas
Universidad Autónoma del Estado de Morelos
Av Universidad # 1001, Chamilpa
Cuernavaca, Mor, 62210, México
(777) 329-7029 extensión 3215
e-mail: bonilla@uaem.mx
Año: 2002

Responsable del proyecto CONABIO: S 78

Flora vascular acuática de la cuenca del Río Tamesí
Número de registros aportados por el proyecto: 24

Dr. Arturo Mora Olivo
Instituto de Ecología Aplicada
Universidad Autónoma de Tamaulipas
División del Golfo # 356, Libertad
Ciudad Victoria, Tam, 87019, México
Tel.: 01 (834) 3181800 Ext. 1607
e-mail: amorao@uat.edu.mx
Año: 2003

Responsable del proyecto CONABIO: T 4

Base de datos para la xiloteca del Instituto de Biología de la UNAM
Número de registros aportados por el proyecto: 1

M en C. Josefina Barajas Morales
Departamento de Botánica
Instituto de Biología
Universidad Nacional Autónoma de México
Av Universidad # 3000, Ciudad
México, DF, 04510, México
Tel: 5622 5692 al 95 ext 235 Fax: 550 1760
e-mail: barajas@mail.ibiologia.unam.mx
Año: 2001

Responsable del proyecto CONABIO: T 19

Bases de datos del proyecto análisis de la riqueza y el endemismo de la flora de México, con fines de su conservación, usando grupos y métodos selectos

Número de registros aportados por el proyecto: 1
Dr. Oswaldo Téllez Valdés, Herbario Nacional MEXU
Departamento de Botánica, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México
Apartado Postal 70-367, Coyoacán, México, DF, 04510, México
Tel: 622 5695 ext 228 Fax: 550 1760
e-mail: tellez@servidor.unam.mx
Año: 2002

Responsable del proyecto CONABIO: V 46

El banco de datos del Herbario HCIB en línea (Fase I): Implementación del Sistema Biótica

Número de registros aportados por el proyecto: 1
M en C. José Juan Pérez Navarro
División de Biología Terrestre
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste SC
Mar Bermejo # 195, Playa Palo de Santa
La Paz, BCS, 23090, México
Tel: 91(112)5 3633 ext 139, 01(112)5 3633 ext 185
e-mail: jnavarro04@cibnor.mx
Año: 2005