



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

La evaluación de microsatélites en dos poblaciones de *Marathrum rubrum* (Podostemaceae) sugiere la reproducción sexual como principal proceso para la colonización de su hábitat

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

VÍCTOR ALÍ MANCILLA GAYTÁN



DIRECTOR DE TESIS:

DR. JAVIER ANDRÉS JUÁREZ DÍAZ

CIUDAD DE MÉXICO, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Hoja de datos del Jurado

1. Datos del alumno

Mancilla Gaytán Víctor Alí

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

312323134

2. Datos del tutor

Dr. Javier Andrés Juárez Díaz

3. Datos del sinodal 1

Dra. Guadalupe Judith Márquez Guzmán

4. Datos del sinodal 2

Dr. Leonardo Osvaldo Alvarado Cárdenas

5. Datos del sinodal 3

Dra. Erika Aguirre Planter

6. Datos del sinodal 4

M. en C. José Gonzalo Ricardo Wong

7. Datos del trabajo escrito

La evaluación por microsátélites en dos poblaciones de *Marathrum rubrum* (Podostemaceae) sugiere la reproducción sexual como principal proceso para la colonización de su hábitat

47 pp.

2021

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Desarrollo de Plantas/Invernadero del Departamento de Biología Comparada, Facultad de Ciencias, UNAM, como parte del Taller *Biología de la reproducción, propagación y fisiología de angiospermas que viven en ambientes contrastantes*, bajo la dirección del Dr. Javier Andrés Juárez Díaz.

Para la elaboración de este trabajo se contó con el Permiso de colecta No. **SGPA/DGVS/13529/19**, otorgado por la Subsecretaría de Gestión para la Protección Ambiental de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).

Agradecimientos

A mi asesor de tesis, Javier Andrés Juárez Díaz, por haber sido un mentor para mí en el mundo de la biología molecular. Gracias a que tuve la oportunidad de trabajar bajo tu tutela fue que perdí la desconfianza que tenía para trabajar en un laboratorio de biología molecular. Todos los consejos que me diste, las correcciones y observaciones que me hiciste han sido muy enriquecedoras para mí, yo diría que hasta cruciales para mi desarrollo académico. No puedo estar más que agradecido contigo, de verdad, todo mi respeto y aprecio.

A los sinodales, por todas sus observaciones a este trabajo, mismas que ayudaron a mejorarlo.

A todo el Laboratorio de Desarrollo de Plantas, especialmente a la Dra. Judith Márquez Guzmán, al M. en C. José Gonzalo Ricardo Wong y a la M. en C. Mónica Karina Pérez Pacheco, por la asistencia técnica recibida a lo largo del desarrollo de este trabajo, resaltando su valiosa ayuda en el campo. Su apoyo fue fundamental para la elaboración de esta tesis.

A los profesores del Taller (Judith Márquez Guzmán, Mague Collazo Ortega, Sonia Vázquez Santana, Karina Jiménez Durán, Laura Patricia Olguín Santos) por sus comentarios, correcciones, sugerencias y apoyo en la elaboración de este trabajo a lo largo de los dos años del Taller.

A la M. en C. Laura Patricia Olguín Santos por su valioso apoyo y asistencia técnica en el Invernadero de la Facultad de Ciencias.

A la M. en B. María Eugenia Muñiz Díaz de León (Taller de Biología de Plantas I y II), por la asistencia técnica recibida a lo largo del desarrollo de este trabajo, así como su disposición a ayudarnos siempre.

Al Dr. Felipe Cruz García, del Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM, así como al M. en C. Édgar Nájera Torres y a la M. en C. Yuridia Cruz González, por su apoyo y asistencia técnica.

A mi mamá, Marisa Gaytán, por todo el amor y el apoyo que me has dado siempre. Eres una de las responsables de que yo haya podido concluir mi carrera. Siempre voy a estar agradecido contigo por la formación que me has dado.

A mi papá, Rúben Mancilla, por haber sido uno de los más grandes maestros que he tenido. Gran parte de las cosas que he aprendido han venido de ti. Yo no estaría terminando esto de no ser por las oportunidades que me acercaste siempre para conocer la ciencia.

A mis abuelos, por ser siempre tan cariñosos conmigo. Ustedes siempre me han apoyado (de muchas maneras), siempre están pendientes de mí y siempre han visto en mí algo bueno. Este trabajo es también gracias a ustedes.

A mi abuelita “Tita” y mi tía Sol, por haberme rodeado siempre de su cariño y apoyo. Valoro mucho todo lo que han hecho por mí y estaré siempre agradecido con ustedes.

A mis amigos (nakamas), Roger, Gera, Pablito, Kenlly, Hugo y Johar; por haber estado conmigo todos estos años, apoyándome y compartiendo momentos de todo tipo; por todas las retas que echamos y partidos que vimos; por todas esas clases y prácticas que compartimos. Ustedes han sido para mí una segunda familia.

A Pau, por ser una de las personas que más me han apoyado estos años. Me has motivado cuando me sentía inseguro, me has dado consejos y me has ayudado a construir de mí una mejor persona. Gracias por acompañarme en esta etapa de mi carrera.

A Alberto Reyes, por haberme permitido aprender contigo muchas de las cosas que conozco sobre las plantas, por haberme acogido en el herbario en algunos momentos difíciles para mí ahí y por los consejos que me diste.

A mis compañeros de laboratorio, Andre Zaragoza, Diana Arzate, Daniel Muro, Erick Palomo e Isabel Sánchez. A todos ustedes gracias por sus enseñanzas, tips en el laboratorio y, sobre todo, por los buenos momentos que me permitieron tener mientras estuvieron ahí.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	VII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
CARACTERÍSTICAS GENERALES	
DE LA FAMILIA PODOSTEMACEAE.....	2
EFFECTO DE LA REPRODUCCIÓN ASEXUAL	
SOBRE LA VARIABILIDAD GENÉTICA	5
REPRODUCCIÓN ASEXUAL EN PODOSTEMACEAE	6
ANTECEDENTES	7
VARIABILIDAD GENÉTICA EN PODOSTEMACEAE	7
USO DE MARCADORES MOLECULARES	
PARA EL ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA	8
USO DE MARCADORES MOLECULARES	
EN LA FAMILIA PODOSTEMACEAE	9
MICROSATÉLITES	9
MICROSATÉLITES EN <i>M. rubrum</i>	10
JUSTIFICACIÓN	11
HIPÓTESIS	12
OBJETIVO	12
MATERIALES Y MÉTODOS	12
COLECTA DE MATERIAL BIOLÓGICO	12
PURIFICACIÓN DE DNA GENÓMICO	14
AMPLIFICACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES	16

INTERPRETACIÓN DE LOS DATOS MOLECULARES	18
COEFICIENTES DE SIMILITUD PARA VARIABLES CUALITATIVAS DE TIPO DOBLE ESTADO	19
RESULTADOS	21
PURIFICACIÓN DE GDNA DE <i>M. RUBRUM</i>	21
AMPLIFICACIÓN POR PCR DE MICROSATÉLITES A PARTIR DE gDNA DE <i>M. RUBRUM</i>	21
ANÁLISIS DE SIMILITUD.....	24
DISCUSIÓN	33
CONCUSIÓN	36
BIBLIOGRAFÍA	37

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. <i>Marathrum rubrum</i> en diferentes fases de su ciclo de vida	3
FIGURA 2. Ubicación de los sitios de colecta del material vegetativo de <i>M. rubrum</i>	13
FIGURA 3. Representación de la técnica de colecta realizada en cada roca.	14
FIGURA 4. Representación de la interpretación de los datos moleculares y el registro de la información en la matriz básica de datos.....	18
FIGURA 5. Caracterización de dos OTU.....	19
FIGURA 6. Índice de similitud de Jaccard	20
FIGURA 7. Esquema del análisis de agrupamiento con marcadores moleculares	20
FIGURA 8. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de diferentes gDNA de distintas muestras de tejido vegetal de <i>M. rubrum</i>	21
FIGURA 9. Análisis de la amplificación de un microsatélite utilizando el par de oligonucleótidos 29	22
FIGURA 10. Amplificación de un microsatélite utilizando el par de oligonucleótidos 116	24
FIGURA 11. Dendrogramas resultantes utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard a partir de los análisis de amplificación de cada microsatélite	28
FIGURA 12. Dendrogramas resultantes utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard a partir de los análisis de amplificación dos microsátélites (29 y 116).....	29
FIGURA 13. Dendrogramas generados utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard con datos de la amplificación de los microsátélites 29 y 116 de las muestras colectadas en las dos localidades por separado	30
FIGURA 14. Dendrogramas generados utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard con datos de la amplificación de los microsátélites 29 y 116 de las muestras colectadas en las dos localidades	32

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los siete microsatélites identificados en <i>M. rubrum</i>	11
TABLA 2. Cantidades necesarias de los reactivos que se requieren para la preparación del amortiguador de lisis.	16
TABLA 3. Secuencias de los tres pares de oligonucleótidos generados en el laboratorio para su uso en la amplificación de microsatélites en <i>M. rubrum</i>	17
TABLA 4. Matriz básica de datos obtenidos a partir de la amplificación por PCR de los microsatélites ...	25
TABLA 5. Coeficiente de similitud de Jaccard (I_j) obtenido a partir del análisis con el programa PAST (Hammer <i>et al.</i> , 2001) de los microsatélites amplificados	26

Resumen

La familia Podostemaceae es la más diversa de las angiospermas acuáticas, comprende aproximadamente 48 géneros y cerca de 270 especies. Crecen adheridas a sustratos sólidos, principalmente rocas, sumergidas en el agua de ríos y cascadas. El hábito de crecimiento de las angiospermas acuáticas dificulta una generalización de lo que constituye a sus poblaciones y, por lo tanto, de cómo se debe realizar su estudio a nivel genético, ya que generalmente su propagación es por vía asexual. Sin embargo, se ha reportado que la especie *Marathrum rubrum* Novelo y Philbrick llega a producir aproximadamente 500 semillas por fruto y los frutos se producen por miles en cada población. Esto sugiere que la propagación por semilla, es decir, reproducción sexual, es un proceso relevante en la biología de las podostemáceas, lo cual contrasta con el patrón general de otras angiospermas acuáticas que muestran una baja propagación por la vía sexual. Por otra parte, el género *Marathrum* presenta una importante plasticidad fenotípica y un gran polimorfismo, además, su crecimiento en forma de parches de vegetación sobre el sustrato dificulta determinar si su propagación es sexual o asexual.

Con la finalidad de evaluar la variabilidad genética intrapoblacional en plantas de *M. rubrum* que habitan en dos ríos del estado de Jalisco (Las Juntas y Horcones), utilizando microsatélites como marcadores moleculares, se colectaron tres muestras de tres rocas diferentes en cada río. Los resultados indicaron que al menos dos muestras de cada roca son genéticamente distintas entre sí. Esto permite sugerir que *M. rubrum* se propaga principalmente por la vía sexual (semilla), permitiendo así la colonización a lo largo de los ríos en los que habita.

Introducción

Características generales de la familia Podostemaceae

Podostemaceae es la familia más diversa de las angiospermas acuáticas, comprende aproximadamente 48 géneros y cerca de 270 especies (Philbrick y Novelo, 1994). Crecen adheridas a sustratos sólidos, principalmente rocas, sumergidas en el agua de ríos (Figura 1A) y cascadas (Philbrick *et al.*, 2010). Cuando el nivel del agua baja, las flores, que se han formado dentro del tallo, emergen de la espátela, completan su desarrollo fuera del agua (Figura 1B) y, en un periodo de alrededor de 2 a 3 semanas a partir de la antesis, se lleva a cabo la polinización, la fecundación y la maduración de los frutos (Cook y Rutishauser, 2007; Philbrick y Retana, 1998). Además, esta familia presenta una morfología y desarrollo de estructuras vegetativas inusuales (Philbrick *et al.*, 2010), mismas que varían significativamente, al igual que el polimorfismo de caracteres reproductivos (como el número de estambres y sépalos por flor, la ausencia de endospermo y la presencia de un plasmodio nuclear) que es considerable en todos sus niveles taxonómicos, incluso entre individuos (Jäger-Zürn, 1997; Rutishauser, 1997); razones por las cuales es de gran interés en diversos aspectos biológicos (Kapil, 1970; Philbrick *et al.*, 2010; Satoshi *et al.*, 2012).

La adhesión de estas plantas a los sustratos sólidos depende de la presencia de biopelículas formadas por cianobacterias (Jäger-Zürn y Grubert, 2000; Katayama *et al.*, 2008). En un inicio, la fijación de la semilla sucede gracias a un mucílago que se encuentra en la cubierta de la semilla (Devi *et al.*, 2016); después de la germinación, el polo radicular se establece sobre el mucílago y las raíces, usualmente fotosintéticas (Rohwer y Bittrich, 1990; Rutishauser *et al.*, 2003; Koi y Katayama, 2013), así como estructuras similares a vellosidades conocidas como pelos adhesivos, se establecerán a la biopelícula de bacterias, facilitando la unión a la roca (Jäger-Zürn y Grubert, 2000; Katayama *et al.*, 2008).

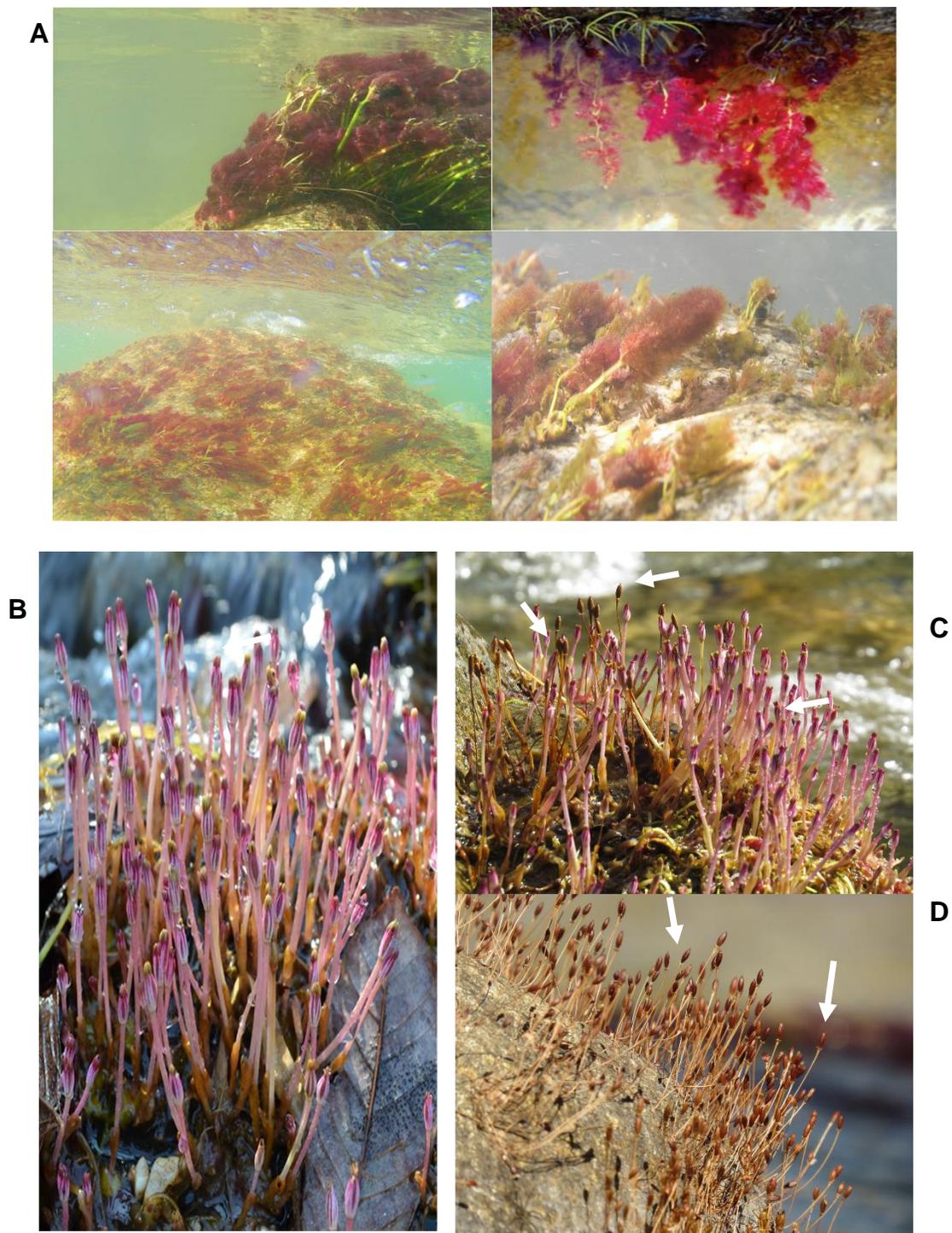


Figura 1. *Marathrum rubrum* en diferentes fases de su ciclo de vida. **A.** Hábito de crecimiento sobre las rocas sumergidas. Cuando el agua cubre las rocas, las plantas se desarrollan vegetativamente, colonizándolas. **B.** Flores en preantesis sobre la superficie de las rocas. La floración, la polinización y el desarrollo de los frutos se llevan a cabo cuando el nivel de agua baja en época de sequía. **C** y **D.** Frutos sobre la superficie seca de las rocas. Las flechas señalan algunos de los frutos y flores. **A, C** y **D.** Imágenes utilizadas por cortesía de Ricardo-Wong.

En México, Podostemaceae está representada por los géneros *Marathrum*, *Noveloa*, *Podostemum*, *Tristicha* y *Vanroyenella*, con una distribución a lo largo de tres tipos de climas: (1) caliente y húmedo; (2)

seco; y (3) templado y húmedo. El clima seco ocupa extensiones amplias de tierras bajas a lo largo de la costa del Pacífico, desde Sinaloa hasta Chiapas; del lado del Atlántico abarca extensiones de la parte central y meridional de Veracruz, en donde se encuentran especies de los géneros *Marathrum*, *Podostemum* y *Tristicha*. En climas más lluviosos -que ocupan pequeñas franjas en los estados de Tabasco, Veracruz, Chiapas y la parte norte de Oaxaca- se encuentran también los géneros mencionados, pero se tienen identificados en menor número de localidades. En climas áridos, que abarcan la zona litoral de la península de Baja California, el centro de Sonora y en los estados de Chihuahua, Coahuila, Durango y Zacatecas, se presenta *Noveloa coulteriana* como la única podostemácea registrada (Novelo y Philbrick, 1997; Trippery *et al.*, 2011). Cabe mencionar que estos organismos se encuentran principalmente en ríos de bajo contenido nutritivo (oligotróficos), aunque también pueden habitar en cuerpos de agua con niveles detectables de nutrimentos o contaminantes antropogénicos (Quiroz *et al.*, 1997).

Con respecto a la propagación, las plantas acuáticas se caracterizan por dispersarse hacia nuevas localidades por medio de la formación de estructuras vegetativas, tales como raíces o tallos modificados. Varios grupos de angiospermas acuáticas resultan difíciles de clasificar debido a la gran plasticidad fenotípica que presentan, a las reducidas formas de crecimiento y a una morfología convergente, asociada a su hábito de crecimiento. Asimismo, una de las mayores dificultades para estudiar a las poblaciones de plantas acuáticas es determinar cómo está delimitada una población, ya que las poblaciones de la mayoría de las plantas acuáticas no presentan las características que comúnmente se encuentran en plantas terrestres (poblaciones discretas, diploides, con un gran número de individuos). La ecología y la diversidad del hábito de crecimiento de las angiospermas acuáticas no permite una generalización de cómo se constituyen sus poblaciones y, por lo tanto, de cómo se debe realizar su estudio a nivel genético (Barret *et al.*, 1993; Philbrick y Novelo, 1997), ya que generalmente su propagación es por una vía asexual (Philbrick y Les, 1996). A pesar de esto, las estructuras vegetativas modificadas en Podostemaceae, aparentemente se encuentran lo

suficientemente especializadas en la adhesión al sustrato como para participar en la dispersión de los individuos (Philbrick *et al.*, 2015).

El género *Marathrum* presenta una importante plasticidad fenotípica y un gran polimorfismo vegetativo incluso a nivel de especie. Aunado a esto, su crecimiento en forma de parches de vegetación dificulta determinar si en una roca se encuentran uno o más individuos, es decir, si lo que se observa en una roca son clones (por lo tanto, provenientes de un individuo que se propagó asexualmente) o individuos genéticamente distintos (provenientes de diferentes semillas que germinaron sobre la roca) (Rutishauser, 1997; Katayama *et al.*, 2008; Philbrick *et al.*, 2010).

Marathrum rubrum produce aproximadamente 500 semillas por fruto y, en su conjunto, alcanzan las decenas de miles en cada población (Philbrick y Novelo, 1998) (Figuras 1C y 1D), sugiriendo que la propagación por semilla (*i.e.* reproducción sexual) es entonces un proceso relevante en la biología de las podostemáceas, en contraste con el patrón general de otras angiospermas acuáticas que muestran una baja propagación por la vía sexual. Sin embargo, aún se desconocen los alcances de la propagación sexual en este género. Debido al hábito de crecimiento que presenta (Figura 1A) y al grado aparentemente alto de especialización de las estructuras vegetativas, es posible sugerir que la colonización de las rocas a las que la planta se adhiere ocurre por propagación asexual (Philbrick y Novelo, 1995; Philbrick *et al.*, 2015).

Efecto de la reproducción asexual sobre la variabilidad genética

Existen varios procesos mediante los cuales se lleva a cabo la reproducción asexual en eucariontes. Dichos procesos implican una etapa mitótica en el que se genera un organismo genéticamente idéntico al progenitor. La forma en que se distribuye la variabilidad genética intra e interpoblacional depende de diferentes factores, de los cuales destacan los diferentes procesos de propagación, en donde no sólo se incluye el resultado de la reproducción sexual y asexual, sino que también se involucra el ambiente en el que se propaga una especie.

Por ejemplo, en plantas acuáticas que habitan en ríos, la distribución genética que presentan podría estar relacionada a la dirección del flujo del agua si sus semillas se dispersan mediante este vector. Por lo tanto, se observaría un considerable flujo de genes río abajo (Philbrick y Novelo, 1997). Asimismo, se considera que, en poblaciones con tasas altas de reproducción asexual, se pueden presentar repercusiones evolutivas y ecológicas en un ambiente cambiante debido a que presentan menor variabilidad genética (Raven *et al.*, 2005). Estas repercusiones podrían, incluso, afectar la capacidad de reproducirse sexualmente. Varios autores han sugerido que la capacidad de reproducción sexual puede disminuir a medida que se acumulan mutaciones somáticas que afecten el proceso sexual y/o etapas tempranas de la historia de vida en linajes clonales (Buss, 1983; Gill and Halverson, 1984; Silander, 1985; Klekowski, 1988; Barret *et al.*, 1993).

Dichas mutaciones somáticas en organismos con una variabilidad genética reducida también pueden ser evidentes prácticamente en cualquier estructura. En el caso de las plantas, esto ocurre principalmente en raíces, tallos o inflorescencias, cada uno de estos órganos capaz de reproducirse (Harper, 1977), y debido a que una planta se compone por módulos repetidos, la probabilidad de que estas mutaciones prevalezcan en el organismo es mayor (Whitham y Slobodchikoff, 1981).

Reproducción asexual en Podostemaceae

Los modelos de microevolución, competencia entre gametos e interacciones intraespecíficas centran su atención en el nivel de variación genética y la distribución de los genotipos dentro y entre poblaciones de plantas con reproducción asexual (Scheil, 2007). Varios estudios de poblaciones clonales reportan variación fenotípica en los caracteres morfológicos (Cahn y Harper 1976, Burdon 1980, Makepeace 1981, Aarssen y Turkington 1985). Un ejemplo de esto es la morfología de la hoja, la cual, en muchos casos, está influenciada por la variabilidad fenotípica y, por lo tanto, no es útil para identificar genotipos individuales. Esto ocurre con la morfología de las hojas de *M. rubrum* Novelo y Philbrick y *M. schiedeanum* Cham., ya que la variación

de la forma de la hoja en estas dos especies es evidente (Novelo y Philbrick, 1993; Edson *et al.*, 2008), lo cual dio pauta a varias interpretaciones taxonómicas (Luna *et al.*, 2012). En un principio se diferenciaron dos especies del género *Marathrum*; aunque, en estudios posteriores se propone que estas dos especies sean consideradas como una sinonimia de *M. foeniculaceum* presentando únicamente variantes en la forma de la hoja (Novelo *et al.*, 2009). Sin embargo, investigaciones más recientes sugieren que *M. foeniculaceum* es una especie con distribución en centro y Sudamérica, por lo que serían dos especies diferentes (Tippery *et al.*, 2011). Para distinguir completamente entre dos especies es necesario estudiar la variación en *loci* únicos estables y se requieren muchos atributos para distinguir con precisión entre genotipos (Ellstrand y Roose, 1987).

Antecedentes

Variabilidad genética en Podostemaceae

En poblaciones de *Podostemum ceratophyllum*, especie con distribución en Norteamérica (principalmente en climas templados) (Philbrick y Crow, 1983), se ha observado que la reproducción asexual es muy común y la producción de semillas viables es muy poco consistente. A pesar de la floración, no resulta evidente la relevancia de la producción de semillas en el establecimiento o soporte de las poblaciones en esta especie. Esto tiene como resultado una disminución notable en la variabilidad genética intra e inter-poblacional de *P. ceratophyllum* (Fehrmann *et al.*, 2012).

Adicionalmente, se sabe que en un gran número de individuos dentro de las poblaciones de *Podostemum irgangii*, especie con distribución a lo largo de Norte y Centroamérica (Philbrick y Novelo, 2004; Moline *et al.*, 2006), prevalece la reproducción asexual. Sin embargo, la diversidad genética intraespecífica que podría esperarse baja (con un número significativo de sus individuos presentando el mismo genotipo), cuenta en realidad con una alta diversidad, es decir, todos sus individuos poseen un

genotipo diferente, lo que significaría que la reproducción sexual tiene una mayor relevancia al momento de la dispersión de *P. irgangii* (Baggio *et al.*, 2013).

Uso de marcadores moleculares para el estudio de la variabilidad genética

Un marcador molecular es una secuencia de ácido desoxirribonucleico (DNA, por sus siglas en inglés) con una ubicación física conocida o identificable. Los marcadores pueden utilizarse para rastrear la herencia de un gen cercano que aún no se ha identificado, pero cuya ubicación aproximada se conoce. El marcador en sí mismo puede ser parte de un gen o puede no tener una actividad conocida. Los marcadores moleculares revelan sitios de variación en el DNA (Jones *et al.*, 1997) y se dice que son selectivamente neutros debido a que usualmente se localizan en regiones no codificantes del genoma (Collard *et al.*, 2005).

La amplificación de regiones genómicas y su uso como marcadores moleculares sigue siendo el método más accesible y ampliamente utilizado para dilucidar la distribución de la variabilidad genética dentro y entre las poblaciones (Alledorf *et al.*, 2010; De Faveri *et al.*, 2013). A pesar de la disponibilidad de varios tipos de marcadores moleculares, los microsatélites son los más empleados en los últimos años (Morin *et al.*, 2004; Presti *et al.*, 2014).

El valor de los microsatélites como marcadores moleculares se vuelve evidente cuando se intenta hacer una estructuración fina de una población y la estimación de la relación que hay entre sus individuos debido a su alto grado de polimorfismo, en contraste con otros marcadores, tales como los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), los cuales presentan una naturaleza bialélica y una tasa de evolución más lenta (Narum *et al.*, 2008; Hess *et al.*, 2011). De igual forma, los patrones espaciales de los microsatélites en su variación pueden no reflejar necesariamente una historia evolutiva neutral, sino que probablemente estén involucrados distintos procesos evolutivos; esto podría ocurrir en organismos que habitan en ambientes contrastantes (Otjen y Reusch, 2007; Kostamo *et al.*, 2012).

Uso de marcadores moleculares en la familia Podostemaceae

Existen diversos estudios de variabilidad genética en la familia Podostemaceae en los que se utilizan herramientas moleculares con diferentes propósitos. Por ejemplo, en un análisis de códigos de barras de DNA específicos para Podostemaceae se probaron secuencias en términos de universalidad de amplificación y variabilidad intra- e inter-específica con la finalidad de aclarar los recurrentes problemas taxonómicos a nivel de especie que presenta la familia (Kelly *et al.*, 2010). Como resultado se propuso, a partir de los criterios mencionados, el uso de la secuencia *matK* (de cloroplasto) para la identificación a nivel de especie dentro de la familia. Esto coincide con las conclusiones de otros estudios en los que se sostiene que la secuencia *matK* es una región muy útil para elaborar códigos de barras de DNA en angiospermas (Lahaye *et al.*, 2008).

Asimismo, en otro estudio se analizaron 14 especies de 8 géneros de la familia Podostemaceae con la finalidad de ubicarlas taxonómicamente con mayor certeza, utilizando las regiones internas espaciadoras de transcritos (ITS), las cuales son un conjunto de *loci* ubicados al lado de los genes ribosomales, frecuentemente usados para la identificación en plantas. La secuencia que se obtuvo de estas 14 especies fue comparada con la misma secuencia de especies bien ubicadas dentro de los géneros estudiados y complementadas con datos morfológicos. Esto resultó ser un método eficaz para separar sistemáticamente las especies analizadas, así como también dilucidar las tendencias evolutivas dentro de los clados estudiados (Khanduri *et al.*, 2014).

Microsatélites

Los microsatélites, también llamados *secuencias repetidas simples* (SSR) o *repeticiones cortas en tándem* (STR), son unidades de DNA de entre 100 y 300 pb, cuyas repeticiones son aproximadamente entre 5 a 50. El DNA que flanquea a los microsatélites se encuentra altamente conservado en individuos de la misma especie y algunas veces entre individuos de otras especies. A menudo es posible identificar el *locus* particular

de un microsatélite por la secuencia de su región flanqueante (Selkoe y Toonen, 2006). La causa de la variación entre genomas de individuos comparando microsatélites es que sus alelos presentan un número diferente de repeticiones (*i.e.* de tamaño) de una misma unidad (Krebs *et al.*, 2014).

El polimorfismo entre distintos alelos de un microsatélite se detecta por la longitud de los segmentos en las repeticiones que están contenidas, es decir por el número de repeticiones de la secuencia. Esta longitud se modifica de manera tan frecuente que estas regiones se consideran secciones hipervariables (Ellegren, 2004). Las mutaciones que modifican el tamaño de estos *loci* generalmente se originan de manera espontánea, es decir, por errores naturales de la DNA polimerasa y son muy frecuentes debido a que estas regiones no están sujetas a selección (Tautz y Renz, 1984).

La alta variabilidad de los microsatélites los hace una herramienta específica y muy útil para el mapeo genómico, debido a que existe una alta probabilidad de que los individuos varíen en sus alelos con respecto a un *locus* (Krebs *et al.*, 2014).

Microsatélites en *Marathrum rubrum*

A partir de DNA genómico (gDNA) de muestras de tejido vegetativo de *M. rubrum*, D'Costa-Lafón (2016) logró amplificar siete microsatélites nucleares utilizando oligonucleótidos previamente diseñados en el laboratorio a partir de una biblioteca genómica (Tabla 1). A partir de estos se logró identificar que los productos de amplificación con los oligonucleótidos 29, 71 y 116 presentan polimorfismo entre las muestras analizadas.

Taba 1. Secuencias de los oligonucleótidos utilizados para amplificar los siete microsátélites identificados en *M. rubrum* (trabajo previo en el laboratorio de R. Luna).

Clave	T ^a de alineamiento en PCR	Secuencia de los oligonucleótidos	
		Sentido (F)	Antisentido (R)
16	53 °C	GCGAAATATGCGATAGAGC T _m = 63 °C	GCCAAAACGTTCTCGGAATA T _m = 65 °C
29	53 °C	CAGAAGAAAATTCGCCCAAG T _m = 65 °C	CTGAGCCGTGATAGATTGGT T _m = 63 °C
37	53 °C	TGTCCGTGAGTGAACAGAGG T _m = 66 °C	GCTTTTGAGAGTTGCCCGTA T _m = 67 °C
71	53 °C	ATCGATATTACGCGCATGGT T _m = 63 °C	CTGAGCCGTGATAGATTGGT T _m = 63 °C
107	53 °C	TTTCCGATTCGATGCTTCAT T _m = 63 °C	ATTGACGGCGATGCTCTCT T _m = 63 °C
116	53 °C	AAGAACATGGCCAGTTTGG T _m = 63 °C	AACAATGCCACCAAGGAAAC T _m = 63 °C
119	56 °C	GGTCCCTAGCAGGTGATTAAG T _m = 66 °C	TCACGAATAACGGTCACTGC T _m = 67 °C

Justificación

El conocimiento de la variabilidad genética, así como los alcances de la propagación sexual del género *Marathrum* es limitado; su crecimiento en forma de parches vegetativos hace difícil determinar si en una roca se encuentran uno o más individuos. En este trabajo se propone el uso de microsátélites como marcadores moleculares como un método eficiente para evaluar la variabilidad genética de las poblaciones de *M. rubrum* en dos localidades del estado de Jalisco.

Hipótesis

Debido a que las estructuras vegetativas que presentan las Podostemaceae aparentemente no están involucradas en la propagación asexual de los individuos y que la producción de semillas de *M. rubrum* es considerablemente alta, se espera que la variabilidad genética dentro las poblaciones indique la presencia de diferentes individuos en cada una de las rocas.

Objetivo

Analizar la variabilidad genética intrapoblacional de *M. rubrum* en dos localidades del estado de Jalisco utilizando microsatélites como marcadores moleculares.

Materiales y métodos

Colecta del material biológico

El material vegetativo de *M. rubrum* se colectó en enero de 2018 en dos localidades de la costa del estado de Jalisco (Figura 2): (1) Horcones (20°27'12.1''N, 105°17'23.9''W) y (2) Las Juntas (20°14'43.6''N, 105°18'42.2''W). Cabe mencionar que la identificación taxonómica de *M. rubrum* se llevó a cabo utilizando la descripción de la especie (Novelo y Philbrick, 1993), tomando en cuenta los caracteres más distintivos de la especie ahí mencionados: sus hojas son rojas tanto en la superficie del haz como en el envés, en contraste con hojas de las otras especies de *Marathrum* en México que son verdes y, a veces, con una superficie abaxial rojiza; y es la única especie de la familia con divisiones de la hoja en forma capilar. Debido a que *Marathrum* es uno de los géneros de Podostemaceae con mayores carencias para su ubicación taxonómica (Trippery *et al.*, 2011), para fines de este trabajo, se hará referencia a la especie con el nombre *M. rubrum*.

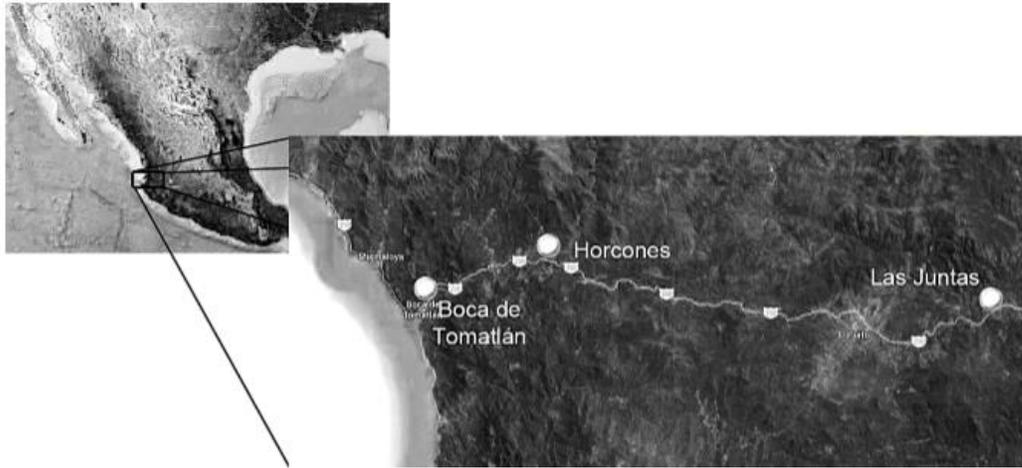


Figura 2. Ubicación de los sitios de colecta del material vegetativo de *M. rubrum*. El área ampliada del mapa muestra los dos sitios de colecta (Horcones y Las Juntas) en la costa del estado de Jalisco.

Para realizar la colecta se eligieron tres rocas en cada localidad, ubicadas aproximadamente a 50 m de distancia una de otra. En cada roca se establecieron seis cuadros (Figura 3A) y para tres de los seis cuadros se tomaron de dos a seis hojas, obteniendo un total de 9 muestras de cada localidad (3 muestras por cada roca) las cuales se secaron con papel absorbente y se almacenaron con sílica gel para la posterior purificación del gDNA.

Cada muestra fue etiquetada con un código (mismo que se usará a lo largo del escrito), de tal manera que se supiera a qué cuadro, de cuál roca y de qué localidad proviene (Figura 3B). Por ejemplo, 2BLJ corresponde a una muestra que fue tomada en el cuadro B de la roca 2 de la localidad Las Juntas (LJ).

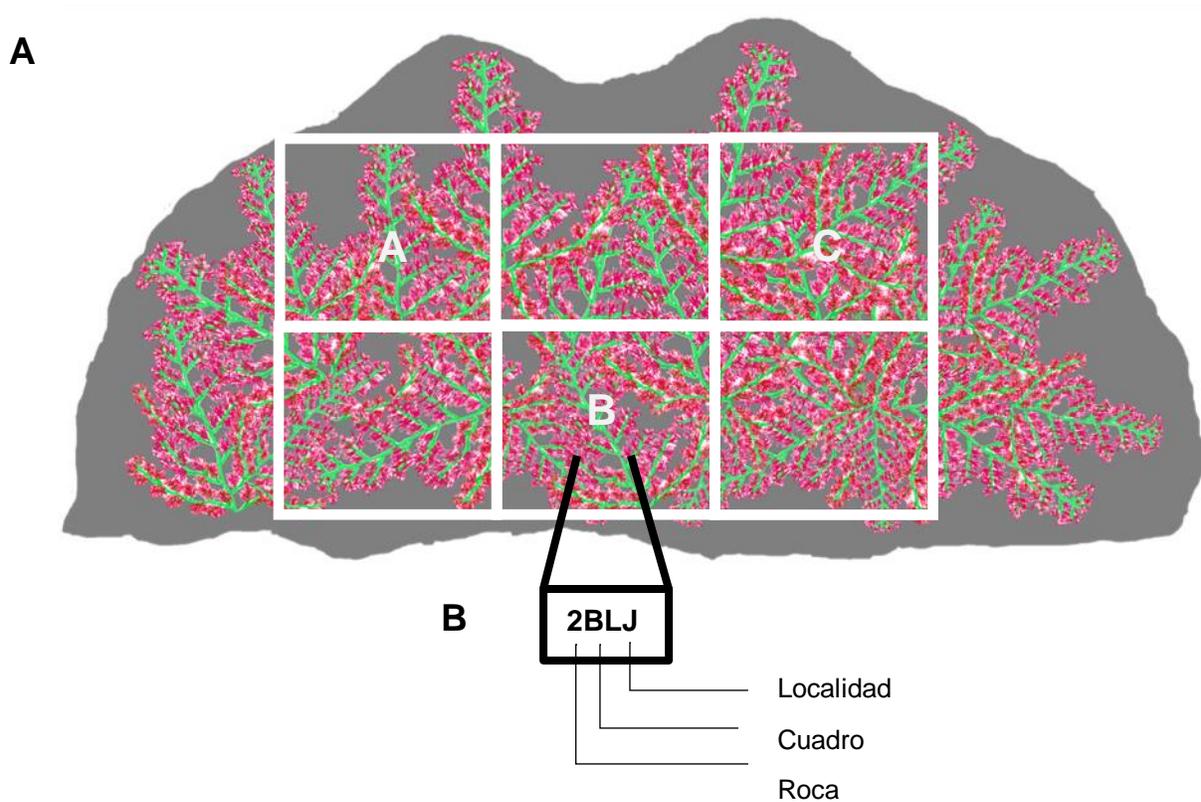


Figura 3. Representación de la técnica de colecta realizada en cada roca. **A.** Se muestra el trazo para definir los seis cuadros en la roca y las letras corresponden a los cuadrantes que se usaron para la colecta. **B.** El código para etiquetar las muestras se asigna por número de la roca, luego el del cuadro y finalmente, la localidad (H: Horcones; LJ: Las Juntas).

Purificación de DNA genómico

El DNA genómico (gDNA) se purificó a partir de las muestras secas de tejido vegetativo colectadas en cada una de las localidades. El objetivo principal en la purificación del gDNA es separarlo de otros componentes celulares que se le asocian de forma natural, tales como proteínas, lípidos y RNA.

El primer paso para la purificación del gDNA consiste en la homogenización del tejido por maceración con nitrógeno líquido y llevar a cabo una lisis celular (Karp, 2010), para la cual se utilizó una solución amortiguadora con bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB). El protocolo utilizado para realizar la purificación del gDNA fue el de Doyle y E.E. Dickson (1987), el cual tiene como característica particular la implementación de una solución amortiguadora con CTAB como agente tensoactivo. Los pasos del protocolo se enuncian a continuación:

1. Preparar el amortiguador de lisis con CTAB (Tris-HCl 0.1M, pH 8.0, NaCl 1.4M, 40ml EDTA 20mM y CTAB al 2% (w/v) adicionando polivinil pirrolidona 40,000 (PVP-40) y β -mercaptoetanol (β -ME) en las proporciones que se muestran en la Tabla 2, agitando la solución para que queden completamente disueltos los componentes.
2. Macerar entre 40 y 50 mg de tejido de hoja seca en un mortero con nitrógeno líquido.
3. Agregar 500 μ l del amortiguador de lisis al macerado, resuspender y transferir la suspensión a un tubo estéril de 1.5 ml.
4. Añadir 4 μ l de RNasa A (20 mg/ml) y mezclar por inversión.
5. Incubar a 55°C por 1 h.
6. Agregar 500 μ l de solución cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y agitar vigorosamente.
7. Centrifugar a 15,000 rpm por 8 min a temperatura ambiente.
8. Recuperar cuidadosamente la fase acuosa en un microtubo estéril de 1.5 ml y calcular el volumen recuperado.
9. Agregar 0.08 volúmenes de acetato de amonio 7.5 M frío (-20 °C) y 0.54 volúmenes de isopropanol frío (-20 °C) y mezclar bien por inversión.
10. Incubar a -20 °C por al menos 10 h.
11. Centrifugar a 15,000 rpm por 3 min a 4°C.
12. Decantar cuidadosamente.

13. Lavar la pastilla de DNA con 700 μ l de etanol al 70%; centrifugar a 15,000 rpm por 1 min a 4°C y decantar cuidadosamente.
14. Lavar la pastilla de DNA con 700 μ l de etanol al 95%; centrifugar a 15,000 rpm por 1 min a 4°C y decantar cuidadosamente.
15. Secar la pastilla de DNA a 55 °C y resuspender en 100 μ l de agua desionizada estéril.

Tabla 2. Cantidades necesarias de los reactivos que se requieren para la preparación del amortiguador de lisis.

Amortiguador de lisis con CTAB (volumen final)	PVP-40	B-ME
5ml	0.2 g	25 μ l
20ml	0.8 g	100 μ l

Tanto el rendimiento como la integridad del gDNA purificado se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Amplificación de los microsatélites

Una vez analizado el gDNA por electroforésis, se utilizó como molde para la amplificación de los microsatélites por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Debido a que cada microsatélite se encuentra flanqueado por regiones conservadas (Tautz y Renz 1984; Ellegren, 2004), se utilizaron los oligonucleótidos previamente diseñados en el laboratorio y analizados por D'Costa-Lafón (2016) (Tabla 3).

Tabla 3. Secuencias de los pares de oligonucleótidos generados en el laboratorio para su uso en la amplificación de microsatélites en *M. rubrum*. Se presentan las T_m teóricas de cada par de oligonucleótidos, así como la T_m utilizada para la reacción de amplificación (Tomado y modificado de D' Costa-Lafón, 2016).

Clave	T ° de alineamiento en el PCR (°C)	Sentido (F)	Antisentido (R)
29	53	CAGAAGAAAATTCGCCCAAG $T_m=50\text{ °C}$	CTGAGCCGTGATAGATTGGT $T_m=50\text{ °C}$
116	53	AAGAACATGGCCAGTTTGG $T_m=50\text{ °C}$	AACAATGCCACCAAGGAAAC $T_m=50\text{ °C}$

Para la amplificación por PCR se preparó la siguiente mezcla de reacción utilizando la enzima *TEMPase Hot Start 2x Master Mix C Blue* (Ampliqon) en un volumen final de 10 μ l:

- Mezcla de reacción con la polimerasa (2X): 5 μ l
- Oligonucleótido F (10 μ M): 0.5 μ l
- Oligonucleótido R (10 μ M): 0.5 μ l
- gDNA (reacción) o H₂O (control negativo): 1 μ l

El esquema general de la amplificación por PCR de los microsatélites ya mencionados fue el siguiente:

- Desnaturalización inicial: 95 °C – 15 min
- Reacción en cadena de la polimerasa: 30 ciclos.
 - Desnaturalización 95 °C – 30 s
 - Alineamiento 50°C – 30 s
 - Extensión 72 °C – 1 min
- Extensión final: 72 °C – 5 min

Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa y cada banda se consideró como un alelo de cada *locus* utilizado.

Interpretación de los datos moleculares

Cada producto de amplificación detectado a partir del análisis por electroforesis en el gel de agarosa corresponde a un alelo dominante y define un *locus* determinado. Por lo tanto, sólo es posible detectar dos condiciones (Figura 4): (1) presencia de banda, que representa la presencia del alelo en estado de heterocigosis u homocigosis y se codifica con el valor “1”; y (2) ausencia de banda, que representa la ausencia del alelo y se codifica con el valor “0”. Con estos valores se genera una matriz binaria (Figura 4): dos individuos son más similares cuando comparten mayor cantidad de presencia de bandas, es decir, con el valor “1”. La coincidencia en la ausencia de bandas, valor “0”, no aporta a la medida de similitud, ya que puede ser consecuencia de la falta de amplificación de un fragmento (Winzer *et al.*, 2004).

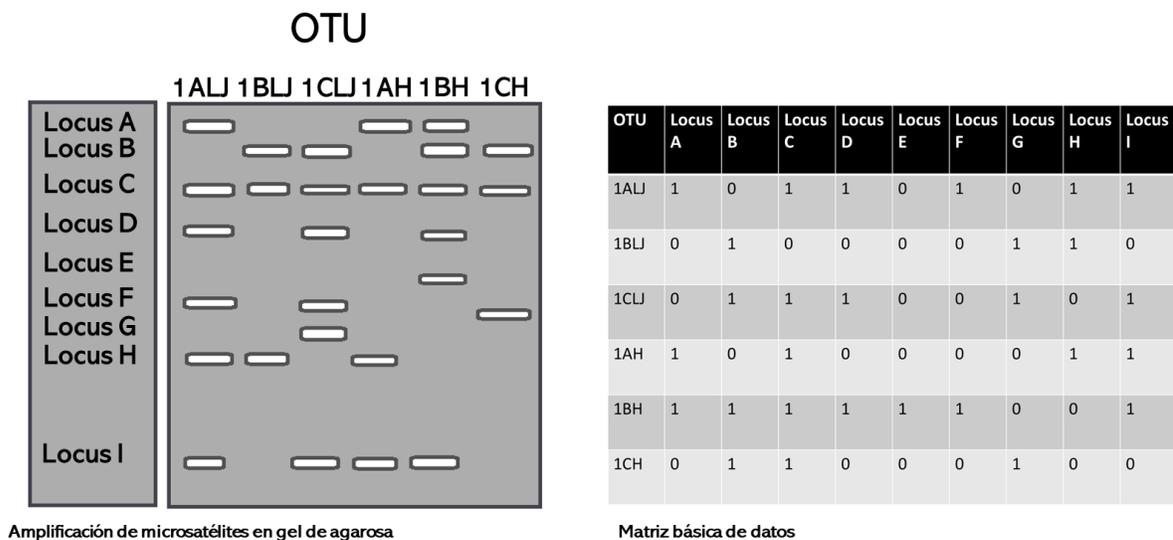


Figura 4. Representación de la interpretación de los datos moleculares y el registro de la información en la matriz básica de datos.

Coefficientes de similitud para variables cualitativas de tipo doble estado

Los marcadores moleculares se ajustan al tipo de variables cualitativas. Los coeficientes de similitud miden las coincidencias y diferencias en los estados de carácter entre dos individuos o Unidades Operativas Taxonómicas (OTU) (Echenique *et al.*, 2004) (Figura 5). En este trabajo este se consideró como OTU a cada una de las 18 muestras colectadas.

		OTU 1	
		1	0
OTU 2	1	a	b
	0	c	d

Figura 5. Caracterización de dos OTU. Se generan 4 diferentes posibilidades. a= Número de caracteres donde ambas muestras coinciden en el 1; b= Número de caracteres donde la primera muestra tiene un 1 y la otra un 0; c= Número de caracteres donde la primera muestra tiene un 0 y la otra un 1; d= Número de caracteres donde ambas muestras coinciden en el 0. La suma de estos 4 valores dará el total de caracteres medidos (Echenique *et al.*, 2004).

Se han propuesto diversas medidas de similitud, entre las que se encuentran Jaccard (1908), Rusell y Rao (1940), Sorensen (1948), Sokal y Michener (1958). No existe un criterio universal de cuándo usar una u otra medida, pero, para el análisis de similitud, en este trabajo se utilizó el índice de similitud de Jaccard (Figura 6), debido a que en este coeficiente la ausencia simultánea de una característica no contribuye a la semejanza entre unidades, lo cual evita obtener falsas similitudes entre las unidades analizadas (Demy *et al.*, 2011). El intervalo de valores para este índice va de 0 cuando no hay atributos compartidos entre ambas OTUs, hasta 1 cuando las dos tienen la misma composición de atributos (Demy *et al.*, 2011).

$$I_J = \frac{a}{a + b + c}$$

Figura 6. Índice de similitud de Jaccard. **a.** Es el número de bandas presentes en ambas OTUs. **b.** Es el número de bandas presentes en la primer OTU, pero no en la segunda. **c.** Es el número de bandas presentes en la segunda OTU, pero no en la tercera.

La matriz binaria resultante (Figura 4) se utilizó para calcular el coeficiente de similitud de Jaccard y con esos resultados se construyeron los dendrogramas correspondientes (Figura 7) utilizando el programa PAST (Hammer *et al.*, 2001).

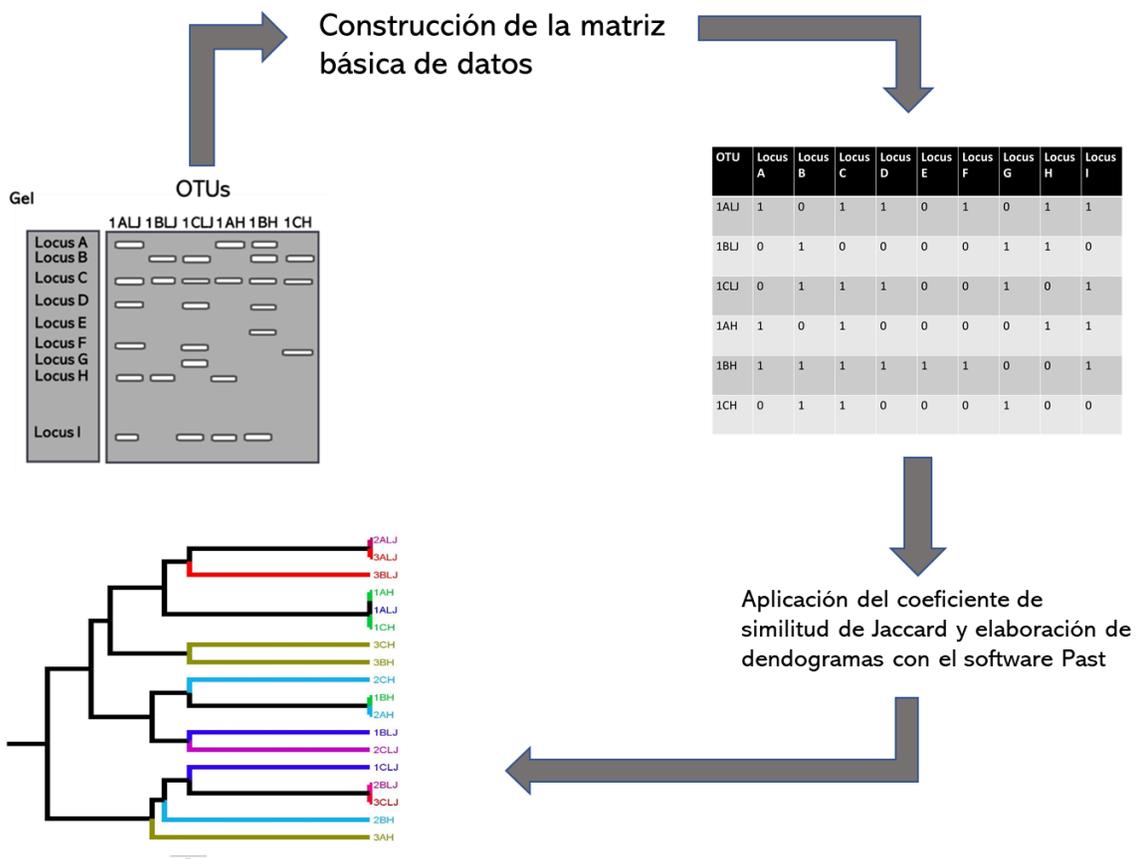


Figura 7. Esquema del análisis de agrupamiento con marcadores moleculares (Modificado de Zirilli, 2009).

Resultados

Purificación de gDNA de *M. rubrum*

En la Figura 8 se muestra un ejemplo del análisis por electroforesis en gel de agarosa de la purificación del gDNA de muestras colectadas en las localidades Horcones (H) y Las Juntas (LJ). Se muestran algunas muestras de gDNA que se utilizaron para los ensayos posteriores de amplificación de los microsatélites.

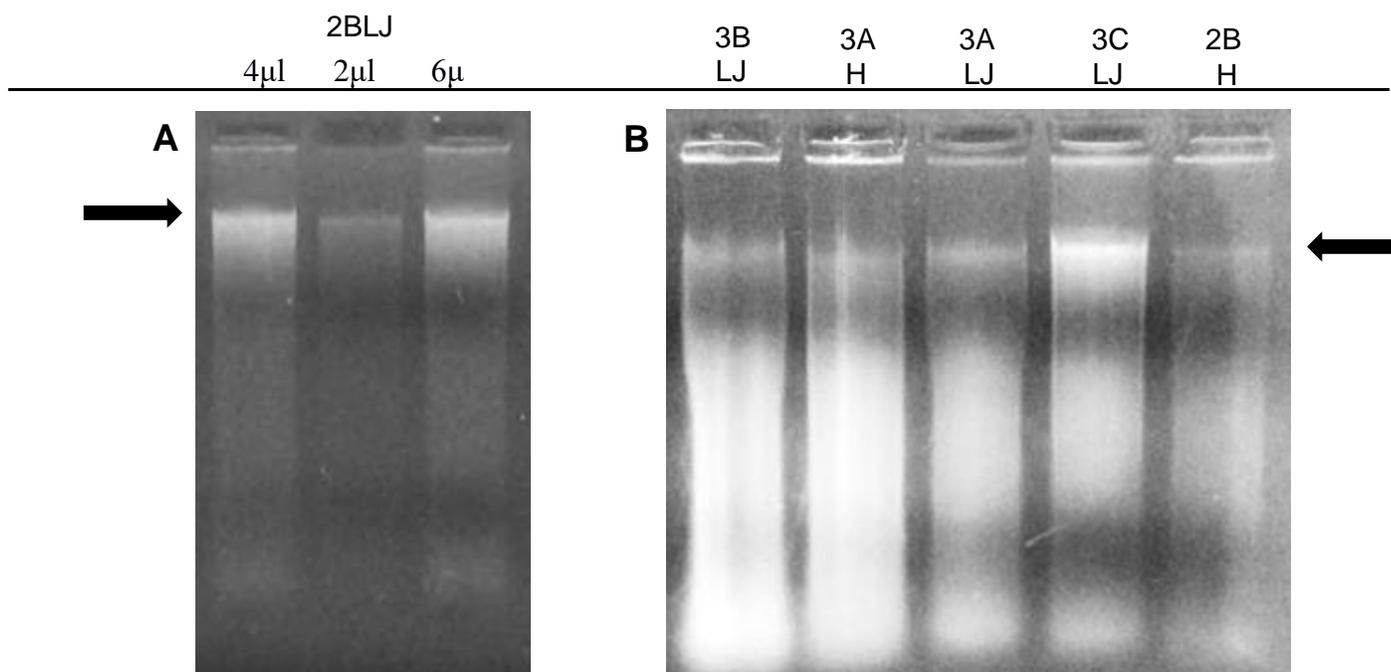


Figura 8. Análisis por electroforesis en gel de agarosa de diferentes gDNA de distintas muestras de tejido vegetal de *M. rubrum*. **A.** Diferentes volúmenes (2µl, 4µl y 6µl) de la solución de gDNA obtenido a partir de la muestra 2BLJ. **B.** Las muestras analizadas pertenecen a dos localidades: Las Juntas (LJ) y Horcones (H). El análisis se llevó a cabo por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Las flechas señalan la presencia de gDNA.

Amplificación por PCR de microsatélites a partir de gDNA de *M. rubrum*

Se amplificó un microsatélite de *M. rubrum* por PCR utilizando el par de oligonucleótidos 29 (Tabla 3) para las 18 muestras de gDNA. Se observan bandas amplificadas de 400 pb (a), 300 pb (b) y 200 pb (c) en los ensayos de PCR (Figura 9). Sin embargo, hay diferentes muestras dentro de una misma roca (3ALJ y 3BLJ; 2ALJ y 2BLJ; 1AH y 1CH) que presentan un mismo patrón de migración y número de bandas (Figuras 9A,

9B y 9D), lo que permite interpretar que pueden ser un mismo individuo o que al menos son, basándose en este marcador, genéticamente iguales.

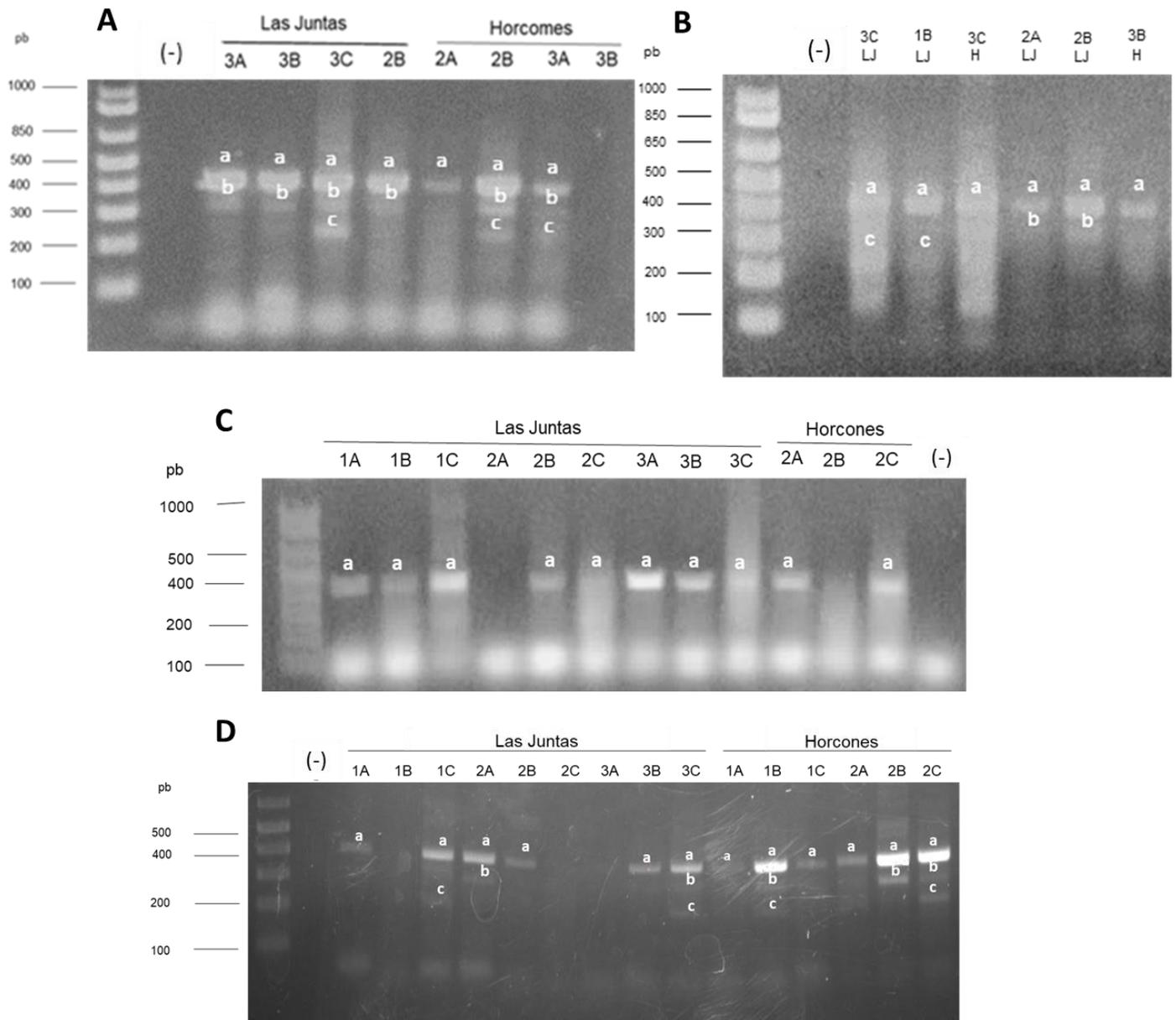


Figura 9. Análisis de la amplificación de un microsatélite utilizando el par de oligonucleótidos 29. Se observa los alelos **a** de 400 pb, **b** de 300 pb y **c** de 200 pb. **A.** Se presentan los resultados de tres muestras colectadas de la roca 3 y una muestra de la roca 2 de la localidad Las Juntas y dos muestras colectadas de la roca 2 y 3 en la localidad Horcones. **B.** Resultados de cuatro muestras colectadas en la localidad Las Juntas (1B, 2A, 2B y 3C) y dos muestras colectadas en la localidad Horcones (3B y 3C). **C.** Resultados de tres muestras de cada roca colectada en Las Juntas y tres muestras colectadas en la localidad Horcones. **D.** Se presentan los resultados de las nueve muestras colectadas en la localidad Las Juntas y seis muestras colectadas en la localidad Horcones.

En la Figura 9C no es posible observar un polimorfismo muy claro, a diferencia de las amplificaciones mostradas en los ensayos A B y D de la figura 9.

En las muestras analizadas en la Figura 9D hay por lo menos un alelo diferente para las 3 muestras de cada roca. Las rocas 1 y 3 del río Las Juntas presentaron una muestra con dos alelos diferentes a las demás muestras de su misma roca (1CLJ y 3CLJ, respectivamente), uno de 300 y otro de 200 pb. Estos alelos, a su vez, los presenta la muestra 1BH pero ninguna de las dos muestras restantes de la roca 1B presenta esos alelos. El mayor polimorfismo lo presentan las muestras de la roca 2CH. Las muestras 2BH y 2CH presentan un alelo de 300 pb, pero la muestra 2C mostró también uno de 200 pb, el cual no se observó en las muestras 2AH ni 2BH.

De igual manera, se realizó la amplificación por PCR en 18 muestras (agrupadas por roca y por río) utilizando el par de oligonucleótidos 116 (Tabla 2). En la Figura 10 es posible observar tres alelos diferentes: uno con un tamaño aproximado de 150 pb (a), otro de aproximadamente 300 pb (b) y otro de 600 pb (c). El alelo más grande de este microsatélite (a) se encuentra presente en la mayoría de las muestras analizadas, excepto en las muestras 1BA y 3B de la localidad Las Juntas (Figura 10A), mientras que el de 300 pb (b) se encuentra presente en las muestras 1C, 2B, 3C y 2A del río Las Juntas (Figuras 10 A y B); en las muestras del río Horcones está presente en la mayoría de las muestras analizadas, excepto en las muestras 1A y 2A (Figuras 10 B y C). El alelo de 150 pb (c) sólo estuvo ausente en la muestra 3A del río Horcones (Figura 10D).

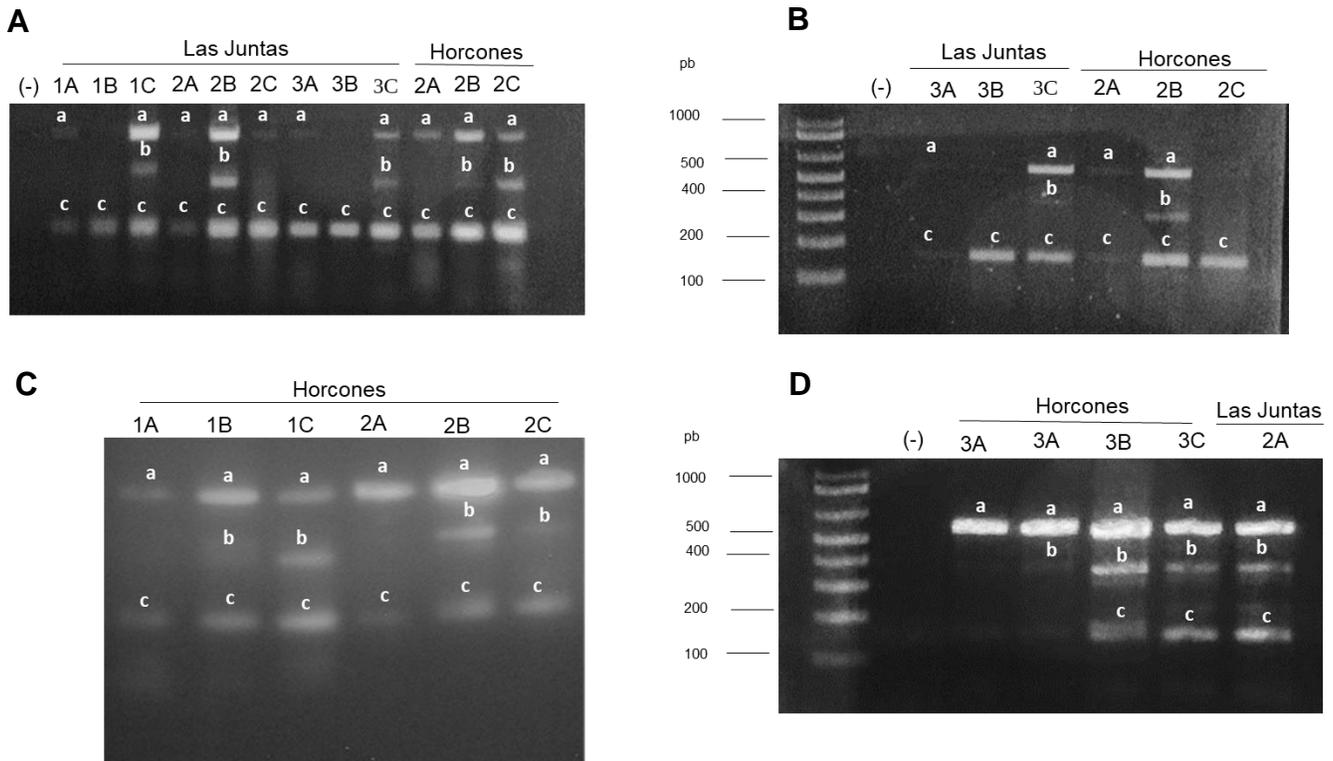


Figura 10. Amplificación de un microsatélite utilizando el par de oligonucleótidos 116. Se observan tres alelos distintos: **a** (150 pb), **b** (300) y **c** (600 pb). **A.** se presentan los resultados de tres muestras de cada roca colectada en Las Juntas y tres muestras de la roca 2 de la localidad Horcones. **B.** Análisis de tres muestras de la roca 3 de la localidad Las Juntas y tres de la roca 2 de Horcones. **C.** Análisis de muestras de la roca 1 y 2 de la localidad Horcones. **D.** Muestras de la roca 3 de la localidad Horcones y una muestra de la roca 2 de Las Juntas.

Análisis de similitud

A partir de la amplificación de cada microsatélite por PCR se generó una matriz básica de datos (Tabla 4), representando cada banda (*i.e.* producto de amplificación) con un 1 y la ausencia de banda (*i.e.* ausencia de amplificación) como un 0. A partir de esta matriz se llevó a cabo el análisis de similitud utilizando el software Past (Hammer *et al.*, 2001) aplicando el coeficiente de Jaccard para elaborar los diferentes dendrogramas que se muestran más adelante.

Tabla 4. Matriz básica de datos obtenidos a partir de la amplificación por PCR de los microsatélites. Cada banda amplificada se encuentra representada como 1 y la ausencia de banda como 0.

Muestra	Bandas amplificadas					
	Oligonucleótido 29			Oligonucleótido 116		
	A	B	C	A	B	C
1ALJ	1	0	0	1	1	0
1BLJ	1	0	1	0	1	0
1CLJ	1	0	1	1	1	1
2ALJ	1	1	0	1	1	0
2BLJ	1	1	0	1	1	1
2CLJ	1	0	1	1	1	0
3ALJ	1	1	0	1	1	0
3BLJ	1	1	0	0	1	0
3CLJ	1	1	1	1	1	1
1AH	1	0	0	1	1	0
1BH	1	0	1	1	1	0
1CH	1	0	0	1	1	0
2AH	1	0	1	1	1	0
2BH	1	1	1	1	1	0
2CH	1	0	1	0	1	0
3AH	1	1	1	1	1	1
3BH	1	0	0	1	1	1
3CH	1	0	0	1	1	1

De la misma manera se aplicó el coeficiente de similitud de Jaccard (Figura 6) a cada grupo de muestras pertenecientes a la misma roca con la finalidad de conocer la resolución que muestran los dos oligonucleótidos utilizados en conjunto (Tabla 5).

Tabla 5. Coeficiente de similitud de Jaccard (I_J) obtenido a partir del análisis con el programa PAST (Hammer *et al.*, 2001) de los microsatélites amplificados. El coeficiente de similitud se aplicó utilizando los oligonucleótidos 29 y 116 en todas las muestras de las dos localidades (Las Juntas y Horcones).

Localidad	Roca	Muestra	I_J
Las Juntas	1	A	0.5
		C	
		B	0.41
	2	A	0.58
		B	
		C	0.5
	3	A	0.76
		B	
		C	0.5
Horcones	1	A	1
		C	
		B	0.75
	2	A	0.75
		C	
		B	0.58
	3	A	0.62
		B	0.8
		C	

Asímismo, se utilizaron dendrogramas elaborados a partir del análisis de similitud de las muestras pertenecientes a la roca 1 de la localidad Las Juntas y de la roca dos de la localidad Horcones, utilizando los oligonucleótidos 29 (Figura 11 A y 11D), 116 (Figuras 11B y 11E) y los dos en conjunto (Figuras 11C y 11F). En la Figura 11A, las tres muestras analizadas se encuentran separadas, siendo la muestra 1ALJ la menos emparentada de las tres ($I_J = 0.32$) y las muestras 1BLJ y 1CLJ las que presentan mayor similitud, estando agrupadas, pero sin ser consideradas como un mismo individuo ($I_J = 0.5$). En el caso de la Figura 11B, las muestras 1CLJ y 1ALJ se encuentran agrupadas, pero sin ser consideradas un mismo individuo ($I_J = 0.66$); por otra parte, la muestra 1BLJ es la menos similar de las tres ($I_J = 0.4$). En la Figura 11C, habiendo utilizado los dos oligonucleótidos, las muestras 1ALJ y 1BLJ son las más similares ($I_J = 0.5$) y la muestra 1CLJ es la menos ($I_J = 0.41$).

El resultado en el caso de la Figura 11D es diferente al de los tres dendrogramas anteriores. Las muestras 2CH y 2AH presentan un coeficiente de similitud tan alto ($I_J = 1$) como para ser considerados distintos individuos y la muestra 2BH se encuentra separada de estas dos ($I_J = 0.5$). Lo mismo ocurrió con las muestras 2AH y 2BH (Figura 11E), donde el coeficiente de similitud fue tan alto ($I_J = 1$) que es posible considerarlas un mismo individuo y la muestra 2CH presenta un coeficiente de similitud más bajo ($I_J = 0.5$), estando separada de las otras dos. En el dendrograma de la Figura 11F las tres muestras se encuentran separadas, siendo la muestra 2CH y 2AH las más similares, pero no lo suficiente como para ser consideradas un mismo individuo ($I_J = 0.75$) y la muestra 2BH es la más separada de las 3 ($I_J = 0.58$).

La resolución que se obtuvo al utilizar los dos oligonucleótidos en comparación con sólo utilizar uno es más clara en los dendrogramas D, E y F (Figura 11), en donde al utilizar alguno de los dos, sólo nos muestra dos individuos genéticamente distintos dentro de las tres muestras colectadas en la roca 2H. Sin embargo, en los dendrogramas A, B y C (Figura 11) también se observa la resolución obtenida al utilizar los dos oligonucleótidos, ya que en los dendrogramas A y B, la muestra 1CLJ es la que se encuentra agrupada con la muestra 1BLJ y 1ALJ, respectivamente, mientras que en el dendrograma C, la muestra 1CLJ está separada de las otras dos.

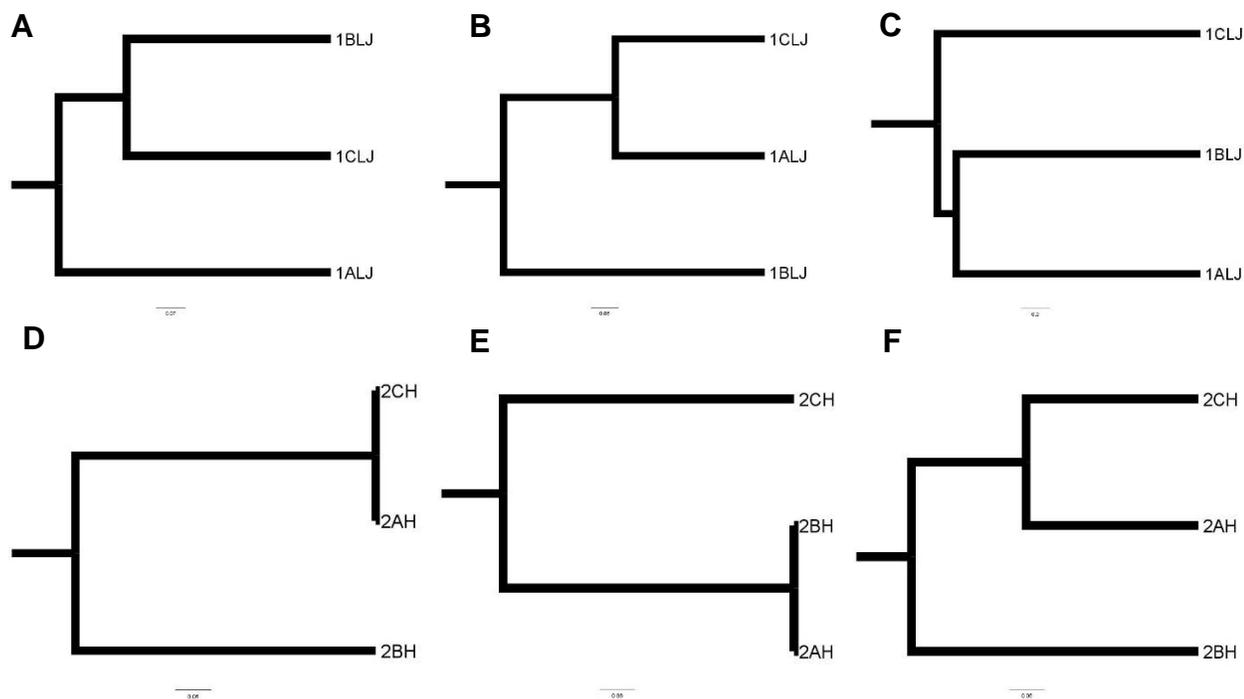


Figura 11. Dendrogramas resultantes utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard a partir de la matrices básicas de datos generadas de los análisis de amplificación de cada microsatélite. A y D. Resultados del análisis realizado con el oligonucleótido 29. B y E. Resultados del análisis con el oligonucleótido 116. C y F. Dendrogramas generados con los datos obtenidos a partir del análisis con los oligonucleótidos 29 y 116. A, B y C. Muestras de una roca de la localidad Las Juntas (1ALJ, 1BLJ y 1CLJ). D, E y F. Muestras de la roca 2 del río Horcones (2AH, 2BH y 2CH).

Utilizando los datos obtenidos con los dos oligonucleótidos (29 y 116) en cada roca analizada de ambas localidades, se elaboraron seis dendrogramas (Figura 12), en los que se observa que en cada una de las rocas se colectó tejido vegetativo de individuos genéticamente distintos para este par de marcadores. En la Figuras 12 A, B, C, E y F; las muestras analizadas se encuentran separadas, lo que significa que en esas rocas por lo menos habitan tres individuos de *M. rubrum*, mientras que en la Figura 12D, dos de las tres muestras colectadas se encuentran agrupadas como individuos genéticamente idénticos.

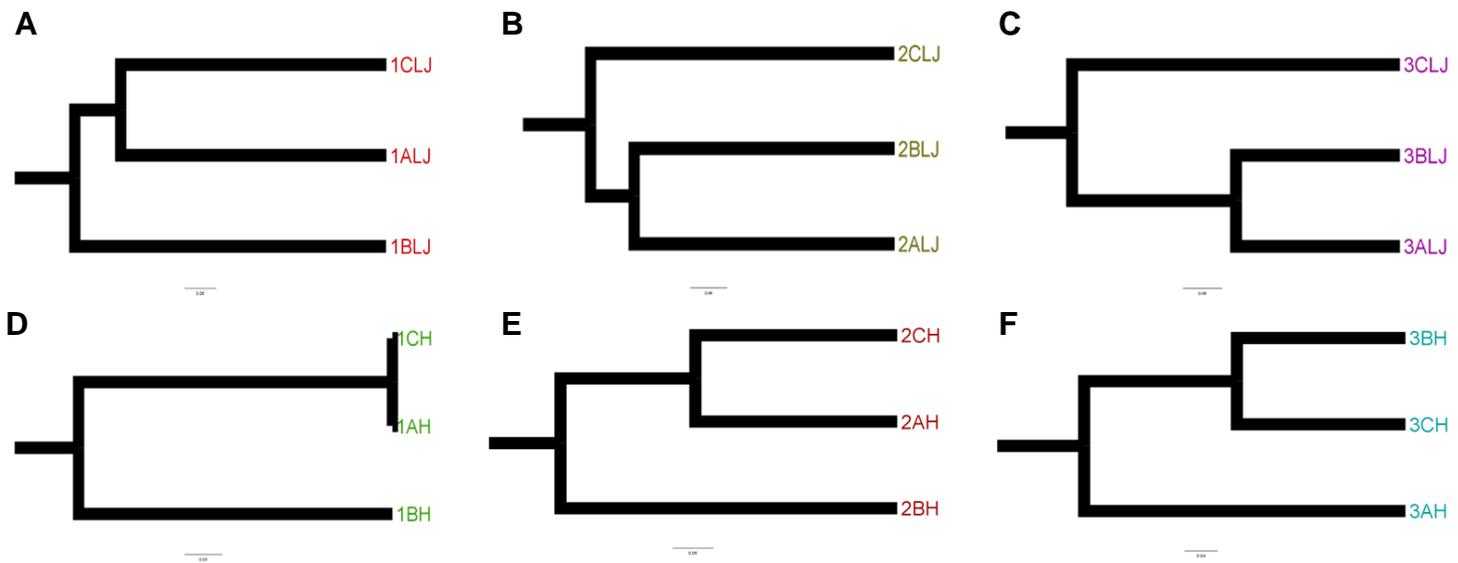


Figura 12. Dendrogramas resultantes utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard a partir de la matrices básicas de datos generadas de los análisis de amplificación dos microsátélites (29 y 116) en cada muestra colectada de ambas localidades. **A.** Dendrograma de la roca 1 de la localidad Las Juntas. **B.** Dendrograma de la roca 2 de la localidad Las Juntas. **C.** Dendrograma de la roca 3 de la localidad Las Juntas. **D.** Dendrograma de la roca 1 de la localidad Horcones. **E.** Dendrograma 2 de la localidad Horcones. **F.** Dendrograma 3 de la localidad Horcones.

Si se observa lo que sucede en cada localidad por separado (Figura 13), en Las Juntas (Figura 13A) se tienen a todas las muestras de cada roca separadas y, a pesar de que tanto las muestras 2BLJ y 3CLJ, como las muestras 2ALJ y 3ALJ se encuentran agrupadas como individuos idénticos respectivamente, esto se puede deber a que el número de marcadores utilizados en el análisis no permite separarlas. Sin embargo, esto no implica que sean individuos genéticamente idénticos, ya que se encuentran en rocas completamente separadas. En la localidad de Horcones (Figura 13B) se presenta algo muy similar a lo observado en la Figura 13A, ya que con excepción de las muestras 1AH y 1CH, que están agrupadas como un mismo individuo de una misma roca, las demás muestras están separadas de otras muestras de su misma roca.

En el caso de las muestras 1AH y 1CH no es posible descartar que no sean individuos genéticamente idénticos, ya que se encuentran en la misma roca. Sin embargo, la muestra 1BH se encuentra separada de

1AH y 1CH, por lo que en la roca 1 de Horcones se puede sugerir que por lo menos habitan dos individuos genéticamente distintos.

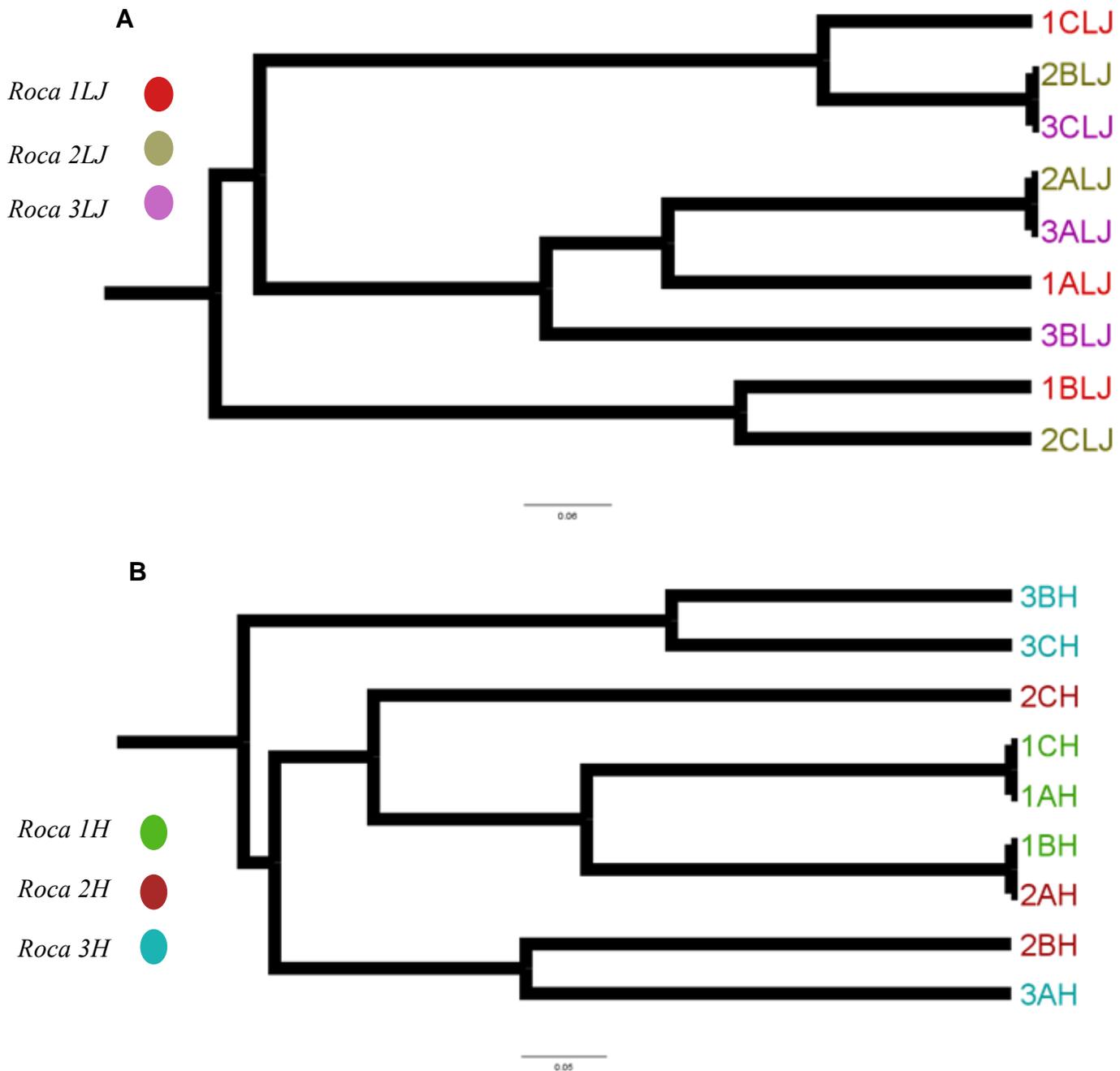


Figura 13. Dendrogramas generados utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard con datos de la amplificación de los microsatélites 29 y 116 de las muestras colectadas en las dos localidades: Las Juntas (LJ) y Horcones (H). En colores se destacan las muestras de cada roca analizada. **A.** Dendrograma de la localidad Las Juntas. Las muestras de la roca 1 se presentan en rojo, en gris las muestras de la roca 2 y en morado las muestras de la roca 3. **B.** Dendrograma de la localidad Horcones. Las Muestras en verde corresponden a la roca 1, en marrón las muestras de la roca 2 y en azul las muestras de la roca 3.

Realizando un análisis en conjunto de las dos localidades utilizando los datos obtenidos a partir de la amplificación con los oligonucleótidos 29 y 116 se obtuvo el dendrograma de la Figura 14. En él es posible observar una agrupación de las muestras similar al presentado en las Figuras 12 y 13, ya que cada una de las muestras por roca se encuentran agrupadas de manera diferente. Por ejemplo, 1ALJ, 1BLJ y 1CLJ se encuentran separadas, así como las muestras 2ALJ, 2BLJ y 2CLJ y 3ALJ, 3BLJ y 3CLJ ocurre lo mismo, ninguna muestra de la misma roca se encuentra agrupada como un mismo individuo. Sin embargo, en el caso de estas últimas, las muestras 2ALJ y 3ALJ se encuentran agrupadas como un mismo individuo, al igual que las muestras 2BLJ y 3CLJ. Esto sucede también para algunas muestras de la localidad Horcones, como lo son la 1BH y 2AH, que son de rocas distintas y se encuentran agrupadas como un mismo individuo. Asimismo, al igual que en la Figura 12, las muestras 1AH y 1CH se mantienen agrupadas como un mismo individuo y que la muestra 1BH, que se encuentra separada, sería un individuo genéticamente distinto, es decir, de acuerdo a este análisis es posible sugerir que en el muestreo se tomaron dos individuos (uno proviene de las muestras 1AH y 1CH y el otro de la 1BH).

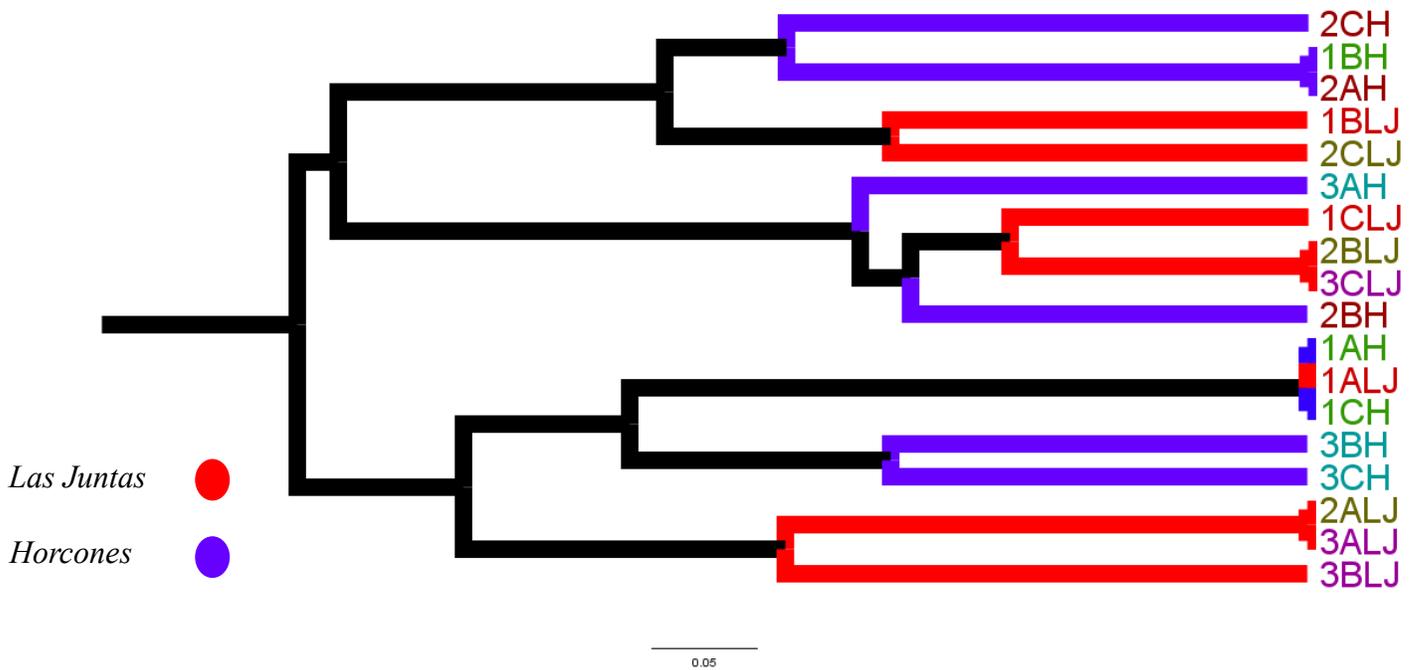


Figura 14. Dendrogramas generados utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard con datos de la amplificación de los microsatélites 29 y 116 de las muestras colectadas en las dos localidades: Las Juntas (LJ) y Horcones (H). En rojo se presentan muestras de la localidad Las Juntas y, en azul, las muestras de la localidad Horcones.

Aunado a esto, en la Figura 14 las muestras se encuentran agrupadas por localidad. Si se observa detenidamente cada una de las ramificaciones del dendrograma, es posible notar que las muestras de la localidad Las Juntas (en rojo) no se agrupan con las muestras de la localidad Horcones (en azul), con excepción de la muestra 1ALJ, que se agrupa con 1AH y 1CH. Esto podría ocurrir por el número de marcadores utilizado, ya que, como se mencionó anteriormente, un mayor número de marcadores mejoraría la resolución del análisis realizado.

En resumen, prácticamente todas las muestras analizadas por roca en cada localidad se encuentra separada y, con excepción de la roca 1 de Horcones (que presenta dos muestras agrupadas como un mismo individuo), en ninguna roca se observan agrupadas las muestras lo suficiente como para ser consideradas individuos idénticos, es decir, estos resultados sugieren que en cada roca analizada por lo menos existen tres individuos genéticamente distintos (considerando que de cada roca se tomaron tres muestras).

Discusión

La familia Podostemaceae, al igual que las demás familias de angiospermas acuáticas, se caracterizan por dispersarse hacia nuevas localidades gracias a su propagación asexual por la formación de estructuras vegetativas, tales como raíces o tallos modificados (Philbrick y Les, 1996). Además, varias especies de podostemáceas han resultado difíciles de clasificar debido a su plasticidad fenotípica, reducidas formas de crecimiento y una morfología convergente asociada a su hábito de crecimiento. Esto también es recurrente en otros tipos de plantas acuáticas (Barret *et al.*, 1993). Sin embargo, los resultados aquí presentados para *M. rubrum* sugieren una principal vía de propagación distinta a la asexual, lo cual contrasta con lo observado en otras especies de podostemáceas, como *Podostemum ceratophyllum* o *Podostemum irgangii*. Los estudios realizados en *P. irgangii* reportan que en un gran número de individuos dentro de sus poblaciones prevalece la reproducción asexual (Baggio *et al.*, 2013), al igual que *P. ceratophyllum*, especie en la que la reproducción asexual es muy común y la producción de semillas viables es poco consistente, reportando también una variabilidad genética intra e inter-poblacional muy baja (Fehrmann *et al.*, 2012). Por otra parte, los estudios de variabilidad genética en diferentes géneros de Podostemaceae reportados en la bibliografía se enfocan en la propagación de las especies de la familia a lo largo de los ríos en los que habita, por lo que no se tiene información clara de su propagación sobre los sustratos que coloniza. Este trabajo reporta, por primera vez, información acerca de la propagación de *M. rubrum* en las rocas en las que se establece.

Al comparar la amplificación de microsatélites de las diferentes muestras fue posible detectar diferencias en las bandas resultantes, no sólo en su tamaño (la mayoría de 400pb), sino también en la presencia de estas en las diferentes muestras. Estas diferencias nos hablan del polimorfismo de los microsatélites, indicando la existencia de variabilidad genética entre las muestras analizadas.

A su vez, en la figura 13B, con excepción de dos muestras de la localidad Horcones que pertenecen a la misma roca y se encuentran agrupadas como un mismo individuo, la mayoría de las muestras están

agrupadas de manera independiente con respecto las muestras de su misma roca, lo que nos habla de que efectivamente son diferentes. Esto mismo ocurre al observar la figura 12, que presenta muestras de rocas de las localidades de Las Juntas y Horcones por separado. La mayoría de las muestras, excepto 1AH y 1CH (Figura 12D), se encuentran agrupadas de manera independiente y, si bien, hay muestras de las mismas localidades agrupadas como un mismo individuo en los dendrogramas de la Figura 13 A y B, ninguna de ellas pertenece a la misma roca. Los resultados de las muestras 1AH y 1CH (Figura 12D) se pueden deber a diversos factores, el primero puede ser el muestreo, ya que, como se ha mencionado antes en este texto, la propagación asexual es muy común en angiospermas acuáticas, por lo que cabe la posibilidad de haber colectado muestras de un mismo individuo. No obstante, haber colectado muestras de un mismo individuo puede ocurrir no sólo por la propagación asexual, sino también por el hábito de crecimiento de los individuos de *M. rubrum*, ya que al crecer en forma de parches vegetativos (Figura 1 A) y que algunos individuos en una misma roca tienen hojas que alcanzan los 20 cm de longitud (Novelo y Philbrick, 1993), es posible que se hayan colectado muestras de un mismo individuo.

Tomando en cuenta que una de las mayores dificultades para estudiar las poblaciones de plantas acuáticas es definir a los individuos que las constituyen y, por lo tanto, cómo se debe realizar su estudio a nivel genético (Barret *et al.*, 1993), los resultados mostrados en este estudio son una aproximación para comprender los procesos de propagación de las poblaciones de *M. rubrum*. Los resultados de las Figuras 12 y 13 sugieren que de las tres muestras fue posible identificar tres individuos genéticamente distintos en cada roca muestreada (excepto la roca 1 de la localidad Horcones, en la que se identificaron dos individuos de las tres muestras colectadas), lo que significa que las poblaciones de *M. rubrum* están constituidas por los diferentes individuos que crecen sobre las rocas en las que se establecen. A su vez, los resultados presentados implican que la principal vía de propagación de *M. rubrum* a lo largo de los ríos en los que habita es la reproducción sexual, lo cual se sustenta con el número de semillas por fruto (alrededor de 500 semillas por fruto) y el número de frutos producidos (Philbrick y Novelo, 1995). No obstante, esto no descarta la posibilidad de que la colonización o propagación de los individuos de *M. rubrum* en cada roca en la que

consiguen establecerse sea por reproducción asexual, lo cual explicaría el hecho de que en el muestreo se haya tomado un individuo en distintas áreas de la misma roca.

Asimismo, el número de marcadores utilizado en este estudio puede ser contrastado con otros trabajos de variabilidad genética intraespecífica en diferentes especies de podostemáceas, en los que se utilizan al menos cinco marcadores diferentes (Fehrmann *et al.*, 2012; Baggio *et al.*, 2013). El reducido número de marcadores empleados puede estar ocasionando la agrupación de muestras de diferentes rocas, pero de la misma localidad (Figuras 13 A y B) o de diferentes rocas y localidades (Figura 14). A pesar de esto, el análisis con los oligonucleótidos 29 y 116 permitió un agrupamiento más claro de las muestras (Figura 11C) y separar las que con sólo alguno de los dos marcadores utilizados se encontraban agrupadas como un individuo idéntico, ya que el análisis de las muestras con los dos marcadores en conjunto consiguió separarlas como individuos diferentes (Figura 15 F). A su vez, con el par de oligonucleótidos utilizado fue posible separar a las muestras por localidad (Figura 14), puesto que sólo la muestra 1A de Las Juntas se encuentra agrupada con muestras de la localidad Horcones, todas las demás se encuentran junto con muestras de su misma localidad. Esto se puede deber a la separación que existe entre cada localidad y al polimorfismo de los microsatélites que se usaron.

Finalmente, la resolución del análisis de similitud utilizando los resultados observados a partir de los geles de agarosa puede ser baja, debido a que la diferencia de tamaño de los fragmentos separados por electroforesis no es tan precisa como la resolución que permiten los geles de poliacrilamida, que separan fragmentos con diferencias de tamaño de hasta un par de bases (Vázquez-Lobo y Morales, 2014). Esta resolución impediría que se identifiquen casos de homoplasia en los fragmentos amplificados de las distintas muestras estudiadas. Sin embargo, la presencia de homoplasia en los fragmentos analizados no reduce las diferencias observadas entre las distintas muestras colectadas, ya que la homoplasia en microsatélites implica que dos alelos sean iguales en tamaño, pero no necesariamente idénticos en su secuencia (Primmer y Ellergren, 1998), por lo que, al existir homoplasia en los alelos amplificados de un mismo tamaño, estos

podrían ser diferentes en su secuencia y las diferencias entre las muestras colectadas sería aún más clara y seguramente reforzaría la propuesta de este trabajo.

Conclusiones

La introducción de marcadores moleculares dentro de estudios biológicos ofrece posibilidades para el análisis de relaciones genéticas intraespecíficas. Los resultados aquí presentados constatan que el uso de microsatélites es efectivo para resolver cuestiones como la delimitación de las poblaciones, pudiendo esclarecer la variabilidad genética entre los individuos que las conforman. A su vez, el número de oligonucleótidos (i. e. de marcadores) utilizados permitió la resolución suficiente como para conocer las diferencias genéticas que presentan las muestras colectadas, mostrando que en las rocas analizadas se encuentran establecidos por lo menos dos individuos de *M. rubrum* genéticamente distintos, lo cual es un resultado esperado, dada la hipótesis planteada para este trabajo. Sin embargo, para reforzar la conclusión de este trabajo, es posible sugerir el uso de otros marcadores moleculares que además permitan un análisis masivo de la variabilidad entre los genomas. Un ejemplo de estos son los AFLP (Amplified Fragments Length Polimorfism). Los marcadores de DNA de cloroplasto (tales como *matK* o *rbcL*) o marcadores de espaciadores internos transcritos (ITS) también son útiles, pero la resolución que brindan permite la distinción hasta nivel de especie y no de individuos como en este trabajo se plantea.

Bibliografía

- Aarssen, L. W. y Turkington, R. 1985. Within-species diversity in natural populations of *Holcus lanatus*, *Lolium perenne* and *Trifolium repens* from four different-aged pastures. *The Journal of Ecology*. 869-886.
- Allendorf, F. W., Hohenlohe, P. A. y Luikart, G. 2010. Genomics and the future of conservation genetics. *Nature reviews genetics*, **10**: 697.
- Baggio, R. A., Firkowski, C. R., Boeger, M. R. T., y Boeger, W. A. 2013. Differentiation within and between river basins of *Podostemum irgangii* (Podostemaceae), a rapid-water macrophyte of southern Brazil. *Aquatic botany*. **107**: 33-38.
- Barrett, S. C., Eckert, C. G., y Husband, B. C. 1993. Evolutionary processes in aquatic plant populations. *Aquatic Botany*, **44(2-3)**: 105-145.
- Burdon, J. J. 1980. Intra-specific diversity in a natural population of *Trifolium repens*. *The Journal of Ecology*. 717-735.
- Buss, L.W., 1983. Evolution, development, and the units of selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **80**: 1387-1391.
- Philbrick, C. T., y Novelo, R. A. 1994. Seed germination of mexican podostemaceae. *Aquatic Botany*. **48(2)**: 145-151.
- Cahn, M. G., y Harper, J. L. 1976. The biology of the leaf mark polymorphism in *Trifolium repens* L. *Heredity*. **37(3)**: 309-325.
- Collard, B. C., Jahufer, M. Z. Z., Brouwer, J. B. y Pang, E. C. K. . 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*. **142(1-2)**: 169-196.
- Casanoves, F., Pla, L. y Di Rienzo, J. A. 2011. Valoración y análisis de la diversidad funcional y su relación con los servicios ecosistémicos. *Serie técnica, Informe técnico*, 384.
- Cook C.D.K., Rutishauser R.. 2007. Podostemaceae. En: Kubitzki K. (eds) Flowering Plants · Eudicots. The Families and Genera of Vascular Plants. *Springer, Berlin, Heidelberg*. 9: 304-344.
- DeFaveri, J., Viitaniemi, H., Leder, E. y Merilä, J. 2013. Characterizing genic and nongenic molecular markers: comparison of microsatellites and SNP s. *Molecular ecology resources*, **13(3)**: 377-392.

- Devi, L., Sanavar, M., Tandon, R. y Uniyal, P. L. 2016. Features of seeds of Podostemaceae and their survival strategy in freshwater ecosystems. *Rheedea*, **26(1)**: 29-36.
- Doyle, J.J. y E.E. Dickson. 1987. Preservation of plant samples for DNA restriction endonuclease analysis. *Taxon* **36**:715-722.
- Doyle, J.J. y J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* **19**:11-15.
- Echenique, V., Rubinstein, C., Mroginski, L., Levitus, G. y Hopp, E. 2004. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. *Ediciones INTA*. **258**.
- Edson, T.C., Philbrick, C.T. y Jensen, R., 2008. Morphometric analyses of leaf form variation in Mexican and Central American *Marathrum* (Podostemaceae). *Abstract Booklet, Vancouver, B.C. (Ed.), Botany 2008 International Meetings. Vancouver, Canada*. p. 116.
- Ellegren H. 2004. Microsatellites: Simple Sequences with Complex Evolution. *Nature Reviews genetics*, **5(6)**: 435-445.
- Ellstrand N.C. y Roose M.L. .1987. Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. *American Journal of Botany*. **74(1)**: 123-131.
- Fehrmann, S., Philbrick, C. T. y Halliburton, R. 2012. Intraspecific variation in *Podostemum ceratophyllum* (Podostemaceae): evidence of refugia and colonization since the last glacial maximum. *American journal of botany*. **99(1)**. 145-151.
- Gill, D.E. y Haiverson, T.G.. 1984. Fitness variation among branches within trees. En: B. Shorrocks (Editor), Evolutionary Ecology, Twenty-third Symposium of the British Ecological Society. *BlackweU Scientific, Oxford*. pp. 105-116.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. y Ryan, P. D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia electronica*, **4(1)**: 9.
- Harper, J. L.1977. Population biology of plants. *Academic Press*.

- Jäger- Zürn I. 1997. Embryological and floral studies in *Weddellina squamulose* Tul. (Podostemaceae, Tristichoideae). *Aquatic Botany*. **57**: 151-182
- Jäger-Zürn I. y M. Grubert. 2000. Podostemaceae Depend on Sticky Biofilms with Respect to Attachment to Rocks in Waterfalls. *International Journal of Plant Sciences*. **161 (4)**: 599-607
- Jäger-Zürn, I., Philbrick, C. T. y Piepenbring, M.. 2007. Pinnately ramified ensiform leaves in the genus *Marathrum*, (Podostemaceae-Podostemoideae). *Plant systematics and evolution*. **268(1-4)**: 97-117.
- Jones, N., Ougham, H. y Thomas, H. 1997. Markers and mapping: we are all geneticists now. *The New Phytologist*. **137(1)**: 165-177.
- Kapil, R. N. .1970. Podostemaceae. *Bulletin of the Indian National Science Academy*. **4**: 104-109.
- Karp G. 2010. Cell and Molecular Biology, Concepts and experiments. *John Wiley & Sons, Inc. Estados Unidos*. **6**: 837
- Katayama N., S. Koi y M. Kato. 2008. Developmental anatomy of the reproductive shootin *Hydrobryum japonicum* (Podostemaceae). *Journal of Plant Research*. **121**: 417-424.
- Kelly L. J., G. K. Ameka y M. W. Chase. 2010. DNA barcoding of African Podostemaceae (river-weeds): A test of proposed barcode regions. *Taxon*. **59 (1)**: 251–260.
- Khanduri P., R. Tandon, P. L. Uniyal, V. Bhat y A. K. Pandey. 2014. Comparative morphology and molecular systematics of Indian Podostemaceae.. *Plant Systematics and Evolution* **301(3)**: 861–882.
- Klekowski, Jr., E.J.. 1988. Mutation Developmental Selection and Plant Evolution. *Columbia Univ. Press, New York*: 373 pp.
- Koi, S. y Katayama, N. 2013. Gene expression analysis of aquatic angiosperms Podostemaceae to gain insight into the evolution of their enigmatic morphology. *Plant Organogenesis*. pp. 83-95. Humana Press, Totowa, NJ.
- Kostamo, K., Korpelainen, H. y Olsson, S. 2012. Comparative study on the population genetics of the red algae *Furcellaria lumbricalis* occupying different salinity conditions. *Marine biology*, **159(3)**: 561-571.

- Lahaye, R., Van der Bank, M., Bogarin, D., Warner, J., Pupulin, F. y Gigot, G. Savolainen, V. 2008. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **105(8)**: 2923-2928.
- Lewin, B., Krebs, J. E., Goldstein, E. S. y Kilpatrick, S. T. 2014. *Lewin's Genes XI*. Jones & Bartlett Publishers.
- Luna, R., Guzmán-Merodio, D., Núñez-Farfán, J., Philbrick, C. T., Collazo-Ortega, M. y Márquez-Guzmán, J. .2012. Cross compatibility between *Marathrum rubrum* and *Marathrum schiedeanum* (Podostemaceae), two closely related species of the Pacific Mexican Coast. *Aquatic botany*, **10**: 1-7.
- Makepeace, W. 1981. Polymorphism and the chromosomal number of *Hieracium pilosella* L. in New Zealand. *New Zealand journal of botany*, **19(3)**: 255-257.
- Moline, P. M., Les, D., Philbrick, C. T., Novelo R, A., Pfeifer, E. y Rutishauser, R. 2006. Comparative morphology and molecular systematics of *Podostemum* (including *Crenias*)—American River-weeds (Podostemaceae). *Botanische Jahrbücher*, **126(4)**: 427-476.
- Morin, P. A., Luikart, G. y Wayne, R. K. 2004. SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends in ecology & evolution*, **19(4)**: 208-216.
- Narum, S. R., Banks, M., Beacham, T. D., Bellinger, M. R., Campbell, M. R., Dekoning, J., ... y Moran, P. (2008). Differentiating salmon populations at broad and fine geographical scales with microsatellites and single nucleotide polymorphisms. *Molecular Ecology*, **17(15)**: 3464-3477.
- Novelo, A. y Philbrick, C.T., 1993. A new species of *Marathrum* (Podostemaceae) from Jalisco, México. *Novon* **3**: 456–458.
- Novelo, R. A. y Philbrick, C. T. 1997. Taxonomy of Mexican Podostemaceae. *Aquatic Botany*, **57(1-4)**: 275-303.
- Novelo, A., Philbrick, C.T. y Crow, G.E., 2009. Podostemaceae. En: Flora Mesoamericana, **3**: pp. 1–7.
- Oetjen, K. y Reusch, T. B. 2007. Genome scans detect consistent divergent selection among subtidal vs. intertidal populations of the marine angiosperm *Zostera marina*. *Molecular ecology*, **16(24)**: 5156-5157.

- Philbrick C. T., C. P. Bove y H. I. Stevens. 2010. Endemism in Neotropical Podostemaceae. *Annals of the Missouri Botanic Garden* **97 (3)**: 425–456.
- Philbrick, C. T., y Crow, G. E. 1983. Distribution of *Podostemum ceratophyllum* Michx.(Podostemaceae). *Rhodora*, 325-341.
- Philbrick C. T. y A. Novelo. 1995. New World Podostemaceae: ecological and evolutionary enigmas. *Brittonia* **47(2)**: 210–222.
- Philbrick, C. T. y Novelo, R. A. 1997. Ovule number, seed number and seed size in Mexican and North American species of Podostemaceae. *Aquatic Botany*, **57(1-4)**: 183-200.
- Philbrick, C.T. y Novelo, A.R.. 2004. Monograph of *Podostemum* (Podostemaceae). *Systematic Botany Monographs*. **70**: 1–106.
- Philbrick, C. T. y Retana, A. N. 1998. Flowering phenology, pollen flow, and seed production in *Marathrum rubrum* (Podostemaceae). *Aquatic Botany*, **62(3)**: 199-206.
- Philbrick, C. T. y Les, D. H. 1996. Evolution of aquatic angiosperm reproductive systems. *Bioscience*, **46(11)**: 813-826.
- Philbrick, C. T., Philbrick, P. K. y Lester, B. M. 2015. Root fragments as dispersal propagules in the aquatic angiosperm *Podostemum ceratophyllum* Michx.(Hornleaf Riverweed, Podostemaceae). *Northeastern naturalist*, **22(3)**: 643-647.
- Primmer, C. R. y H. Ellergren. 1998. Patterns of molecular evolution in avian microsatellites. *Molecular Biology and Evolution*. **15**: 997-1008.
- Presti, F. T. y Wasko, A. P. 2014. A review of microsatellite markers and their application on genetic diversity studies in parrots. *Open Journal of Genetics*, 69-77.
- Quiroz, F.A., Novelo, R.A. y Philbrick, C.T. 1997. Water chemistry and the distribution of Mexican Podostemaceae: a preliminary evaluation. *Aquatic Botany* **57(1-4)**: p. 201–212.
- Raven P. H., S. E. Eichorn y R. F. Evert. 2005. Biology of plants. *W. H. Feeman & Company Publishers. Nueva York*. **7**: 686.

- Rohwer, J. G. y Bittrich, V. 1990. *The families and genera of vascular plants*. K. Kubitzki (Ed.). **9**: 304-344
- Rutishauser R. 1997. Structural and developmental diversity in Podostemaceae (river-weeds). *Aquatic Botany*. **57(1)**: 29-70.
- Rutishauser, R., Pfeifer, E., Moline, P. y Philbrick, C. T. (2003). Developmental morphology of roots and shoots of *Podostemum ceratophyllum* (Podostemaceae—Podostemoideae). *Rhodora*, 337-353.
- Saidman, B. O.; C. F. Bessega, L. Ferreyra, N. Julio y J. C. Vilardo. 2000. Estudios evolutivos y poblacionales en el género *Prosopis* utilizando marcadores bioquímicos y moleculares. *Multequina* **9(2)**: 81-93.
- Satoshi Koi, Yoko Kita, Yumiko Hirayama , Rolf Rutishauser y Konrad A. Huber and Masahiro Kato. 2012. Molecular phylogenetic analysis of Podostemaceae: implications for taxonomy of major groups. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **169(3)**: 461-492.
- Selkoe K. A. y R. J. Toonen. 2006. Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* **9(5)**: 615–629.
- Silander, Jr., J.A.. 1985. Microevolution in clonal plants. J.B.C. Jackson, L.W. Buss and R.E. Cook (Editors), *Population Biology and Evolution of Clonal Organism*, Yale Univ, Press, London: 107-152.
- Tautz D. y M. Renz. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* **12(10)**: 4127–4138.
- Tippery, N. P., Philbrick, C. T., Bove, C. P. y Les, D. H. 2011. Systematics and phylogeny of neotropical riverweeds (Podostemaceae: Podostemoideae). *Systematic Botany*, **36(1)**: 105-118.
- Väli, Ü., Einarsson, A., Waits, L. y Ellegren, H. 2008. To what extent do microsatellite markers reflect genome-wide genetic diversity in natural populations?. *Molecular ecology*, **17(17)**: 3808-3817.
- Vázquez-Lobo, A. Y. y Morales-García, A. E. 2014. Microsatélites. Cornejo-Romero, A., A. Serrato-Díaz, B. Rendón-Aguilar, MG Rocha-Munive (eds). *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos*. SEMARNAT-INECC-UAM I. Primera edición. México, DF. **1**: pp75-100.

- Winzer, N., Di Renzo, M. y Olmos, S. 2004. Métodos para estimar variabilidad genética. *Echenique, V.;* *Rubinstein, C. Y Mroginsky, L. eds. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. INTA, Buenos Aires, Argentina.* **6**: 199- 210.
- Whitham, T. G. y Slobodchikoff, C. N. 1981. Evolution by individuals, plant-herbivore interactions, and mosaics of genetic variability: the adaptive significance of somatic mutations in plants. *Oecologia*, **49(3)**: 287-292.
- Zirilli, Patricia Soledad. 2009. Análisis de la variabilidad genética utilizando marcadores moleculares en el género *Mecardonia* Tesis de licenciatura (Licenciada en genética). Instituto de floricultura, Facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales. Buenos Aires. Argentina.