



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA
ECOLOGÍA

DIVERSIDAD GENÉTICA DE POBLACIONES DE LAS ESPECIES INVASORAS
***Kalanchoe delagoensis*, *K. daigremontiana* Y SU HÍBRIDO (CRASSULACEAE)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

AZALEA GUERRA GARCÍA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JORDAN KYRIL GOLUBOV FIGUEROA

FACULTAD DE CIENCIAS

COTUTOR DE TESIS: DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

COMITÉ TUTOR: DR. FRANCISCO ELIZANDRO MOLINA FREANER

INSTITUTO DE ECOLOGÍA



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
ECOLOGÍA**

**DIVERSIDAD GENÉTICA DE POBLACIONES DE LAS ESPECIES INVASORAS
Kalanchoe delagoensis, *K. daigremontiana* Y SU HÍBRIDO (CRASSULACEAE)**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

AZALEA GUERRA GARCÍA

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JORDAN KYRIL GOLUBOV FIGUEROA
FACULTAD DE CIENCIAS
COTUTOR DE TESIS: DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS
INSTITUTO DE ECOLOGÍA
COMITÉ TUTOR: DR. FRANCISCO ELIZANDRO MOLINA FREANER
INSTITUTO DE ECOLOGÍA**

MÉXICO, D.F.

MAYO, 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 03 de marzo de 2014, 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 **GUERRA GARCÍA AZALEA** con número de cuenta: **304189256**, con la tesis titulada **"DIVERSIDAD GENÉTICA DE POBLACIONES DE LAS ESPECIES INVASORAS *Kalanchoe delagoensis*, *K. daigremontiana* Y SU HIBRIDO (*Crassulaceae*)"**, bajo la dirección del **DR. JORDAN KYRIL GOLUBOV FIGUEROA**:

Presidente: DRA. ELLA GLORIA VÁZQUEZ DOMÍNGUEZ
Vocal: DR. JOSÉ ALEJANDRO ZAVALA HURTADO
Secretario: DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS
Suplente: DRA. EK DEL VAL DE GORTARI
Suplente: DR. FRANCISCO ELIZANDRO MOLINA FREANER

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 28 de abril de 2014

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



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

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la formación académica de mis estudios de maestría, y al programa de becas de la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) por el apoyo complementario para la asistencia a dos congresos internacionales.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) por la beca otorgada durante el periodo de enero de 2012 a diciembre de 2013 (No. de becario 440709).

Este trabajo fue realizado gracias al financiamiento de los proyectos UNAM-PAPIT IN 207411 y SEMARNAT/CONACyT 0350 cuya responsable es la Dra. María del Carmen Mandujano, así como de los proyectos CONABIO GN-047, GEF-ENCIS y CONACyT 83790 y 62390 a cargo del Dr. Jordan Golubov.

A los miembros del comité tutor integrado por:

Dr. Jordan Kyril Golubov Figueroa

Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns

Dr. Francisco Elizandro Molina Freaner

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Sólo en raras y excepcionales ocasiones los méritos se consiguen por obra de una sola persona, y si bien este trabajo lleva mi nombre, es resultado de la aportación de muchos que colaboraron académica y/o personalmente. Aquí agradezco a aquellos que fueron fundamentales:

Al Dr. Jordan Golubov, por guiarme paciente y sabiamente a través de mi desarrollo académico durante varios años. Gracias por la inmensa comprensión y apoyo que me brindaste, siempre tan amable y alegre. Asimismo, al Laboratorio de Sistemática, Ecología y Fisiología Vegetal, de Universidad Autónoma Metropolitana, campus Xochimilco.

Agradezco profundamente a la Dra. María del Carmen Mandujano, que me adoptó amablemente en el Laboratorio de Genética y Ecología, del Instituto de Ecología de la UNAM, y me dio su apoyo técnico y económico para el desarrollo del proyecto.

A los miembros del comité tutor, los Dres. Luis Eguiarte y Francisco Molina, quienes cada semestre dieron importantes sugerencias que permitieron ampliar y redondear el trabajo. También a los sinodales, la Dra. Ek del Val de Gortari y el Dr. José Alejandro Zavala Hurtado, por revisar meticulosamente la tesis y brindar comentarios importantes para su mejor conclusión.

A los Biólogos Hugo Altamirano y a Concepción Martínez que me ayudaron en la colecta de material biológico, así como al Ing. Emilio Sánchez y al personal del Jardín Botánico Regional de Cadereyta “Ing. Manuel González de Cosío”, quienes me brindaron las facilidades para coleccionar dentro del jardín. Además, a las técnicas del laboratorio que me enseñaron y apoyaron enormemente en la parte experimental: Dra. Alejandra Vázquez y Biol. Ariadna Morales.

A mis padres, Rosa y Alonso, que me han apoyado e impulsado a que continúe avanzando, superando los tropiezos y los contratiempos. Los padres son siempre las personas que más contribuyen a la definirnos como personas, y los míos han hecho un gran trabajo al mostrarme mis errores y mis carencias, y brindándome una gran calidez y refugio.

A mi hermana Azucena, y a mis sobrinos Fernanda y Alonso, de quienes he aprendido a disfrutar cada momento y a valorar las cosas realmente importantes, además de que me han enseñado a ser

paciente y comprensiva. A mis abuelos y mis tíos, que siempre me han hecho sentir querida y me han alentado en mi camino.

A Emmanuel Trejo, quien por muchos años no ha soltado mi mano y me ha guiado y empujado en todos los aspectos de mi vida. Te amo inmensamente y juntos hemos crecido como personas y hemos aprendido, a veces con dolorosas caídas, que el amor no es un sentimiento, sino son las acciones que día a día hacemos. Tú eres quien me ha obligado a luchar por mis sueños y a hacer lo que me apasione.

A mis viejos y queridos amigos: Stevens, Joana, Maura y Nadia. También a aquellos que hicieron más ameno el trabajo de cada día en el laboratorio: Nancy (con quien chismeaba y me desahogaba de vez en cuando), Marco, Susette, Coni, Tania, Alejandro y Juan Carlos.

Para mi tita Magda, a quien cada día extraño.
Aunque ya no estás aquí, te siento y sonrío contigo,
y pese a que estás lejos, inspiras mi vida.

“The important thing is not to stop questioning. Curiosity has its own reason for existing. One cannot help but be in awe when he contemplates the mysteries of eternity, of life, of the marvelous structure of reality. It is enough if one tries merely to comprehend a little of this mystery every day. Never lose a holy curiosity.”

Albert Einstein

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	ii
ÍNDICE DE CUADROS.....	ii
RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 <i>Kalanchoe delagoensis</i> y <i>K. daigremontiana</i> como especies invasoras.....	2
II. HIPÓTESIS.....	5
III. OBJETIVOS.....	6
IV. ANTECEDENTES.....	7
4.1 Fases del proceso invasivo.....	7
4.2 Diversidad genética en poblaciones introducidas.....	10
4.3 Poliploidía e hibridación en especies invasoras.....	13
V. METODOLOGÍA.....	16
5.1 Colecta de material biológico.....	16
5.2 Extracción de ADN y amplificación de microsatélites.....	17
VI. RESULTADOS.....	20
VII. DISCUSIÓN.....	23
VIII. CONCLUSIONES.....	27
IX. LITERATURA CITADA.....	28
ANEXO A.....	33
ANEXO B.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fases del proceso invasivo.....	7
Figura 2. Ubicación de las localidades donde se colectó <i>K. delagoensis</i> , <i>K. daigremontiana</i> e híbrido.....	17
Figura 3. Diagrama de Venn donde se representan los conjuntos de alelos de las dos especies (<i>K. delagoensis</i> y <i>K. daigremontiana</i>) y del híbrido. Las interacciones muestran alelos compartidos.....	22
Figura 4. Dendograma de los genotipos de <i>K. delagoensis</i> construido con las distancias genéticas de Nei.....	22

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de especies introducidas con distintos niveles de diversidad genética....	12
Tabla 2. Número de individuos (<i>n</i>) colectados, fecha de colecta de cada especie y las coordenadas geográficas asociadas a las localidades	16
Tabla 3. Distancia (Km) entre las localidades donde se colectó el material biológico.....	17
Tabla 4. Composición alélica (tamaño en pb) de los genotipos multilocus encontrados en las poblaciones <i>K. delagoensis</i> , <i>K. daigremontiana</i> y el híbrido Houghton.....	20
Tabla 5. Distancia y similitudes genéticas entre los genotipos de <i>K. delagoensis</i>	21
Tabla B1. Secuencias de primers de los microsatélites.....	35
Tabla B2. Características de microsatélites y condiciones de amplificación empleadas en este estudio.....	35

RESUMEN

Las invasiones biológicas son consideradas como un factor de gran impacto porque reducen la biodiversidad, e incluso pueden tener efectos negativos en el ámbito económico y de salud pública. *Kalanchoe delagoensis*, *K. daigremontiana*, y su híbrido (Houghton) son especies conocidas comúnmente como “madre de millones” que pertenecen a la familia Crassulaceae. Son nativas de Mozambique y Madagascar, y han sido introducidas extensivamente en regiones tropicales y subtropicales, convirtiéndose en invasoras en Estados Unidos y Australia.

K. delagoensis es tetraploide, mientras que *K. daigremontiana* es diploide, y en su área natural de distribución son capaces de hibridar para dar origen al híbrido triploide Houghton. Una característica importante de varias especies de este género, incluyendo a estas dos y su híbrido, es la capacidad de desarrollar propágulos clonales en los márgenes de las hojas, los cuales tienen una alta sobrevivencia bajo distintos niveles de luz y agua.

Se estimó la diversidad genética, con base en ocho microsatélites de cinco poblaciones introducidas en México de estas especies y del híbrido Houghton. En el caso de *K. daigremontiana* y del híbrido sólo se detectó un genotipo multilocus en todas las poblaciones, las cuales se encuentran separadas por hasta 411 kilómetros. En las poblaciones de *K. delagoensis* también se registró un solo genotipo excepto en una población (Tula, Tamaulipas), donde hubo cuatro genotipos multilocus (A, B, C y D). Sin embargo, el 86% de los individuos pertenecen a un solo genotipo, por tanto, los otros están presentes en bajas frecuencias y son subconjuntos del genotipo dominante. Es probable que los genotipos en esta población sean resultado de un evento de reproducción sexual exitoso, el cual no ha ocurrido en las otras poblaciones.

La baja diversidad genotípica encontrada en las poblaciones de *K. delagoensis* y *K. daigremontiana* sugiere que la invasión ocurrió a partir de la introducción de un único genotipo de cada especie, y que las poblaciones se han expandido por crecimiento clonal. Además, la presencia de un único genotipo del híbrido muestra que estas especies no están hibridando entre sí en las poblaciones estudiadas.

ABSTRACT

Biological invasions are an important factor that causes biodiversity loss, and some invasive species can have an economic and health impact. *Kalanchoe delagoensis*, *K. daigremontiana* and their hybrid (Houghton's hybrid) have been introduced in tropical regions, and are reported as invasive species in United States and Australia. These species are native to Madagascar and Mozambique, and are part of the Crasulaceae family. *K. delagoensis* is tetraploid while *K. daigremontiana* is a diploid species, and in their native distribution area are able to hybridize to originate the triploid Houghton's hybrid. One outstanding feature of these succulent plants is the growth of clonal propagules from the margin of their leaves, which present high survival under different light and water conditions.

Using eight microsatellite loci, we estimated the genetic diversity of five introduced populations of these species and their hybrid in Mexico. For *K. daigremontiana* and Houghton's hybrid, we recorded just one multilocus genotype in all populations, which were separated by up 411 km. The same occurred in *K. delagoensis* populations, except for one, where four multilocus genotypes were present (A, B, C and D), although one genotype accounted for 86% of all screened individuals of that population. The other three genotypes were in low frequencies and did not present new alleles, indicating that they are subsets of the dominant genotype. It is likely that genotypes B, C, and D are the result of a successful reproductive event, which seemingly has not occurred in the other populations.

The lack of genotypic diversity found in the Mexican populations suggests that the invasion by these two species occurred from the introduction of one genotype of each plant species, and that the range expansion has been through by clonal growth. In addition, the presence of just one genotype of the hybrid shows that *K. delagoensis* and *K. daigremontiana* are not hybridizing in Mexican populations.

I. INTRODUCCIÓN

La dispersión de especies de flora y fauna mediada por el hombre a sitios fuera de su rango de distribución natural, especialmente en los últimos siglos, ha sido una fuerza importante que ha moldeado la biodiversidad mundial (Wilson et al. 2009). Aunque sólo algunas de las especies de plantas introducidas invaden comunidades naturales o alcanzan altas densidades poblacionales, aquellas que lo hacen representan un alto riesgo a la biodiversidad y pueden modificar drásticamente su entorno (Müller-Schärer et al. 2004). Para cuando son perceptibles los daños ocasionados por las especies invasoras, generalmente ya han alcanzado grandes magnitudes y con graves consecuencias (Comité Asesor Nacional sobre Especies Invasoras 2010).

En el último siglo, derivado de la modernización del transporte, de las vías de comunicación y la gran apertura de rutas comerciales, la introducción de especies exóticas se ha incrementado. Aunado a esto, los cambios de uso de suelo, la alteración de los ecosistemas y el cambio climático están incrementando la vulnerabilidad de muchos hábitats, haciéndolos aún más susceptibles a la invasión biológica (Wilson et al. 2009).

Los impactos ecológicos que causan las especies invasoras pueden ser dramáticos y llegan incluso a causar la extinción de poblaciones y especies nativas, la degradación de los hábitats (particularmente en ambientes insulares), la alteración de procesos y funciones ecológicas, la modificación de los ciclos biogeoquímicos y de la estructura de los niveles tróficos (Bossdorf et al. 2005). La introducción y la dispersión de especies exóticas tiene como consecuencia el desplazamiento de especies nativas por competencia, depredación, transmisión de parásitos y patógenos, o por modificación del hábitat (Aguirre Muñoz et al. 2009; Comité Asesor Nacional sobre Especies Invasoras 2010).

En general, las especies invasoras deterioran los recursos naturales y, en consecuencia, los servicios ambientales, afectando así la producción de alimentos. De esta manera, pueden repercutir negativamente en sistemas agropecuarios, dañando la infraestructura pública, degradando las tierras de cultivo, afectando la calidad del agua y los paisajes, que a su vez pueden tener valor turístico o histórico (Comité Asesor Nacional sobre Especies Invasoras, 2010). Es por lo anterior que el impacto de las especies invasoras puede representar elevados

costos, tanto por el daño directo, como por el gasto invertido en su control y erradicación (Bossdorf et al. 2005).

En México residen al menos 46 de las 100 especies invasoras más dañinas del mundo (Aguirre Muñoz et al. 2009). La suma de plantas vasculares y vertebrados invasores registrados en país es de 1321 especies (González et al. 2014), aunque esta cifra puede estar subestimada debido a que los esfuerzos dirigidos a evaluar a las especies invasoras atienden principalmente a actividades productivas y no a los ecosistemas naturales (Aguirre Muñoz et al. 2009). Actualmente, las invasiones biológicas, junto con la destrucción del hábitat, representan los factores de riesgo más significativos y de mayor impacto (Sala et al. 2000; Aguirre Muñoz et al. 2009), y en el caso de los ecosistemas insulares, la introducción de especies exóticas es la primera causa de extinción de especies (Aguirre Muñoz et al. 2009).

1.1 *Kalanchoe delagoensis* y *K. daigremontiana* como especies invasoras

El género *Kalanchoe* es un grupo originario de Mozambique y Madagascar, pero actualmente se encuentra ampliamente distribuido debido a numerosas introducciones en regiones tropicales y subtropicales (Eggli, 2003). Una de las características más sobresalientes de algunas especies del género *Kalanchoe*, incluyendo *K. delagoensis* y *K. daigremontiana*, es la producción de propágulos clonales (plantlets o pseudobulbilos) que surgen de meristemas ubicados en los márgenes de sus hojas, los cuales antes de que se desprendan ya cuentan con raíces secundarias, tallo y dos pares de hojas, además de una reserva de almidón y agua que aprovechan durante la fase del establecimiento (Johnson, 1934). Es debido a esta característica que estas especies son comúnmente conocidas como “madre de millones”, y se ha reportado que los pseudobulbilos tienen una alta sobrevivencia bajo diferentes condiciones de luz y agua (Herrera y Nassar, 2009; Guerra-García, 2011).

Kalanchoe delagoensis es una especie invasora en Australia (Hannan-Jones y Playford, 2002), Sudáfrica y Estados Unidos (<http://environment.gov.au/biodiversity/trade-use>). En el caso de México, *K. delagoensis* se ha registrado en los estados de Querétaro, Veracruz e Hidalgo (REMIB), aunque también ha sido observada en Tamaulipas, San Luis Potosí, Yucatán y en el Distrito Federal (J. Golubov com. per.). Es una especie tetraploide, y no se han reportado

individuos diploides en su área de distribución natural ni en sitios donde se ha introducido (Hannan-Jones et al. 2005).

Por su parte, *K. daigremontiana* es una especie diploide que también presenta propagación clonal frecuente. Ha sido ampliamente introducida con fines hortícolas y se ha naturalizado en numerosas regiones (Hannan-Jones et al., 2005). *Kalanchoe daigremontiana* es capaz de formar híbridos con otras especies del género con las que comparte su área natural de distribución en Madagascar (Boiteau y Allorge-Boiteau, 1995). Los horticultores han usado esta propiedad para generar variedades interespecíficas, incluyendo al híbrido “Houghton” (*K. delagoensis* × *K. daigremontiana*; Hannan-Jones et al., 2005; Shaw 2008). Arthur Duvernoix Houghton (1870-1938) produjo la cruce en la que *K. delagoensis* fue la especie parental de polen, y le dio el nombre *K. tubimontanum*, aunque no lo publicó (Shaw 2008). Este híbrido es triploide, presenta características morfológicas intermedias, y se ha convertido en maleza en los rangos de distribución de sus especies progenitoras (Hannan-Jones et al., 2005; Shaw 2008).

En el caso de las poblaciones establecidas en México, se desconocen aspectos históricos importantes, como la procedencia de los individuos de las distintas poblaciones, el número de introducciones y de individuos introducidos, hace cuánto ocurrieron, y la variación genética ancestral de éstos. Además, no se tiene información acerca de si *K. delagoensis* y *K. daigremontiana* están hibridizando en México.

En especies cuyas poblaciones han pasado recientemente por cuellos de botella, como es el caso de las poblaciones introducidas, marcadores con bajas tasas de mutación (por ejemplo las aloenzimas) pueden presentar poca variación. Así, sólo los loci con tasas de mutación mayores pueden ser informativos (Schlötterer 2000). Los microsatélites son repeticiones en tándem de uno a seis nucleótidos que se encuentran en alta frecuencia en los genomas nucleares de la mayoría de las especies (Selkoe y Toonen 2006). También son conocidos como *simple sequence repeats* (SSR), *variable number tandem repeats* (VNTR) o como *short tandem repeats* (STR; Selkoe y Toonen 2006). La secuencia de repeticiones de los microsatélites puede presentar mutaciones debido a errores durante la replicación de ADN, lo que cambia el número de repeticiones y la longitud del fragmento (Schlötterer 2000).

Los microsatélites presentan altos niveles de diversidad alélica debido a que tienen grandes tasas de mutación. Estos altos niveles de variación genética los hacen un excelente

marcador genético para llevar a cabo estudios de procesos que ocurren a escalas de tiempo ecológicas (Schlötterer 2000). Además, son marcadores moleculares selectivamente neutros y segregan de forma mendeliana (Selkoe y Toonen 2006). Sin embargo, los microsatélites pueden subestimar la diversidad alélica, ya que alelos del mismo tamaño pueden provenir de distintos linajes (homoplasia). La homoplasia reduce la diversidad alélica que se observa y puede sobreestimar el flujo génico cuando la tasa de mutación es muy alta (Schlötterer 2000, Selkoe y Toonen 2006).

Hannan-Jones *et al.* (2005) desarrollaron nueve microsatélites para *K. delagoensis* y *K. daigremontiana*. A través del uso de estos microsatélites es posible evaluar los probables escenarios de la historia de introducción de *K. delagoensis*, *K. daigremontiana* y el híbrido Houghton a México. Asimismo, estudiar genéticamente estas especies potencialmente permitiría evaluar el mecanismo a través del cual se mantienen las poblaciones, esto es reproducción sexual o clonación.

II. HIPÓTESIS

1. *Kalanchoe delagoensis* y *K. daigremontiana* han pasado por al menos un cuello de botella al invadir México, y el crecimiento clonal es frecuente en ambas especies, por lo que se espera encontrar baja variación genética en las poblaciones estudiadas.
2. Estas especies presentan crecimiento en forma de manchones densos, por lo que la diferenciación genética se encontrará entre manchones, y poca o nula diversidad clonal dentro de ellos.
3. Debido a que son especies introducidas y las poblaciones se originaron hace relativamente poco tiempo, se observará baja o nula diferenciación entre éstas (a menos que se hayan originado a partir de distintos eventos de introducción).
4. Si está ocurriendo hibridación entre *K. delagoensis* y *K. daigremontiana* en las poblaciones de México, se encontrarán múltiples genotipos del híbrido Houghton formados por distintas combinaciones de los alelos presentes en las poblaciones mexicanas de las especies parentales.

III. OBJETIVOS

Objetivo general:

Conocer la diversidad genética de las poblaciones en México de las especies introducidas *Kalanchoe delagoensis*, *K. daigremontiana* y su híbrido, con base a ocho loci de microsatélites.

Objetivos particulares:

- Estimar la diversidad genética de las siguientes poblaciones:
 - *K. delagoensis*: Cadereyta y Mesa de León (Querétaro), Tula (Tamaulipas), y en la Reserva del Pedregal de San Ángel (REPSA, D.F.).
 - *K. daigremontiana*: Tula
 - Híbrido Houghton: Cadereyta, Mesa de León, REPSA y Tolantongo (Hidalgo).
- Comparar la diversidad genética entre poblaciones y entre especies.
- Determinar si existe hibridación entre *K. delagoensis* y *K. daigremontiana* en México.
- Identificar el principal mecanismo por el cual las poblaciones de ambas especies se mantienen (crecimiento clonal o reproducción sexual).

IV. ANTECEDENTES

4.1 Fases del proceso invasivo

La invasión biológica es un proceso que puede dividirse en fases, en cada una de las cuales hay barreras bióticas y abióticas que la especie o población debe superar para poder pasar a la siguiente fase (Richardson et al. 2000; Blackburn et al. 2011). La introducción ocurre cuando un organismo o su propágulo ha sobrepasado una barrera geográfica gracias a diversas actividades humanas (Richardson et al. 2000). La primera fase es la introducción deliberada o accidental de la especie. Este proceso se ha incrementado en las últimas décadas con el comercio internacional y la globalización. Un ejemplo de introducción deliberada son las plantas usadas en la agricultura u horticultura, además de especies de animales consumidos o empleados por el hombre. En este caso, la siguiente barrera es puesta por el hombre, ya que puede impedir que la población se escape del confinamiento y se expanda a ecosistemas naturales (Blackburn et al. 2011; Figura 1).

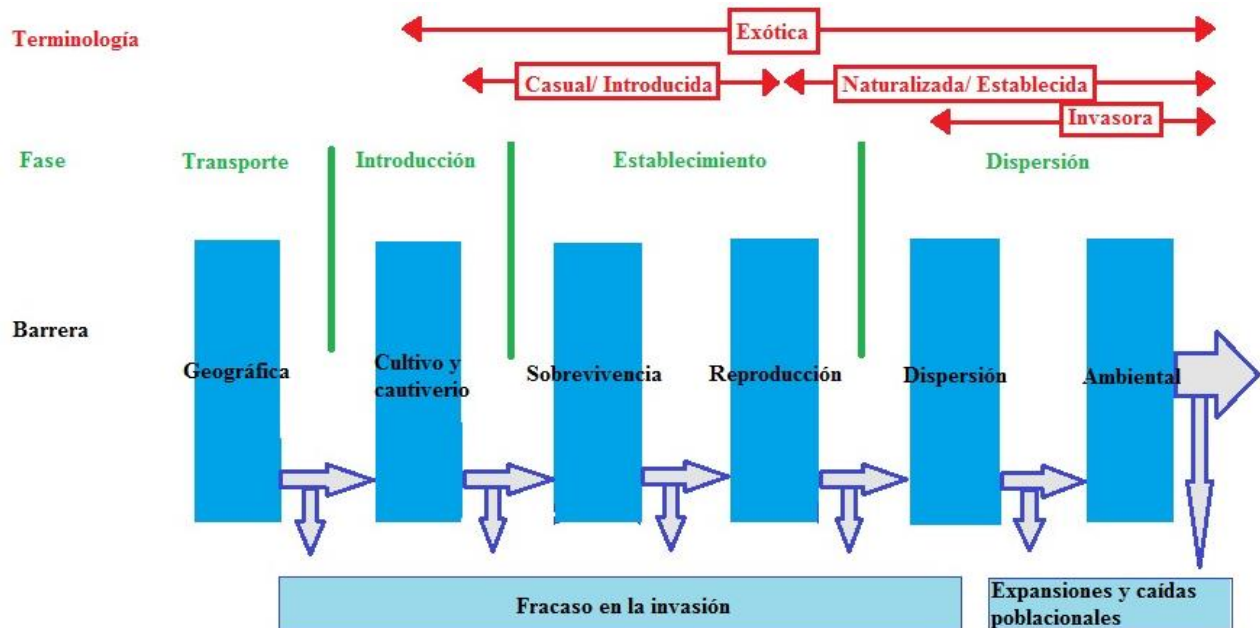


Figura 1. Fases del proceso invasivo divididas por las barreras a las que se enfrentan las poblaciones introducidas. Tomado y modificado de Blackburn et al. (2011).

Una especie se puede considerar naturalizada en un sitio introducido cuando las poblaciones son autosustentables, lo que depende de procesos demográficos como la supervivencia y la reproducción. A su vez, los procesos demográficos son afectados por distintos factores (Blackburn et al. 2011):

- Intrínsecos de la especie: están relacionados con la biología de los organismos, y entre ellos se encuentra la tasa reproductiva y de mortandad, si es especialista o generalista, su capacidad de competencia, etc.
- Factores del sitio: pueden ser bióticos, como la presencia de enemigos o de mutualistas; o abióticos, por ejemplo, las condiciones climáticas.
- Factores estocásticos: especialmente influye la cantidad de individuos o propágulos que son introducidos.
- Interacción entre los distintos factores.

El establecimiento es un proceso poblacional, donde los individuos pueden sobrevivir y reproducirse en el ambiente exótico, pero la población no se establecerá si la tasa de crecimiento a largo plazo es negativa. Generalmente se necesitan varios ciclos de sobrevivencia y reproducción para asegurar el establecimiento (Blackburn et al. 2011). También pueden ocurrir procesos metapoblacionales, en los cuales existen poblaciones fuente y poblaciones sumidero, y pueden desaparecer poblaciones y establecerse nuevas, como sucede comúnmente en plagas agrícolas (Blackburn et al. 2011).

Finalmente, la especie se convierte en invasora cuando es capaz de expandirse a áreas lejanas al sitio donde fue introducida. En este punto ya ha superado barreras abióticas y bióticas del área (Richardson et al. 2000). Sin embargo, mientras más se disperse, más distinto será el ambiente, por tanto, una población expandiéndose enfrenta múltiples eventos de establecimiento (Blackburn et al. 2011; Figura 1).

Los factores que pueden afectar la capacidad de las plantas en la velocidad y eficiencia de la colonización incluyen una amplia tolerancia ambiental, altos niveles de plasticidad fenotípica, mecanismos reproductivos (como la capacidad de autofecundación, autocompatibilidad o reproducción asexual), número efectivo de migrantes y/o a largas distancias, altas tasas de crecimiento poblacional y elevada capacidad competitiva. Estos mismos factores determinan el éxito de especies que han sido trasladadas por el hombre fuera de sus rangos nativos y que deben enfrentar nuevos ambientes (Beest et al. 2012). Así, para que una planta invada una nueva región debe tener altos niveles de tolerancia fisiológica y de plasticidad fenotípica (Müller-Schärer et al. 2004; Richardson y Pysek 2006), como en el caso de la cianobacteria *Cylindrospermopsis raciborskii*, que presenta comportamiento invasivo en Europa y África, y se ha reportado en

áreas templadas fuera de su rango natural de distribución (Briand et al. 2004). Esta bacteria posee una gran tolerancia ambiental a un amplio rango de condiciones climáticas, y aunado al cambio climático, han permitido su rápida expansión (Briand et al. 2004). Sin embargo, una planta que no posea altos niveles de plasticidad o tolerancia puede invadir un hábitat a partir de una ventana de oportunidad, por ejemplo, cambios en el ambiente del sitio introducido (Richardson y Pysek 2006). Para *K. delagoensis*, se ha visto que es capaz de enfrentar una gran diversidad de condiciones lumínicas e hídricas con éxito (Guerra-García, 2011).

Otra posibilidad es que la población sea capaz de diferenciarse genéticamente y que tenga el potencial adecuado de adecuación a través mutaciones que son sujetas a las nuevas presiones de selección (Müller-Schärer et al. 2004; Richardson y Pysek 2006). Por ejemplo, el caso de las plantas herbáceas *Solidago altissima* y *S. gigantea*, que fueron introducidas a Europa hace aproximadamente 250 años, provenientes de Norte América, y cuyas poblaciones en las zonas introducidas muestran diferenciación latitudinal genética y fenotípica (Weber y Schmid 1998). Es importante mencionar que el alto nivel de tolerancia y plasticidad, y la diferenciación genética no son procesos mutuamente excluyentes (Müller-Schärer et al. 2004).

La variabilidad genética que permite la adaptación de las especies introducidas a nuevos ambientes puede provenir de mutaciones nuevas o de variación genética preexistente. Debido a que durante el proceso invasivo la adaptación al nuevo ambiente puede ocurrir de forma rápida en pocas generaciones, se espera que en la mayoría de los casos se deba a alelos que ya existían en la población, por lo que el número de individuos que arriban y la diferencia genética entre ellos, determinan la variación genética inicial y la capacidad de adaptarse rápidamente. Además, alelos neutrales o incluso deletéreos en el rango nativo pueden convertirse en ventajosos en el sitio introducido (Prentis et al. 2008).

En la mayoría de las invasiones hay un proceso temporal con una fase *lag* poco después de la introducción (Suarez y Tsutsui 2008). Esta fase *lag* puede ser simplemente el resultado de un patrón de crecimiento poblacional (por ejemplo, las fases tempranas del crecimiento exponencial) a partir de una pequeña población inicial. Sin embargo, otra posibilidad es que representa el tiempo durante el cual ocurre una evolución adaptativa a las condiciones del nuevo sitio. Pueden ocurrir cambios genéticos que permiten que la población supere esta fase *lag*, incluyendo eventos como introducciones secundarias, hibridación o la adquisición espontánea de nuevos atributos genéticos (Suarez y Tsutsui 2008). Aunque otros procesos o características no

genéticas de la especie introducida también pueden contribuir a la superación de la fase *lag*, como mecanismos de defensa, ser buenos competidores, clonalidad, amplitud ecológica, altas tasas de crecimiento, producción de una gran cantidad de propágulos y la dispersión por medios no especializados (Hager y Trelp 2003). Además, se ha argumentado que la fase *lag* podría también estar relacionada con la incapacidad de los humanos para detectar poblaciones pequeñas, y no es en sí misma una característica de las especies (Suarez y Tsutsui 2008)

El éxito de las especies invasoras es comúnmente atribuido a la ausencia de enemigos naturales y competidores, quienes regulan a las poblaciones en sus áreas naturales de distribución (Allenforf y Kundquist 2003; Richardson y Pysek 2006). Adicionalmente Blossey y Nötzold (1995) han propuesto que después de que las poblaciones introducidas quedan libres de sus enemigos, pasan por cambios evolutivos que resultan en un mayor vigor. Si existe un trueque entre la asignación de recursos en crecimiento y defensa, la selección natural favorecerá genotipos con menos defensas pero más competitivos (Blossey y Nötzold 1995). Sin embargo, es necesario poner esta hipótesis a prueba haciendo estudios de jardín común comparando la cantidad de recursos asignados al crecimiento y a la defensa de individuos en las áreas introducidas e individuos provenientes del área natural de distribución (Bossdorf et al. 2005)

Por definición, las especies introducidas arriban a regiones donde no evolucionaron, por lo que enfrentan nuevas presiones de selección. La llamada “paradoja de las invasiones biológicas” cuestiona cómo algunas especies introducidas pueden ser tan exitosas compitiendo contra especies nativas supuestamente bien adaptadas a las condiciones locales, a pesar de los problemas asociados con poblaciones pequeñas, la falta de diversidad genética por el tamaño pequeño inicial, y una supuesta carencia de adaptación a las condiciones locales (Allenforf y Lundquist 2003). Las plantas invasoras pueden evolucionar por deriva génica y/o endogamia, por la creación de nuevos genotipos a través de la hibridación intra e interespecífica, y por cambios drásticos en los regímenes de selección impuestos por el nuevo ambiente, que pueden causar rápidos saltos adaptativos, aunque este último proceso requiere la existencia de variación genética sobre la cual pueda actuar la selección (Richardson y Pysek 2006).

4.2 Diversidad genética en poblaciones introducidas

El proceso de invasión puede ser facilitado por la presencia de un sustrato genético sobre el que pueda actuar la selección natural (Lee 2002). Sin embargo, las invasiones biológicas generalmente se asocian con cuellos de botella, ya que las poblaciones pueden ser fundadas a partir de unos cuantos individuos o por un único o pocos eventos de introducción, además de que la población introducida se encuentra aislada de flujo génico (Prentis et al. 2008). Es por eso que la cantidad de eventos de introducción, el número de individuos introducidos y la distancia genética entre éstos determina en gran medida la diversidad genética de las poblaciones y su capacidad de evolucionar (Lee 2002).

En poblaciones fundadoras pequeñas, se espera que presenten menor variación genética, en comparación con aquellas en su área de distribución natural. El tamaño poblacional pequeños puede ocasionar depresión por endogamia, deriva génica y baja capacidad de adaptación (Roman y Darling 2007; Prentis et al. 2008). Así, la cantidad de individuos que llegan, el tiempo de residencia, el número de introducciones, la composición y similitud genética de los individuos fundadores determinan la variación genética en poblaciones introducidas, y pueden tener un gran impacto en la probabilidad de invasión de una especie (Richardson y Pysek 2006; Wilson et al. 2009). Probablemente el tamaño poblacional en la introducción sea uno de los factores de mayor impacto, ya que al liberar muchos individuos en una nueva área se incrementa la probabilidad de tener una muestra representativa de la diversidad genética fuente (Roman y Darlin 2007). Además, la probabilidad de invasión se incrementa con el tiempo desde la introducción inicial, ya que se aumenta el banco de semillas o propágulos, la dispersión, el establecimiento y la fundación de nuevas poblaciones (Richardson y Pysek 2006).

Por otro lado, en las poblaciones pequeñas durante las primeras fases de la invasión, los alelos deletéreos recesivos se expresan con más frecuencia en estado homocigoto y pueden ser eliminados con mayor efectividad por la selección que en poblaciones grandes. Sin embargo, este proceso depende del tamaño efectivo de la población que a su vez es determinado por factores como el sistema reproductivo, la diferencia genética entre los individuos y el número de introducciones, entre otras características y procesos (Bossdorf et al. 2005).

Se espera que la diversidad genética en las poblaciones invasoras sea menor que en su área natural de distribución, resultado de los cuellos de botella por lo que ha pasado. Sin

embargo, una diversidad muy baja restringe su capacidad de establecerse y adaptarse. Pese a lo anterior, no se han encontrado patrones claros entre el éxito de invasión y los niveles de variación genética, ya que hay numerosos ejemplos de plantas invasoras con diversidad genética intermedia y alta (Tabla 1). Es destacable el caso de *Ambrosia artemisiifolia* en Francia, que presenta una diversidad mayor en el rango de distribución introducido que en el natural, resultado de varios eventos de introducción con individuos procedentes de diferentes poblaciones nativas (Genton et al. 2005). En la revisión realizada por Roman y Darling (2007) encuentran que el 69% de las plantas acuáticas invasoras poseen una diversidad genética igual y superior a las poblaciones nativas; inclusive en algunas poblaciones invasoras han ocurrido rápidos cambios evolutivos en los nuevos ambientes. Estos resultados son consistentes con la hipótesis que vincula el incremento en la presión del propágulo (*propagule pressure*), es decir, la cantidad de individuos introducidos y en número de introducciones, y el éxito de la invasión (Roman y Darlin 2007).

Tabla 1. Ejemplos de especies introducidas con distintos niveles de diversidad genética.

	Especie	Población estudiada	Marcador	Referencia
Cero diversidad genética	<i>Pennisetum setaceum</i>	Arizona, California y Hawái	ISSRs	Poulin <i>et al.</i> (2005)
	<i>Alternanthera philoxeroides</i>	Sur de China	RAPDs e ISSRs	Wang <i>et al.</i> (2005)
	<i>Eichhornia crassipes</i>	China	RAPDs e ISSRs	Weiguo <i>et al.</i> (2006)
	<i>Fallopia japonica</i>	Reino Unido	RAPDs	Hollingsworth y Bailey (2000)
	<i>Elodea canadensis</i> , <i>Egeria densa</i> y <i>Lagarosiphon major</i>	Nueva Zelanda	AFLPs	Lambertini <i>et al.</i> (2010)
Diversidad genética media	<i>Alliaria petiolata</i>	Canadá y Estados Unidos	ISSRs	Meekins <i>et al.</i> (2001)
	<i>Pueraria lobata</i>	Sur de Estados Unidos	Alozimas	Pappert <i>et al.</i> (2000)
	<i>Pennisetum ciliare</i>	Noroeste de México	ISSRs	Gutierrez-Ozuno <i>et al.</i> (2009)
	<i>Hypericum perforatum</i>	Estados Unidos	AFLPs	Maron <i>et al.</i> (2004)
Diversidad genética alta	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	Francia	Microsatélites	Genton <i>et al.</i> (2005)

Por el contrario, también existen casos de invasoras con diversidad genética baja o nula (Tabla 1), resultado tanto de estrictos cuellos de botella como de que las poblaciones fueron fundadas a partir de individuos similares genéticamente y/o pocos eventos de introducción. En estos casos la plasticidad fenotípica y la tolerancia fisiológica tienen papeles muy importantes. Daehler (2003) mostró que las especies invasoras tienen mayor plasticidad que las especies nativas con las que coocurren; sin embargo, no tomó en cuenta los niveles de variación genética en las especies que estudió. Además, aún cuando la varianza genética aditiva sea el sustrato sobre el cual actúa la selección, estudios recientes indican que la varianza genética epistática, la variación de un atributo en una población debido a los efectos epistáticos, puede ser también importante ya que, sin la generación de nuevas mutaciones, la epistasis potencialmente puede proveer nuevo sustrato para la acción de la selección (Lee 2002).

4.3 Poliploidía e hibridación en especies invasoras

La poliploidía (la multiplicación de todo el genoma) ha sido una fuerza importante en la evolución del genoma de los organismos eucariontes, y en particular de las plantas, donde es un mecanismo por el cual puede ocurrir la especiación (Arrigo y Barker 2012). Alrededor del 35% de las especies de plantas tienen números cromosómicos que indican que ocurrieron duplicaciones del genoma recientemente. Se estima que aproximadamente el 15% de los eventos de especiación en las plantas con flores son resultado de la poliploidía (Arrigo y Barker 2012). Estudios recientes han mostrado que los eventos de duplicación fueron cruciales para el origen de genes del desarrollo y de regulación encontrados en los genomas de las angiospermas (De Bodt et al. 2005). Estos eventos de duplicación ancestrales probablemente tuvieron un papel importante en el origen y tasa de diversificación de las angiospermas (De Bodt et al. 2005).

La poliploidía puede llegar a ser ventajosa ya que después de que se han formado los organismos poliploides, pasan a través de un cuello de botella de inestabilidad (Comai 2005). Los poliploides adaptados que evadan la extinción entran a una trayectoria evolutiva de diploidización, durante la cual la redundancia genómica se reduce (Beest et al. 2012). Los genes duplicados pueden perderse o ser mantenidos. De conservarse, puede ocurrir subfuncionalización en algunos genes duplicados, es decir, los genes se especializan en algún aspecto de las

funciones originales, o también pueden adquirir nuevas funciones, a lo que se conoce como neofuncionalización (Comai 2005; Beest et al. 2012).

Sin embargo, se ha sugerido que la poliploidía se presenta en mayor frecuencia entre las plantas invasoras que entre las angiospermas en general (Prentis et al. 2008). La poliploidía resultado de la duplicación intraespecífica del genoma (autoploidía) o de la fusión de genomas de distintas especies (aloploidía) potencialmente tiene consecuencias ecológicas y evolutivas en el éxito las plantas introducidas (Beest et al. 2012). Se han registrado casos en los que el nivel de ploidía de todos los individuos de poblaciones introducidas es mayor a la ploidía en el rango natural de distribución, como ocurre en *Fallopia japonica* en las poblaciones invasoras en Europa (Hollingsworth y Bailey 2000). Probablemente, la alta frecuencia de poliploides entre las invasoras se debe a que estos organismos con varias copias genéticas pueden presentar mayor adecuación, competitividad, capacidad de colonización, plasticidad fenotípica y/o tolerancia fisiológica (Prentis et al. 2008).

Los organismos poliploides poseen características que les permiten mantener mayores niveles de diversidad genética, y así pueden compensar los problemas de poblaciones fundadas a partir de pocos individuos (Richardson y Pysek 2006). La primera de estas ventajas es la heterosis que puede promover que los poliploides sean más vigorosos que sus progenitores diploides (Comai 2005). La heterosis o vigor híbrido resulta de la combinación de información genética y epistática proveniente de los padres (Bansal et al. 2012).

Cuando surgen aloploides, los genomas parentales, que son divergentes entre sí, se fijan, mientras que en la progenie de un híbrido diploide la heterosis y la heterocigosis disminuyen. El apareamiento forzado de los cromosomas homólogos en los aloploides impide la recombinación entre genomas, manteniendo el nivel de heterocigosis a través de las generaciones (Comai 2005). Esta forma de heterosis, denominada heterosis fija, resulta de la interacción favorable entre los genes en los genomas homólogos (Bansal et al. 2012).

Por otro lado, la redundancia de genes permite el enmascaramiento de alelos recesivos deletéreos, lo cual puede ser importante cuando se trata de poblaciones aisladas que han pasado por cuellos de botellas severos, y la purga genética de alelos deletéreos no puede ocurrir debido a los pocos individuos reproductivos (Comai 2005). La tercera ventaja de la poliploidía es que puede tener efectos ventajosos en la sexualidad de los organismos, anulando sistemas de

autoincompatibilidad y permitiendo la autofertilización, además de que algunas veces pueden formarse líneas altamente clonales (Comai 2005).

Algunos ejemplos de plantas invasoras donde se ha estudiado el papel de la ploidía en el éxito de invasión son *Impatiens glandulifera* (Kollmann y Banuelos, 2004), *Rubus alceifolius* (Amsellem et al. 2001) y *Senecio cambresis* (Abbott y Lowe 2004).

La hibridación, tanto intra- como interespecífica, ha sido sugerida como ventajosa en el proceso invasivo de plantas (Prentis et al 2008), ya que puede mitigar la pérdida de variabilidad genética durante los eventos fundadores, y generar nuevos genotipos (Lee 2002). Como evidencia que apoya esta hipótesis está el caso de *Ambrosia artemisiifolia* y *Cytisus scoparius*, que han experimentado varios eventos de introducción e hibridación intraespecífica (Bossdorf et al. 2005; Whitney et al. 2006). En el área de la Bahía de San Francisco, Estados Unidos, cuatro especies de pasto del género *Spartina* fueron introducidas a partir de sus áreas nativas en Europa, Chile y el oeste de Norte América. Desde su introducción, algunas de estas especies se han dispersado ampliamente y han hibridizado con el pasto nativo *S. folioso*, produciendo clones capaces de desplazar a las especies parentales (Ayres et al. 2004)

Los híbridos de la primera generación pueden incrementar su adecuación gracias a que presentan heterosis fija, lo que podría resultar en un incremento de su tamaño, capacidad de reproducción, crecimiento y/o competencia (Prentis et al. 2008), probablemente resultado de interacciones nuevas entre los genes, al enmascaramiento de alelos recesivos deletéreos, por la transferencia de nuevos genes, o ventaja del heterocigoto (Lee 2002). Además, la recombinación puede generar nuevas combinaciones de alelos sobre los que la selección natural puede actuar y producir fenotipos mejores para colonizar nuevos ambientes (Rieseberg et al. 2003).

La ventaja de los híbridos en el proceso invasivo también puede deberse a que tienen características nuevas o extremas con respecto a las líneas parentales. Estos fenotipos extremos son resultado de la segregación en la que los alelos de ambos padres se combinan para producir características extremas que superan a los valores fenotípicos en dirección positiva o negativa (Rieseberg et al. 2003).

V. METODOLOGÍA

5.1 Colecta de material biológico

Se colectó tejido vegetativo de individuos de *K. delagoensis*, *K. daigremontiana* y el híbrido Houghton en las siguientes localidades: Mesa de León y Cadereyta, Querétaro; Tula, Tamaulipas; Tolantongo, Hidalgo; la Reserva del Pedregal de San Ángel (REPSA), en el Distrito Federal (Tabla 2; Figura 2). Las dos especies y el híbrido no se encontraban en simpatria en ninguna localidad, estando presentes sólo dos de las tres (principalmente *K. delagoensis* y el híbrido) o, como en Tolantongo, sólo se encontró el híbrido. Es importante destacar que las localidades se encuentran separadas por distancias que van de los 45 km (Cadereyta-Mesa de León) a los 411 km (REPSA-Tula; Tabla 3).

Dado que uno de los objetivos del estudio es conocer el principal mecanismo de propagación de la especie (reproducción sexual o clonalidad) y la extensión del proceso clonal, se llevó a cabo un segundo muestreo en la población de *K. delagoensis* ubicada en Tula, donde se encontraron varios genotipos multilocus. En este muestreo se colectó tejido de cinco manchones: de cada uno de tomó una planta focal (la de mayor tamaño) y diez más de su alrededor, para un total de 55 individuos más de *K. delagoensis* en este sitio (Tabla 2).

Tabla 2. Número de individuos (*n*) colectados, fecha de colecta de cada especie (mes/año) y las coordenadas geográficas asociadas a las localidades.

Localidad	Coordenadas	Fecha de colecta	<i>K. delagoensis</i> (<i>n</i>)	<i>K. daigremontiana</i> (<i>n</i>)	Híbrido Houghton (<i>n</i>)
Cadereyta, Querétaro	20°55'14.26"N 99°55'21.95"W	08/2011	40	0	40
Mesa de León, Querétaro	20°41'11.51"N 99°34'9.45"W	11/2012	40	0	40
Tula, Tamaulipas	23° 0'37.71"N 99°43'16.47"W	08/2011 03/2012	40 55	40	0
Tolantongo, Hidalgo	20°35'36.70"N 99° 7'55.89"W	01/2013	0	0	40
REPSA, Distrito Federal	19°19'9.21"N 99°10'55.95"W	08/2011	40	0	40

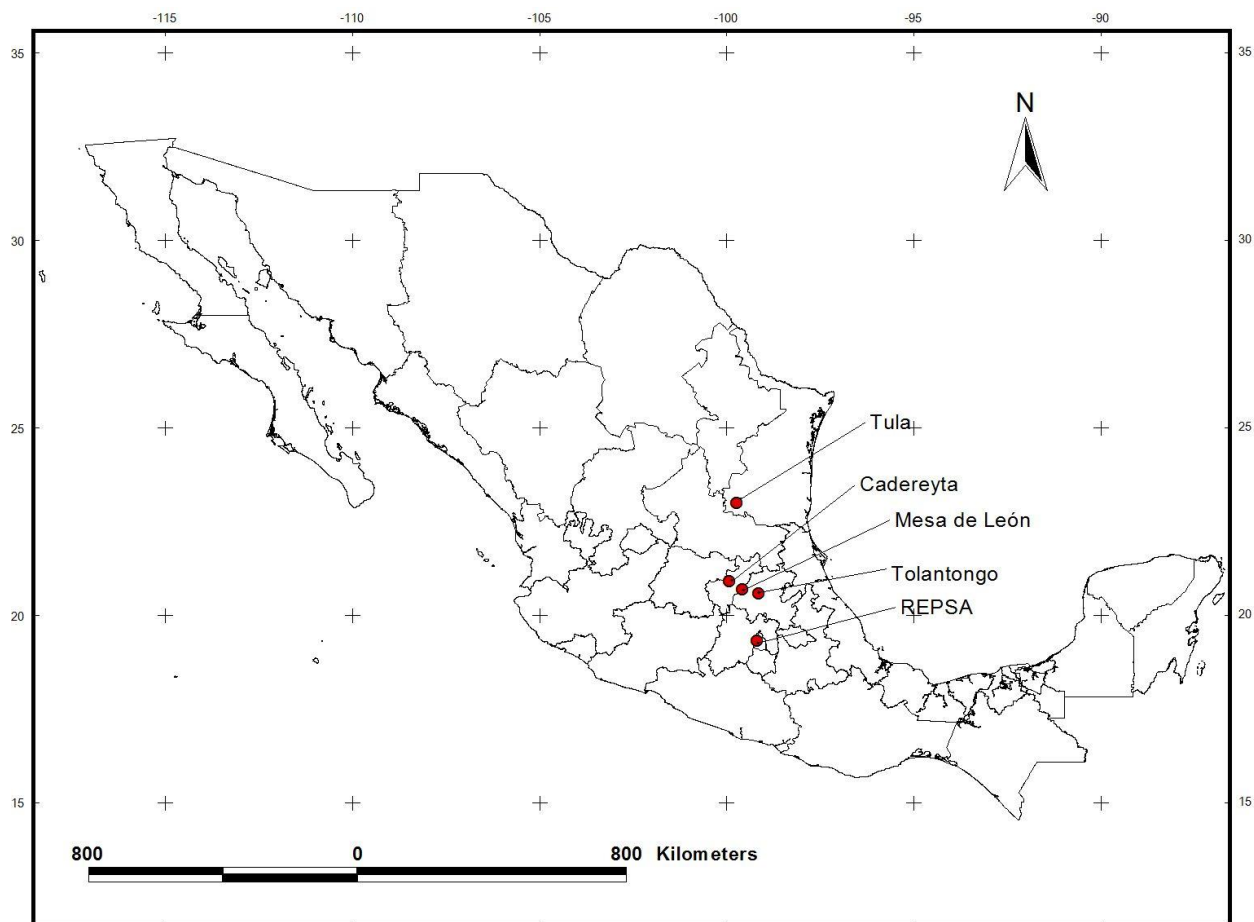


Figura 2. Ubicación de las localidades de donde se colectó *K. delagoensis*, *K. daigremontiana* e híbrido.

Tabla 3. Distancia (km) entre las localidades donde se colectó el material biológico.

	Tula	Cadereyta	Mesa de León	Tolantongo	REPSA
Tula	-	234	258	275	411
Cadereyta		-	45	90	193
Mesa de León			-	47	157
Tolantongo				-	140
REPSA					-

5.2 Extracción de ADN y amplificación de microsatélites

El tejido colectado se colocó en silica gel y se conservó a -4°C hasta el procesamiento de la muestra. Se extrajo el ADN utilizando el método de bromuro de amonio cetiltrimetilo (CTAB) (modificado de Doyle y Doyle, 1990; Anexo A).

Se amplificaron los loci de microsatélites a través de una Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*; PCR) usando los parámetros descritos por Hannan-

Jones et al. (2005). Los componentes de la amplificación fueron: 25ng de DNA, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM de cada primer, 0.2 mM de dNTP's (Invitrogen), 5 µL de PCR buffer (5X) y 1U de *Taq* polimerasa (Promega) en un volumen de reacción final de 25 µL. Las condiciones de los ciclos fueron de 94°C de temperatura de desnaturalización por 4 min, seguido por 35 ciclos que consistían en 94°C por 30 s, 50°C por 30 s (excepto para el locus UQBdel161, que fue de 55°C), 72°C por 1 min, en un termociclador Applied Biosystem Mod. 2720.

De los nueve loci de microsatélites nucleares desarrollados por Hannan-Jones et al. (2005), no se logró amplificar el UQBdel104, aún probando distintas concentraciones de los reactivos y diferentes temperaturas de alineación (las características de los microsatélites, condiciones de amplificación y secuencias de los primers pueden ser consultadas en el anexo B). Se verificó la amplificación de los marcadores mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Los productos de PCR con los fragmentos de tamaño esperado se mezclaron para hacer lecturas multiplex, y se enviaron al servicio de análisis de fragmentos del Roy. J. Carver Biotechnology Center de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign, Estados Unidos. Los análisis se realizaron en un secuenciador automático ABI Prisma 3730xl (Applied Biosystems), con un marcador de pares de bases ROX400. Para conocer el tamaño de los alelos de cada locus se empleó el software Peak Scanner 1.0 (Applied Biosystems). Es importante notar que el tamaño de los alelos fue ajustado de acuerdo con los alelos reportados previamente por Hannan-Jones et al. (2005) para que los resultados fueron comparables.

Se estimó el número de genotipos multilocus, el número de alelos por locus, el porcentaje de loci polimórficos y el número promedio de alelos por locus; además se obtuvo la proporción de genotipos distinguibles como G/N, donde G es el número de genotipos multilocus y N el tamaño de la muestra (Ellstrand y Roose 1987). La heterocigosis observada (*H*) se calculó como la proporción de heterocigotos.

La similitud genética (*F*) entre genotipos se estimó de acuerdo con (Nei y Li 1979):

$$F = 2n_{xy}/(n_x + n_y)$$

donde n_{xy} es el número de fragmentos compartidos entre los dos genotipos, y $n_x + n_y$ es el número total de fragmentos en ambas líneas. La distancia genética (*D*) se calculó como $1 - F$.

Se compararon los genotipos encontrados de *K. delagoensis* con los reportados por Hannan-Jones et al. (2005) de poblaciones australianas y de Madagascar. Se construyó un dendograma de distancias genéticas de Nei de los genotipos de la población de Tula y los australianos con el programa Populations 1.2.32 (Langella 2002).

VI. RESULTADOS

Se obtuvieron 17, 13 y 15 alelos en *K. delagoensis*, en *K. daigremontiana*, y en el híbrido Houghton, respectivamente. En el caso de *K. delagoensis* se detectaron de uno (UQBdel161) a cuatro (UQBdel001) alelos por locus; en *K. daigremontiana* de uno (UQBdel001, UQBdel107, UQBdel165) a dos (UQBdel011, UQBdel024, UQBdel144, UQBdel161, UQBdel175); y en el híbrido Houghton el rango fue de uno (UQBdel107, UQBdel161) a tres (UQBdel144). El número promedio de alelos por locus fue 2.12 para *K. delagoensis*; 1.62 para *K. daigremontiana*; y 1.87 para el híbrido Houghton.

Únicamente se encontró un genotipo multilocus en las poblaciones de *K. daigremontiana* (Genotipo 1; Tabla 4) y del híbrido Houghton (Genotipo I; Tabla 4). En el caso de las poblaciones de *K. delagoensis* localizadas en Cadereyta, Mesa de León, Tolantongo y REPSA se identificó un genotipo multilocus (Genotipo A), mientras que en la población ubicada en Tula se encontraron cuatro genotipos (Genotipos A, B, C, D). Los genotipos de *K. delagoensis* comparten cinco alelos (21.74%) con el híbrido, mientras que no comparte ninguno con *K. daigremontiana* (Figura 3). Por su parte, *K. daigremontiana* y el híbrido comparten tres alelos (13.04%), mientras que las dos especies y el híbrido comparten siete alelos (30.43%). Finalmente, los alelos exclusivos de *K. delagoensis* son cinco, tres en *K. daigremontiana* y cero el híbrido (Figura 3).

Tabla 4. Composición alélica (tamaño en pb) de los genotipos multilocus encontrados en las poblaciones de *K. delagoensis*, *K. daigremontiana* y el híbrido Houghton.

Locus	<i>K. delagoensis</i>				<i>K. daigremontiana</i>	Híbrido
	Genotipo A	Genotipo B	Genotipo C	Genotipo D	Genotipo 1	Genotipo I
UQBdel161	118	118	118	118	118, 120	118
UQBdel024	93, 105	93, 105	93, 105	93, 105	93, 97	93, 97, 105
UQBdel107	159	159	159	159	171	159
UQBdel144	110, 113	110, 113	110, 113	110, 113	110, 113	110, 113
UQBdel001	130, 132, 162, 168	132, 162, 168	130, 132, 162, 168	132, 162, 168	124	124, 130
UQBdel011	97, 101	97, 101	97, 101	101	101, 109	101, 109
UQBdel165	159, 162, 165	159, 162, 165	159, 162	159, 162, 165	162	159, 162
UQBdel175	166, 168	166, 168	166, 168	166, 168	162, 166	166, 168
Frec. absoluta	242	7	4	2	40	160
Frec. relativa	0.949	0.027	0.016	0.008	1	1
H_o		0.750			0.625	0.750
G/N		0.019			0.025	0.006

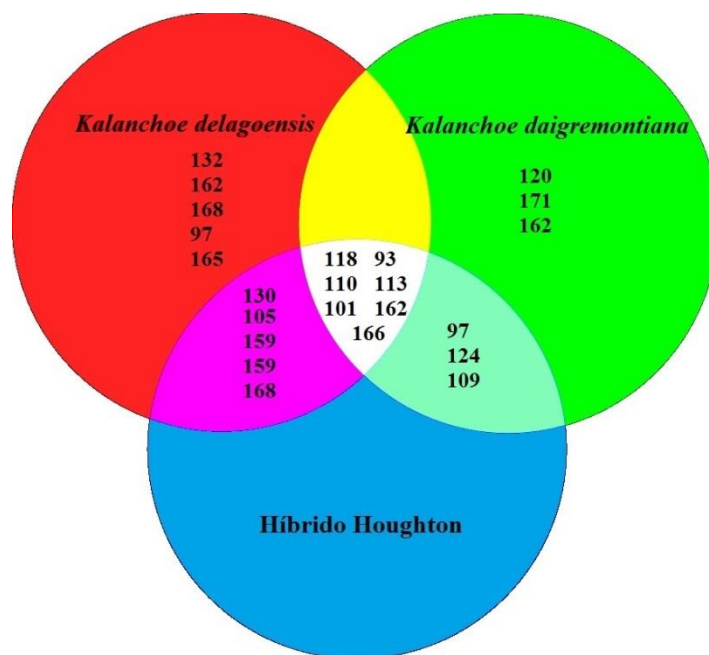


Figura 3. Diagrama de Venn donde están representados los conjuntos de alelos de las dos especies (*K. delagoensis* y *K. daigremontiana*) y del híbrido, y las intersecciones muestran los alelos que comparten.

En el segundo muestreo de la población de *K. delagoensis* de Tula, organizado de acuerdo a los manchones, los 95 individuos colectados pertenecían al genotipo A; por tanto, este genotipo se encuentra en alta frecuencia (Tabla 4), mientras que los genotipos B, C y D están presentes en bajas frecuencias (Tabla 4). Además, estos tres genotipos no presentaron alelos nuevos y son subconjuntos del genotipo A.

Se estimó la heterocigosis observada para las poblaciones de cada especie y del híbrido (Tabla 4), encontrando la heterocigosis más baja en *K. daigremontiana*. La proporción de genotipos distinguibles fue baja para todos los casos, aunque el híbrido Houghton mostró el menor valor (0.006; Tabla 4). Dado a que los genotipos detectados de *K. delagoensis* en la población de Tula presentaron diferencias pequeñas entre ellos, las similitudes genéticas fueron altas (0.94-0.97), y, por lo tanto, las distancias genéticas fueron bajas (0.03-0.06; Tabla 5).

Tabla 5. Distancias (‡) y similitudes (*) genéticas entre los genotipos de *K. delagoensis*

	Genotipo A	Genotipo B	Genotipo C	Genotipo D
Genotipo A	-	0.03‡	0.03‡	0.06‡
Genotipo B	0.97*	-	0.03‡	0.03‡
Genotipo C	0.97*	0.97*	-	0.03‡
Genotipo D	0.94*	0.97*	0.97*	-

En el dendograma construido con las distancias entre los genotipos de *K. delagoensis* detectados en este trabajo y los reportados por Hanna-Jones et al. (2005; Figura 4), se observa una clara separación entre los genotipos australianos y de México; además, las distancias entre los genotipos de México son muy pequeñas, mientras que para los genotipos de Australia son ligeramente mayores. Los doce genotipos detectados en las poblaciones de Madagascar no están incluidos dentro del dendograma porque no fueron reportados por Hannan-Jones et al. (2005)

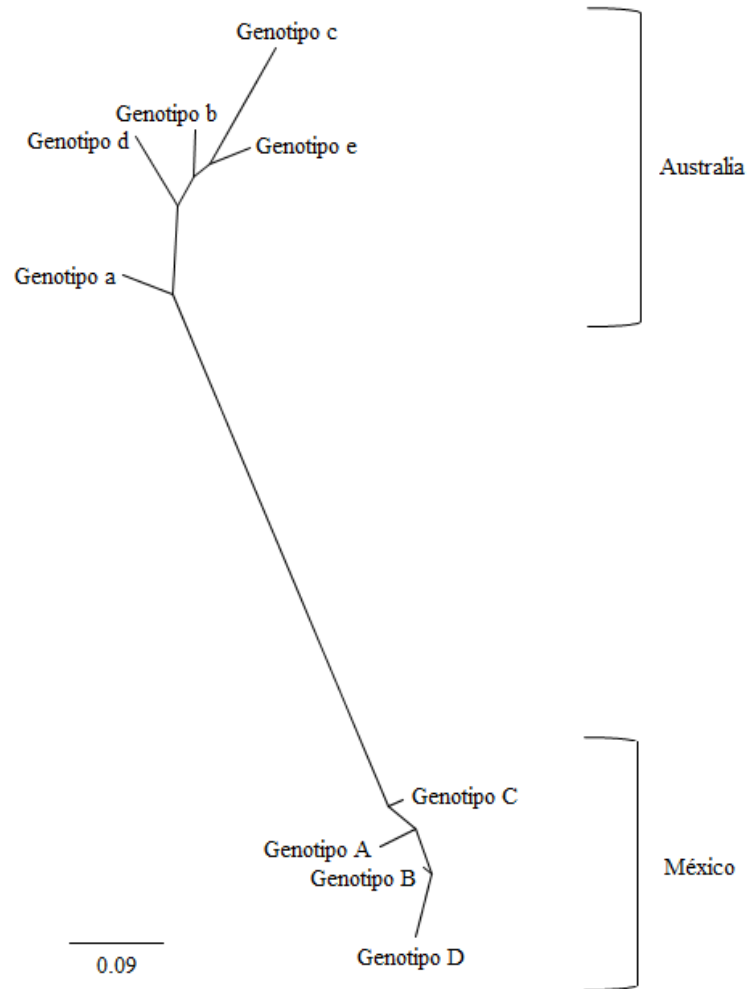


Figura 4. Dendograma de los genotipos de *K. delagoensis* construido con las distancias genéticas de Nei.

VII. DISCUSIÓN

La presencia de un único genotipo en las poblaciones en México para *K. daigremoentiana* y el híbrido Houghton, además de la poca variación existente entre los genotipos de *K. delagoensis*, sugiere fuertemente que para cada especie ocurrió un único evento de introducción exitoso a México, a partir del cual lo más probable es que se hayan dispersado por crecimiento clonal.

Al comparar los resultados obtenidos con los reportados por Hannan-Jones et al. (2005), quienes usaron los mismos microsatélites con individuos de poblaciones exóticas australianas, así como unos pocos de poblaciones nativas de Madagascar, se observa que las poblaciones introducidas en Australia tienen una reducción en la diversidad genética original; sin embargo, la pérdida de variabilidad en ese caso no es tan significativa como en las poblaciones de México. En los 92 individuos que analizaron provenientes de poblaciones australianas (invasoras) de *K. delagoensis*, encontraron de 1 a 9 alelos por locus, un total de 31 alelos, de los cuales comparte 9 (37.5%) con los genotipos reportados en las poblaciones de México, y un rango de heterocigosis observada de 0-1.0. Detectaron cinco genotipos multilocus pero el 95% de los individuos colectados pertenecían a sólo dos genotipos, un patrón de dominancia similar al encontrado en México. Por otro lado, en 12 individuos provenientes de Madagascar encuentran una mayor diversidad genética, de 3 a 13 alelos por locus, un total de 62 alelos y una heterocigosis observada de 0.4-1.0. Probablemente en Australia se introdujeron varios genotipos, ocurrió más de un evento de introducción, y/o hubo recombinación a través de reproducción sexual por entrecruza, procesos que no han ocurrido en las poblaciones mexicanas de acuerdo a los datos genéticos obtenidos en este trabajo.

Los eventos fundadores por los que pasan las especies introducidas reducen la diversidad genética; sin embargo, se ha sugerido que los cuellos de botella pueden llegar a tener un impacto positivo al purgar alelos deletéreos y preservar líneas altamente clonales (Roman y Darlin 2007). En este caso la purga de alelos no puede llevarse a cabo porque no hay recombinación, pero sí se trata de líneas clonales con altas sobrevivencias bajo distintos ambientes.

Se ha propuesto que las especies que se han convertido en invasoras no provienen de un muestreo aleatorio de toda la gama de diversidad posible, sino que en sus rangos nativos han evolucionado rasgos que las predisponen a ser transportadas por el ser humano y a sobrevivir a

los regímenes de selección a los que se enfrentan durante el transporte, introducción, establecimiento y propagación (Suarez y Tsutsui 2008). En las especies que han sido introducidas con fines ornamentales, como *K. delagoensis* y *K. daigremontiana*, es probable que los individuos más vigorosos sean inicialmente seleccionados por el hombre por su talla, características competitivas y/o reproductivas (Suarez y Tsutsui 2007). En el caso específico de *K. delagoensis* y *K. daigremontiana*, quizá se seleccionaron por su fácil propagación y alta sobrevivencia, además de que el híbrido parece tener una alta capacidad clonal.

Los resultados genéticos obtenidos se suman a los casos de invasiones biológicas en plantas con bajas o nulas diversidades genéticas, como *Pennisetum setaceum* en Estados Unidos (Poulin et al. 2005), *Altenanthera philoxeroides* y *Eichhornia crassipes* en China (Wang et al. 2005; Weiguo et al. 2006), *Fallopia japonica* en el Reino Unido (Hollingsworth y Bailey 200; Tabla 1), presumiblemente resultado a los cuellos de botella por los que pasan las poblaciones al ser introducidas. Contrario a lo anterior, en la revisión realizada por Bossdorf et al. (2005) encuentran que alrededor del 69% de las plantas invasoras tienen diversidades genéticas iguales o mayores a las poblaciones nativas, sin embargo, sólo el 30% de las especies que incluyen en la revisión presentan procesos de clonalidad o reproducción asexual común, lo que puede sesgar los resultados. Por su parte, Roman y Darlin (2007) detectan que el 37% de poblaciones de plantas acuáticas invasoras muestran una diversidad genética significativamente menor a sus poblaciones naturales. Lo anterior parece apoyar la hipótesis que relaciona positivamente el incremento en la cantidad de propágulos arribados (*propagule pressure*) y el éxito de invasión (Von Holle y Simberloff 2005; Wilson et al. 2009). Sin embargo, las poblaciones introducidas de *K. delagoensis*, *K. daigremontiana* y su híbrido son exitosas a pesar de que derivan de un único evento de introducción y su diversidad genética presenta una reducción importante.

Las poblaciones introducidas con baja variación genética disponen de mecanismos de propagación clonal o reproducción asexual que pueden mitigar los efectos genéticos negativos resultado de cuellos de botella, especialmente cuando los organismos muestran respuestas plásticas a las nuevas condiciones ambientales o poseen fenotipos con una amplia tolerancia ambiental (Sakai et al. 2001). A corto plazo, los beneficios ecológicos de la clonalidad pueden sobrepasar las consecuencias a largo plazo de tener bajos niveles de diversidad genética y la incapacidad de adaptarse a ambientes cambiantes o a patógenos (Queller 2000; Suarez y Tsutsui 2007).

El hecho de que los genotipos B, C y D de *K. delagoensis* encontrados en la población de Tula no presentan alelos únicos y sean subconjuntos de los alelos del genotipo A, sugiere que probablemente son resultado de un evento exitoso de reproducción sexual, y no son producto de nuevas introducciones o mutaciones somáticas. Para el caso de especies poliploides, no se ha desarrollado ningún software que permita detectar y cuantificar alelos nulos, que son el resultado de mutaciones en las regiones de los primers, por lo que no puede descartarse la presencia de éstos en el este trabajo.

La detección de un único genotipo del híbrido en todas las poblaciones muestra que ambas especies no están hibridizando en México, lo cual también es sugerido por el hecho de que no se encontraron poblaciones simpátricas de las dos especies y el híbrido. Estos resultados sugieren que la hibridación entre *K. delagoensis* y *K. daigremontiana* no ocurrió en México, sino que un genotipo probablemente altamente exitoso del híbrido Houghton fue introducido y se ha propagado clonalmente de forma independiente y extensa.

Kalanchoe delagoensis y *K. daigremontiana* son reportadas como especies autóгамas y que no requieren polinizadores específicos para la entrecruza (Eggli 2003). En Venezuela, donde *K. daigremontiana* es invasora, es capaz de producir más de 16,000 semillas por planta, y aunque la viabilidad de éstas no es alta (18%), forma un banco de semillas (Herrera y Nassar 2009). En el caso de las poblaciones estudiadas en México, se ha observado la producción de flores en ambas especies. Sin embargo, se desconocen los mecanismos o barreras que impiden una reproducción sexual exitosa dentro de las especies, así como la hibridación.

Las dos especies estudiadas y el híbrido Houghton se encuentran bajo condiciones muy similares de diversidad genética, aunque las poblaciones de *K. delagoensis* y del híbrido son más abundantes. Se ha propuesto que la poliploidía en las especies introducidas puede compensar la pérdida de diversidad genética (Lee 2002). Asimismo probablemente la poliploidía que presentan *K. delagoensis* y el híbrido les confiere ventajas en el proceso invasivo. Además, se ha relacionado a la hibridación con un incremento en la capacidad de competencia, talla y reproducción asexual y/o clonalidad (Ellstrand y Schierenbeck 2000; Otto y Whitton 2000; Soltis et al. 2010).

El presente trabajo muestra que, pese a las desventajas a las que enfrentan las poblaciones que han pasado por cuellos de botella, las poblaciones introducidas pueden ser exitosas y

convertirse en invasoras aún con una diversidad genética baja, por lo que no debe subestimarse el potencial de una especie para invadir aún si se introducen pocos individuos o si las poblaciones fundadoras presentan bajos niveles de diversidad genética. Así, en el desarrollo de estrategias para el combate y prevención de especies invasoras, se debe considerar que las poblaciones pueden ser capaces de expandirse únicamente por procesos clonales y/o de reproducción asexual, y el papel de la diversidad genética en el proceso de invasión es relativamente bajo.

Dentro de principales limitaciones de este estudio se encuentra que sólo se estima la variabilidad genética a partir de marcadoras neutrales, y sólo con base en ocho loci. Faltaría conocer lo que ocurre en loci sujetos a presiones de selección, además de si con una muestra significativamente mayor de loci microsatélites hubiera sido posible determinar con más certeza los niveles de variación y estructura genética y, particularmente, haber podido evaluar los cuellos de botella en estas poblaciones introducidas. Asimismo, hay que notar que la variación en marcadores no neutrales puede estar siendo subestimada (Roman y Darling 2007).

VIII. CONCLUSIONES

1. Las poblaciones presentes en México de las especies de invasoras *K. delagoensis*, *K. daigremontiana* y el híbrido resultante de estas dos (Houghton) presentan diversidad genética significativamente baja.
2. En las cuatro poblaciones estudiadas del híbrido Houghton únicamente se encontró un genotipo, al igual que en la única población de *K. daigremontiana*.
3. En el caso de la población de Tula de *K. delagoensis* se detectaron cuatro genotipos (A-D), siendo el más abundante el genotipo A, y el único presente en las otras poblaciones.
4. Los genotipos B, C y D de *K. delagoensis* no presentaron alelos nuevos y son subconjuntos del genotipo A, por lo que probablemente son resultado de reproducción sexual exitosa, sin embargo, este proceso parece no ser frecuente en las poblaciones, o es poco exitoso en el establecimiento.
5. Los resultados muestran un único genotipo en el híbrido Houghton y el hecho de que no se encontraron poblaciones simpátricas de *K. delagoensis*, *K. daigremontiana* y el híbrido, sugiere que no está ocurriendo hibridación en las poblaciones de México, sino que probablemente ocurrió un evento de introducción de un genotipo del híbrido, el cual parece ser altamente exitoso.
6. Los datos genéticos muestran que las poblaciones de estas plantas invasoras están establecidas y se han propagado fundamentalmente por procesos clonales. A largo plazo, la falta de diversidad genética limita el potencial evolutivo y adaptativo, pero a corto plazo, estas especies parecen tener una alta sobrevivencia y una alta capacidad para invadir, sin que ellos sea impedido por la baja o nula variabilidad genética observada.

IX. LITERATURA CITADA

- Abbot RJ y Lowe A (2004) Origins, establishment and evolution of new polyploid species: *Senecio cambrensis* and *S. eboracensis* in the British Isles. *Biological Journal of the Linnean Society*. 82: 467-474. *Plos One*. 7: 1-15.
- Aguirre Muñoz A, Mendoza Alfaro R et al. (2009) Especies exóticas invasoras: impactos sobre las poblaciones de flora y fauna, los procesos ecológicos y la economía. En: Dirzo R, González R y March JJ (comp.). *Capital natural de México*. Vol. II: *Estado de conservación y tendencias de cambio*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, pp. 277-318.
- Allendorf FW, Lundquist LL (2003) Introduction: Population biology, evolution, and control of invasive species. *Conservation Biology*. 17, 24–30.
- Amsellem L, Chevallier MH, Hossaert-McKey M (2001) Ploidy level of the invasive weed *Rubus alceifolius* (Rosaceae) in its native range and in areas of introduction. *Plant Systematics and Evolution*. 228: 171-179.
- Arrigo N y Barker MS (2012) Rarely successful polyploids and their legacy in plant genomes. *Current opinion in Plant Biology*. 15:140-146.
- Ayres DR, Smith DL, Zaremba K, Klohr S, Strong DR (2004) Spread of exotic cordgrasses and hybrids (*Spartina* sp.) in the tidal marshes of San Francisco Bay, California, USA. *Biological Invasions*. 6: 221-231.
- Bansal P, Banga S, Banga SS (2012) Heterosis as investigated in terms of polyploidy and genetic diversity using designed *Brassica juncea* amphiploid and its progenitor diploid species.
- Beest M, Le Roux JJ, Richardson DM, Brysting AK, Suda J, Kubesová M, Pysek P (2012) The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. *Annals of Botany*. 109: 19-45.
- Blackburn TM, Pysek P, Bacher S, Carlton JT, Duncan RP, Jarosik V, Wilson JRU, Richardson DM (2011) A proposed unified framework for biological invasions. *Trends in Ecology and Evolution*. 26: 333-339.
- Blossey B, Nötzold R (1995) Evolution of increased competitive ability in invasive non-indigenous plants: a hypothesis. *Journal of Ecology*. 83:887–889.
- Boiteau P, Allorge-Boiteau L (1995) *Kalanchoe (Crassulaceae) de Madagascar Systematique, Ecophysiologie et Phytochimie*. Karthala. Francia.

- Bossdorf O, Auge H, Lafume L, Rogers WE, Siemann E, Prati D (2005) Phenotypic and genetic differentiation between native and introduced plant populations. *Oecologia* 144: 1–11
- Briand JF, Leboulanger C, Humbert JF (2004) *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) invasion at mid-latitudes: selection, wide physiological tolerance, or global warning?. *Journal of Phycology*. 40(2): 231-238.
- Comai L (2005) The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature*. 6: 836-846.
- Comité Asesor nacional sobre Especies Invasoras (2010) *Estrategia nacional sobre especies invasoras en México, prevención, control y erradicación*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México.
- Daehler CC (2003) Performance's comparison's of co-occurring native and alien invasive plants: implications for conservation and restoration. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 34: 183-211.
- De Bodt S, Maere S, Van de Peer Y (2005) Genome duplication and the origin of angiosperms. *Trends in Ecology and Evolution*. 20:591-597.
- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*. 12: 13-15.
- Egli U (2003) *Illustrated handbook of succulent plants: Crassulaceae*. Springer Verlag, Berlin.
- Ellstrand NC, Schierenbeck KA (2000) Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97: 7043-7050
- Ellstrand y Roose (1987) Patterns of genotypic diversity in clonal plant species. *American Journal of Botany* 74: 123-131
- Genton BJ, Shykoff A, Giraud T (2005) High genetic diversity in French invasive populations of common ragweed, *Ambrosia artemisiifolia*, as a result of multiple sources of introduction. *Molecular Ecology*. 14: 4275-4285.
- González Martínez AI, Barrios Caballero Y, Born-Schmidt G, Koleff Osorio P (2014) El sistema de información sobre especies invasoras, en R. Mendoza y P. Koleff (coords.), *Especies acuáticas invasoras en México*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México DF, pp 95-112
- Guerra-García A (2011) *Evaluación del éxito clonal en una especie invasora: Kalanchoe delagoensis*. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. 46p.

- Gutierrez-Ozuna, R, Eguiarte LE, Molina-Freaner F (2009) Genotypic diversity among pasture and roadside populations of the invasive buffelgrass (*Pennisetum ciliare*) in north-western Mexico. *Journal of Arid Environments*. 73: 26-32.
- Hannan-Jones MA, Lowe AJ, Graham GC, Playford JP, Zalucki MP (2005) Isolation and characterization of microsatellite loci from mother-of-millions, *Bryophyllum delagoense* (Crassulaceae), and its hybrid with *Bryophyllum daigremontianum*, Houghton's hybrid. *Molecular Ecology Notes*. 5: 770-773.
- Heger JL, Trepl L (2003) Predicting biological invasions. *Biological Invasions*. 5: 313-321.
- Herrera I y Nassar JM (2009) Reproductive and recruitment traits as indicators of the invasive potential of *Kalanchoe daigremontiana* (Crassulaceae) and *Stepelia gigantea* (Apocynaceae) in a Neotropical arid zone. *Journal of Arid Environments*. 73: 978-986.
- Hollingsworth ML y Bailey JP (2000) Evidence for massive clonal growth in the invasive weed *Fallopia japonica* (Japanese knotweed). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 133: 463-472
- Hollingsworth ML, y Bailey JP (2000) Evidence of massive clonal growth in the invasive weed *Fallopia japonica* (Japanese Knotweed). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 133: 463-472.
- Kollmann J y Banuelos MJ (2004) Latitudinal trend in growth and phenology of the invasive alien plant *Impatiens glandulifera* (Balsaminaceae). *Diversity and Distribution*. 10: 377-385.
- Lambertini C, Riis T, Olesen B, Clayton JS, Sorrell BK, Brix H (2010) Genetic diversity in three invasive clonal aquatic species in New Zealand. *BMC Genetics*. 11: 1-18.
- Langella, O (2002) Populations 1.2.30. Copyright (C) 1999, Olivier Langella, Centre national de la recherche scientifique UPR9034. Available at <http://bioinformatics.org/tryphon/populations/>
- Lee CE (2002) Evolutionary genetics of invasive species. *Trend in Ecology and Evolution*. 17(8): 386-391.
- Maron JL, Vila M, Bommarco R, Elmendorf S, Beardley P (2004). Rapid evolution of an invasive plant. *Ecological Monographs*. 74: 261-280.
- Meekins JF, Ballard HE, McCarthy BC (2001) Genetic variation and molecular biogeography of a North American invasive plant species (*Alliaria petiolata*, Brassicaceae). *International Journal of Plant Sciences*. 162: 161-169.
- Müller-Schärer H, Schaffner U, Steinger T (2004). Evolution in invasive plants: implications for biological control. *Trends in Ecology and Evolution*. 19: 417-422.

- Nei M y Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci* 76: 5269-5273
- Otto SP y Whitton J (2000) Polyploid incidence and evolution. *Annu Rev Genet.* 34: 401-437
- Pappert RA, Hamrick JL, Donovan LA (2000) Genetic variation in *Pueraria lobata* (Fabaceae), an introduced, clonal, invasive plant of the southeastern United States. *American Journal of Botany.* 87: 1240-1245.
- Poulin J, Weller SG, Sakai A (2005) Genetic diversity does not affect the invasiveness of fountain grass (*Pennisetum setaceum*) in Arizona. *Diversity and Distributions.* 11: 241-247.
- Prentis PJ, Wilson JRU, Dormontt EE, Richardson DM, Lowe AJ (2008) Adaptative evolution in invasive species. *Trends Plant Science.* 13: 288-294.
- Queller DC (2000) Pax Argentina. *Nature.* 405: 519-520.
- Richardson DM y Pysek P (2006) Plant invasions: merging the concepts of species invasiveness and community invisibility. *Progress in Physical Geography.* 30: 409-431.
- Richardson DM, Pysek P, Rejmanek M, Barbour MG, Panetta FD, West CJ (2000) Naturalization and invasion of alien plants: concepts and definitions. *Diversity and distributions.* 6: 93-107.
- Rieseberg LH, Raymond O, Rosenthal DM, Lai Z, Livingstone K, Nakazato T, Durphy JL, Schwarzbach AE, Donovan LA, Lexer C (2003) Major ecological transitions in wild sunflowers facilitated by hybridization. *Science* 301: 1211–1216.
- Roman J, Darling J (2007) Paradox lost: genetic diversity and the success of aquatic invasions. *Trends in Ecology and Evolution.* 22: 454-564.
- Sakai AK, Allendorf FW, Holt JS, Lodge DM, Molofsky J, With KA, Baughman S, Cabin RJ, Cohen JE, Ellstrand NC, McCauley DE, O'Neil P, Parker IM, Thompson JN, Weller SG (2001) The populations biology of invasive species. *Annu Rev Ecol Syst* 32: 305-332
- Sala OE (2000) Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science.* 287: 1770-1774.
- Schlötterer C (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma.* 109:365-371.
- Selkoe KA y Toonen RJ (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology letters.* 9:615-629.
- Soltis PS y Soltis DE (2000) The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. *Proc Natl Acad Sci* 97: 7051-7057

- Suarez AV, Tsutsui ND (2008) The evolutionary consequences of biological invasions. *Molecular ecology*. 17: 351-360.
- Von Holle B, Simberloff D (2005) Ecological resistance to biological invasion overwhelmed by propagule pressure. *Ecology*. 86: 3212-3218
- Wang B, Li W, Wang J (2005) Genetic diversity of *Alternanthera philoxeroides* in China. *Aquatic Botany*. 81: 277-283
- Weber E, Schmid B (1998) Latitudinal population differentiation in two species of *Solidago* (Asteraceae) introduced into Europe. *American Journal of Botany*. 85: 1110-1121.
- Weiguo L, Bingrui W, Jianbo W (2006) Lack of genetic variation of an invasive clonal plants *Eichornia crassipes* in China revealed by RAPD and ISSR markers. *Aquatic Botany*. 84: 176-180.
- Whitney KD, Randell RA, Rieseberg LH. (2006) Adaptive introgression of herbivore resistance traits in the weedy sunflower *Helianthus annuus*. *The American Naturalist* 167: 794–807
- Wilson JRU, Dormontt EE, Prentis PJ, Lowe AJ, Richardson DM (2009) Something in the way you move: dispersal pathways affect invasion success. *Trends in Ecology and Evolution*. 24: 136-144.

ANEXO A

MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE ADN PAARA DOS ESPECIES DE *Kalanchoe* Y SU HÍBRIDO (modificado de Doyle y Doyle, 1987)

Reactivos:

Tris Ultra puro

Solución stock: 1M Tris-HCl pH8

EDTA

Solución stock: 0.5M EDTA pH8

Cloruro de Sodio

Solución stock: 5M NaCl

CTAB

b-Mercaptoetanol

Cloroformo

Octanol

Isopropanol

Soluciones

Buffer CTAB 2X

Tris-HCl 100 mM pH 8, NaCl 1.4M, EDTA 20mM, CTAB 2% y b-Mercapto Etanol 0.3%.

(El b-Mercapto etanol se agrega justo antes de comenzar la extracción y sólo al volumen de buffer que va a emplearse).

Cloroformo:Octanol 24:1

70% Etanol

Antes de comenzar:

Preparar baño maría a 60°C y la centrífuga a 4°C.

El isopropanol y el etanol deben estar fríos (aproximadamente a 4°C)

Agregar el b-mercapto etanol al buffer.

Protocolo

1. Moler de 10 a 50mg de tejido en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo.
2. Agregar 1ml del buffer CTAB 2X y continuar moliendo. Se formará una mezcla densa de tejido y buffer.
3. Recuperar la mezcla en un microtubo de 1.5ml y centrifugar 10 minutos a 13,000 rpm.
4. Desechar el sobrenadante y resuspender en 600µl de buffer CTAB usando una espátula. No es recomendable usar vortex.
5. Incubar 10 minutos a baño maría a 60°C.
6. Agregar 600 µl de cloroformo-octanol 24:1 y agitar hasta homogeneizar.
7. Centrifugar 10 minutos a 13,000 rpm y transferir cuidadosamente el sobrenadante a un nuevo tubo usando una micropipeta de 200µl. De forma alternativa, se pueden repetir los pasos 6 y 7 si el sobrenadante tiene un color oscuro.
8. Para precipitar el ADN, se agregan 2/3 partes de isopropanol frío al volumen final de sobrenadante recuperado. Incubar a 4°C de 30 minutos a una noche.
9. Centrifugar 10 minutos a máxima velocidad y cuidadosamente tirar el sobrenadante.
10. Lavar el pelet con 500µl de etanol al 70% frío y centrifugar 2 minutos a máxima velocidad.

Repetir tirando cuidadosamente el sobrenadante. Dejar secar a temperatura ambiente y resuspender en 100µl a 200µl de dd H₂O

ANEXO B

Tabla B1. Secuencias de primers de los microsatélites utilizados para el análisis genético de *K. delagoensis*, *K. dagremontiana* y el híbrido de Houghton:

Microsatélite	Forward	Reverse
UQBdel104	AGAGAATGAAGAGGAAGAG	TGGTTATGGTAGTAGTTGC
UQBdel161	CTTATCAGTGTGGAGTCGT	CAGCAGTTTCAATAATCGGC
UQBdel175	TGAATGAAATTGATCTCTCTC	CTAGTCGTCACGATGGCA
UQBdel165	GCAGCCTTGATTTATTTCC	CTCGCAGTGATTAGATGG
UQBdel001	AACTTTGAGAAACAGAGGGC	ATTATAGCGGTAGGATCGGT
UQBhyb011	CACAAGTTTCCTGTAACCTC	GCCAGTCTGCTTATTCATCT
UQBdel107	AGAGAATGAAGAGGAAGAG	CAGCCTAAGCAACAGAAT
UQBdel144	ACCATACACATACTGACGC	GATGACAAACTAAGAGCAAG
UQBhyb024	CGCTTACGGTATCGTCTG	TATCCATCACCAATCAAACA

Tabla B2. Características de microsatélites y condiciones de amplificación empleadas en este estudio.

Grupo	Primer	Condiciones PCR			Tamaño reportado	Repetición	Colorante primer
		t° de alineación	Concentración de MgCl ₂	Concentración de dNTP's			
Multiplex A	UQBdel024	50°	2.5mM	0.2mM	93-111	(CCCT) ₄	6-FAM
	UQBdel107	50°	2.5mM	0.2mM	159-177	(GTTTCT) ₃	NED
	UQBdel144	50°	2.5mM	0.2mM	107-110	(CTT) ₄	HEX
Multiplex B	UQBdel001	50°	2.5mM	0.2mM	130	(GA) ₄₄	HEX
	UQBdel011	50°	2.5mM	0.2mM	97-101	(CCT) ₃	NED
	UQBdel165	50°	2.5mM	0.2mM	153-168	(TGG) ₈	6-FAM
	UQBdel175	50°	2.5mM	0.2mM	166-174	(CA) ₇ TA(CA) ₂ (CT) ₂ CA	NED
	UQBdel161	55°	2mM	0.2mM	120-160	(TC) ₂₀	6-FAM
	UQBdel104				178-212	(CT) ₂₆	NED