

Informe final* del Proyecto GN038
Ecología evolutiva de dos especies invasoras de humedales en la República Mexicana:
Arundo donax y Phragmites australis (Poaceae)

Responsable: Dr. Luis E. Eguiarte Fruns
Institución: Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Ecología
Dirección: Av. Universidad # 3000, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, D.F.
04510
Correo electrónico: fruns@servidor.unam.mx
Teléfono/Fax: Tel: 622 9006 Fax: 616 1976, 622 8995
Fecha de inicio: Julio 31, 2009
Fecha de término: Diciembre 15, 2011
Principales resultados: Informe final, hoja de cálculo
Forma de citar el informe final y otros resultados:** Eguiarte, L. E., R. Colin., E. Aguirre-Planter y M. Rosas. 2011. Ecología evolutiva de dos especies invasoras de humedales en la República Mexicana: *Arundo donax* y *Phragmites australis* (Poaceae). Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ecología. **Informe final SNIB-CONABIO, proyecto No. GN038.** México. D. F.
Forma de citar Hoja de cálculo Eguiarte, L. E., R. Colin., E. Aguirre-Planter y M. Rosas. 2011. Ecología evolutiva de dos especies invasoras de humedales en la República Mexicana: *Arundo donax* y *Phragmites australis* (Poaceae). Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ecología. **Hoja de cálculo SNIB-CONABIO, proyecto No. GN038.** México. D. F.

Resumen:

Arundo donax (carrizo gigante), es una especie originaria de Asia central e introducida a América (California) vía el Mediterráneo alrededor 1820, es una de las plantas invasoras de humedales más agresivas y difíciles de erradicar, representando una fuerte amenaza para los ecosistemas naturales. Phragmites australis se encuentra ampliamente distribuido en Europa, Asia, África, América y Australia. Los registros fósiles indican que esta especie ha estado presente desde hace 40,000 años en el Suroeste de los Estados Unidos, por lo que se considera nativa del continente. En este trabajo se pretende hacer un análisis genético y filogeográfico de las poblaciones de A. donax y P. australis en México. Resultados preliminares con ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) y microsatélites de cloroplasto evidencian una falta de diversidad genética en poblaciones analizadas de Arundo donax. Para Phragmites australis contamos con microsatélites nucleares que están dando buenos resultados en análisis preliminares de diversidad genética y contamos con dos regiones no codificantes de cloroplasto con las que estamos llevando a cabo la identificación de los linajes nativos e invasores para análisis filogeográficos.

-
- * El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en www.conabio.gob.mx
 - ** El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.

GN038: Ecología evolutiva de dos especies invasoras de humedales en la República Mexicana: *Arundo donax* y *Phragmites australis* (Poaceae).

INFORME FINAL.

Responsable:

Nombre: Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns.

Cargo: Investigador titular C de TC.

Teléfono 56-22-90-06

Correo-e: fruns@servidor.unam.mx

Dirección: Apartado postal 70-275, Ciudad Universitaria, UNAM, 04510, México. D.F. Circuito exterior s/n anexo al Jardín Botánico Exterior.

Familia: Poaceae.

Especies a estudiar: *Arundo donax* y *Phragmites australis*.

Colaboradores: Biól. Ricardo Colin Nuñez, Dra. Erika Aguirre Planter, P. de M.V.Z. Manuel Rosas Barrera

1.- Introducción

El carrizo gigante, *Arundo donax* y el carrizo común, *Phragmites australis*, son dos especies de gramíneas asociadas a humedales que pueden ser muy abundantes y llegar a ser dominantes en estos ecosistemas, siendo consideradas como invasoras importantes en todo el mundo.

El transporte e introducción exitosa de especies invasoras a nuevos lugares y hábitats es uno de los principales componentes del cambio global antropogénico y estas especies son consideradas como la segunda amenaza de pérdida mundial de diversidad biológica, después de la fragmentación del hábitat (Vitousek, 1992, 1994; Walker y Steffen, 1997; Sala et al., 2000; Sakai et al., 2001; Mooney y Cleland, 2001; Allendorf y Lundquist, 2003; Novak, 2007). Pero a pesar de que es claro que tienen efectos negativos, poco se sabe sobre los mecanismos evolutivos que permiten la expansión del rango geográfico y evolución de las especies invasoras (Sakai et al., 2001; Lavergne y Molofsky, 2007), por lo que es necesario realizar evaluaciones directas del potencial ecológico y evolutivo y de sus implicaciones para el éxito de cada una de las invasiones (Dlugosch y Parker, 2008).

Evolutivamente, las especies invasoras generalmente experimentan una fuerte reducción en la variación genética debido al efecto fundador y a los cuellos de botella que ocurren durante la colonización, ya que sólo unos cuantos individuos son los que realizan la invasión original. Sin embargo, se pueden presentar niveles altos de variación genética si la invasión se realizó por un elevado número de individuos fundadores o si estos fundadores vienen de diferentes áreas de origen. También la hibridación intra- o inter-específica puede generar nuevos genotipos dentro del área introducida. La invasión a nuevos ambientes muchas veces implica cambios en los regímenes de selección, causando evolución adaptativa (Bossdorf et al., 2005). El estudio de la variación genética también puede ayudar a predecir el potencial de las poblaciones de especies invasoras para adaptarse a prácticas de manejo, como pueden ser la evolución de la resistencia a herbicidas o a agentes de control biológico (Barrett, 1992; Van Driesche y Bellows, 1996; Roux y Wiczorek, 2009).

Recientemente, con las aproximaciones filogeográficas y el desarrollo de marcadores moleculares, se han identificado los orígenes geográficos y las vías de invasión al comparar genotipos (o haplotipos) introducidos y genotipos de poblaciones nativas e introducidas (Cristescu et al., 2001; Hänfling et al., 2002; Wares et al., 2005; Okada et al., 2009). La identificación de los orígenes, vías de dispersión y los vínculos entre los cuellos de botella, introducciones múltiples y el éxito de la invasión son importantes para entender como los procesos evolutivos pueden ser incorporados en las estrategias

de manejo para contener, controlar y prevenir invasiones (Okada et al., 2009; Dlugosch y Parker, 2008).

Arundo donax y *Phragmites australis* son especies comunes en México, sin embargo se sabe poco sobre su distribución fina y casi nada de su ecología en el país, además se carece de información sobre su diversidad genética, su filogeografía y del origen de sus poblaciones en México. El objetivo final de nuestro programa de investigación es entender si estas especies representan una amenaza real para la diversidad biológica en la República Mexicana.

1.1. *Phragmites australis*: Esta especie se distribuye actualmente en Europa, Asia, África, América y Australia. En Norte América los registros fósiles indican que ha estado presente en el suroeste de los Estados Unidos cuando menos desde hace 40,000 años (Hansen, 1978) y estudios paleoecológicos indican que ha estado presente a lo largo del Atlántico y costas del Pacífico por varios miles de años, por lo cual es considerada como nativa al continente (Niering et al., 1977; Goman y Wells, 2000; pero ver Holm et al., 1977 y Marks et al., 1993 para otras opiniones). Saltonstall (2002 y 2003) propone que la distribución y abundancia de ésta especie se ha incrementado drásticamente en los últimos 150 años, particularmente en la costa del Atlántico de los E.U.A., ya que los registros botánicos de alrededor de 1800 la describen como rara o no común (Torrey, 1843; Dame y Collins, 1888). Sin embargo, ya a principios de 1900 la especie fue considerada como más abundante (Graves et al., 1910; Stone, 1910) y en la actualidad ha sido reportada como invasora en diversas áreas naturales de los Estados Unidos (Saltonstall y Sweringen, 2006).

En un análisis genético utilizando ADN de cloroplasto (Saltonstall, 2002) encontró que las poblaciones nativas de *P. australis* están siendo desplazadas por linajes no-nativos provenientes de Europa o Asia y que algunos de los linajes nativos fueron extintos o restringidos a pequeñas regiones. Este rápido desplazamiento de los linajes nativos alteró la distribución y abundancia de esta especie en los Estados Unidos, sugiriendo que los linajes invasores son altamente competitivos y agresivos.

1. 2. *Arundo donax*: Esta planta también tiene actualmente una amplia distribución a nivel mundial, incluyendo al Sureste de Europa, Australia, Norte de África y al continente americano (Perdue, 1958; Zohary, 1962). Se considera que es originaria de Asia central (Polunin y Huxley, 1987) y que supuestamente fue introducida a América, en particular a California y a México, a partir de poblaciones previamente introducidas al Mediterráneo (Bell, 1997). En los E.U.A. se considera como una de las plantas invasoras de humedales más agresivas y difíciles de erradicar (Khudamrongsawat, et al., 2004), representando así una fuerte amenaza para sus ecosistemas naturales.

Al establecerse, *A. donax* interfiere con la regeneración de la vegetación riparia, ya que crece rápidamente en número y en altura, por lo que la vegetación nativa es desplazada por competencia por radiación solar, humedad y nutrientes, evitando la germinación y desarrollo de nuevas plantas. Así, *A. donax* degrada a las zonas riparias, transformando a los hábitats en áreas no adecuadas para las especies nativas (Oakins, 2001) y causa modificaciones sustanciales en las características físicas y químicas de un ecosistema, incluyendo el aceleramiento en el ciclo de incendios y daños por las inundaciones (Bell, 1997; Dudley, 2000). Una comunidad de *A. donax* forma a menudo paredes impenetrables de material vegetal, lo que evita el movimiento de especies de las biotas terrestre y anfibia, provocando la pérdida de diversidad en dichas áreas. También tiene un impacto al consumir mucha agua; estudios preliminares sugieren que puede utilizar veinte veces más agua que la vegetación ribereña nativa típica (Hendrickson y McGaugh, 2005). Las poblaciones monoespecíficas, como las que forma *A. donax*, son altamente susceptibles a enfermedades que alteraran la dinámica en el ciclo de nutrientes, contribuyendo a la inestabilidad del ecosistema (Polunin y Huxley, 1987; Tillman, 1996; Hooper y Vitousek, 1998; Mitchell et al., 2002).

Se han realizado análisis previos de la diversidad genética y de distribución de genotipos en *A. donax*. Por ejemplo, Khudamrongsawat, et al. (2004) analizaron poblaciones a lo largo del río Santa Ana cerca de Los Ángeles, en el suroeste de California. Utilizaron dos tipos de marcadores moleculares (isoenzimas y RAPDs), y encontraron niveles de variación genética moderados para ambos marcadores. Con isoenzimas encontraron sólo ocho genotipos, todos los sitios colectados tenían más de un genotipo, y el cociente de clonalidad C/N (genotipos/ individuos analizados) fue de $8/87 = 0.09$, que indica un alto nivel de clonalidad. Con RAPDs detectaron mayores niveles de variación: 41 genotipos en total, y un C/N total de 0.46. El número de genotipos podría deberse a que hubo varias introducciones de *A. donax* a California, combinadas con posterior dispersión vegetativa. En general, *A. donax* es similar a otras especies de reproducción asexual, pero el nivel de clonalidad usando RAPDs al ser comparado con otras especies clonales indica que esta especie no es tan clonal (Khudamrongsawat et al., 2004). Los niveles moderados de diversidad genética, así como el tipo de reproducción que presenta esta planta podrían aumentar el potencial para el uso de agentes biológicos para su control y erradicación (Khudamrongsawat et al., 2004).

Los análisis de genética de poblaciones y de la genealogía de genes nos permitirán contestar preguntas ecológicas y evolutivas particulares en estas dos especies de carrizos invasores en México como las siguientes: ¿Hay presencia de linajes invasores en las poblaciones de *P. australis*? ¿Hubo desplazamiento de linajes en *A. donax*? ¿Hay evidencias de cuellos de botella en las poblaciones de *A. donax* y *P. australis*? ¿Cual es el origen de estas especies? ¿Se han llevado a cabo eventos múltiples de

introducción de *A. donax* y *P. australis* en México? ¿Hay uno o más haplotipos predominantes? ¿Existe flujo génico a grandes distancias? Con estos datos podremos conocer la situación actual de *A. donax* y *P. australis* en nuestro país y nos permitirán un mejor entendimiento en la dinámica de las invasiones.

2.- Objetivos del proyecto

2.1. General

Reconstruir la historia evolutiva de *Arundo donax* y *Phragmites australis* en poblaciones representativas de los principales tipos de ambientes en la República Mexicana para evaluar si estas dos especies representan un riesgo de invasión.

2.2. Particulares

- 1.- Estimar la diversidad y estructura genética de las poblaciones.
- 2.- Conocer los niveles de clonalidad e identificar los patrones de distribución de los diferentes linajes.
- 3.- Estimar los niveles de flujo génico.
- 4.- Identificar las vías de introducción.
- 5.- Identificar los linajes invasores.
- 6.- Estimar los orígenes de las poblaciones introducidas.

3.- Indicadores de éxito.

Para este cuarto informe (final), el objetivo propuesto era tener extraído el 100% del ADN, el 100% del montaje de los marcadores moleculares y el 100% de los análisis genéticos, que implican las corridas para obtener los datos moleculares y la captura digital de los datos. Entre los marcadores moleculares, se indicaba que se iba a seleccionar de entre varias opciones, incluyendo: ISSR, o microsatélites nucleares o del cloroplasto (Provan et al., 2004) y/o regiones no-codificantes de cloroplasto.

Para este informe contamos con:

- a) El 100% del montaje de los marcadores moleculares.

- b) Tenemos el 100% de las extracciones de ADN para *Arundo donax* y *Phragmites australis*.
- c) En los análisis genéticos, corridas y captura de datos contamos con el 100% para *Arundo donax* y *Phragmites australis*, con lo que cumplimos en su **totalidad** con el objetivo.

4.- Resumen de resultados (más adelante se describen con detalle los Métodos y Resultados usados y obtenidos, respectivamente).

4. 1. *Arundo donax*:

Esta especie tiene muy bajos niveles de variación genética en general, y en particular en el cloroplasto no detectamos variación a nivel ADN, por lo que decidimos usar marcadores ISSR, que pueden detectar variación aún en casos donde esta es muy baja. Se analizaron entre 18 y 32 individuos por población, dando un total de 450 individuos analizados con los marcadores moleculares biparentales ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) en 20 poblaciones pertenecientes a los estados de Hidalgo, San Luis Potosí, Puebla, Michoacán, Coahuila, Jalisco, Veracruz y Nayarit (ver Tabla 1, Figura 1 en Apéndice 1 y hoja muestras analizadas *Arundo* en archivo anexo). Utilizando los primers 827, 841, 846 y 850 obtuvimos un total de 84 loci (bandas) amplificados (ver hoja matriz ISSR en archivo anexo), los cuales tienen pesos moleculares entre 220 y 1500 pares de bases (pb).

La población que presentó el valor más alto de variación genética fue la de La Escondida ($H_s = 0.1501$, $P = 38.09\%$) en el estado de Veracruz y la que presentó el valor más bajo fue la de La Montaña ($H_s = 0.0426$, $P = 9.52\%$) ubicada en el estado de Nayarit (ver Tabla 2 en Apéndice 1 y hoja variación genética ISSRs en archivo anexo).

El valor promedio de diferenciación genética, θ (equivalente a la F_{st}), para todos los loci es de 0.517, comparativamente muy alto. Según el análisis de AMOVA, el mayor porcentaje de la variación genética se encuentra dentro de las poblaciones con el 40.88% de la variación (ver Tabla 4 en Apéndice 1 y hoja Amova *Arundo* en archivo anexo), el resto se debe a diferencias entre poblaciones y grupos geográficos (ver adelante). El flujo génico entre poblaciones se calculó a partir del valor de θ y nos dio un estimado de $Nm = 0.233$, lo cual indica que el flujo génico es limitado y esto está asociado con la marcada estructura poblacional que presentan las poblaciones.

El análisis de aislamiento por distancia realizado mediante la prueba de Mantel dio valores de $r = 0.1637$ y $P = 0.0244$ (ver Figura 3 y hoja Mantel *Arundo* en archivo anexo), lo que indica que aparentemente hay una correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas.

Phragmites australis:

En esta especie decidimos seguir una estrategia diferente, ya que aquí si encontramos regiones del ADN de cloroplasto variable, lo que nos permite hacer un análisis fino de su estructura genética, nivel de clonalidad y filogeografía. Así, se amplificó y secuenció la región no-codificante del cloroplasto trnT (UGU) a - trnL (UAA) b (Taberlet et al., 1991; Saltonstall, 2002) en una muestra representativa de individuos (entre 6 y 27, en promedio 13.8) de veinte poblaciones localizadas en los estados de Coahuila, Michoacán, Guanajuato, Veracruz, Tabasco y Jalisco (ver Figura 4, Tabla 5 en Apéndice 1 y hoja muestras analizadas *Phragmites* en archivo anexo).

La diversidad nucleotídica (π) encontrada en las poblaciones de *P. australis* fue de $\pi = 0.00251$. La diversidad haplotípica (H_d) global estimada fue de 0.86727 (ver Tabla 6 en Apéndice 1 y hoja diversidad *Phragmites* en archivo anexo). Los análisis de diferenciación genética y flujo génico mostraron que las poblaciones se encuentran diferenciadas ($G_{st} = 0.32705$), lo cual sugiere un flujo génico limitado entre ellas ($Nm = 1.03$).

En total se detectaron 42 haplotipos en las 20 poblaciones analizadas. Los haplotipos 1, 3 y 19 son los que presentaron la distribución geográfica más amplia. El haplotipo 1 se encontró en 13 de las 20 poblaciones analizadas, los haplotipos 3 y 19 presentaron una distribución geográfica un poco más restringida, encontrándose en nueve y ocho poblaciones respectivamente (ver Tabla 7, Figura 6 en Apéndice 1 y hoja frecuencia haplotipos en archivo anexo).

El análisis molecular de la varianza, AMOVA (ver Tabla 8 en Apéndice 1 y hoja Amova *Phragmites* en archivo anexo) sugiere que el mayor porcentaje de la variación se encuentra entre las poblaciones dentro de los grupos (el equivalente a la F_{st}), con el 81.28 % de la variación y el menor porcentaje se encuentra entre los grupos, con 7.38% de la variación.

5.- Metodologías generales.

5.1 Muestras

Los registros de las localidades para las colectas de las dos especies se tomaron de material depositado en el Herbario Nacional (MEXU), así como de la base de datos de la Red Mexicana de Información Sobre Biodiversidad (REMIB). Se colectaron hojas jóvenes de cada tallo separadas al menos 10 m de distancia el uno del otro, para así minimizar la posibilidad de colectar individuos conectados (ramets).

Para los análisis de diversidad y estructura genética de las dos especies, utilizamos poblaciones representativas de los principales ambientes de la República Mexicana, así como localidades relevantes para reconstruir la historia de las invasiones para cada especie o que pudieran aportar información de relevancia para los análisis genéticos.

5.2 Extracción de ADN

A partir del material colectado, se obtuvo ADN para ambas especies siguiendo el protocolo miniprep de Doyle y Doyle (1987). Este método consiste de manera general en el rompimiento de las paredes celulares por medio de la pulverización con nitrógeno líquido en un mortero y la adición de buffer de extracción CTAB 2X que sirve como detergente para solubilizar la membrana y eliminar azúcares, también se añade la RNAsa y proteinasa K para digerir al ARN y a las proteínas. Con la adición de cloroformo-octanol se eliminan restos celulares, compuestos fenólicos y otras moléculas que permanezcan en solución; posteriormente el ADN es precipitado con la adición de isopropanol frío, seguido de una limpieza con etanol al 70% y finalmente es re-hidratado en agua ultra pura (para ver detalladamente el protocolo de extracción, consultar el Apéndice 2).

5.3 Amplificación de ISSRs y ADN de cloroplasto (cpADN)

Realizamos la amplificación de ISSRs en poblaciones de *A. donax* pertenecientes a los estados de Hidalgo, San Luis Potosí, Puebla, Michoacán, Coahuila, Jalisco, Veracruz y Nayarit (ver Tabla 1, Figura 1 en Apéndice 1 y hoja muestras analizadas *Arundo* en archivo anexo) utilizando los *primers* 827, 841, 846 y 850. Los productos que se obtuvieron del PCR con los diferentes *primers* fueron separados por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2%, utilizando TAE 1X como buffer de corrida. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio para poder ser visualizados en la lámpara de luz ultravioleta. En cada corrida de los geles se colocó además de los individuos un marcador de peso molecular (*ladder*) de 100 pares de bases marca Invitrogen de 250 mg (1.0 mg/ml).

Cada gel fue fotografiado con una cámara digital Kodak EDAS 240 y las imágenes fueron digitalizadas usando el programa Kodak ID versión 3.6. Después se procedió a realizar la lectura cuidadosa de los mismos de manera manual. De esta manera se identificaron los patrones de los diferentes loci amplificados y se ordenaron de acuerdo al tamaño en pares de bases. Así se armó una matriz de presencia (1) y ausencia (0) de bandas para cada individuo y para cada *primer* (ver hoja matriz ISSRs en archivo anexo). Posteriormente, se realizó una depuración de la matriz, eliminando a los individuos en donde no se obtuvo amplificación en uno o dos *primers*.

En *P. australis* utilizamos en los análisis muestras provenientes de los estados de Coahuila, Michoacán, Guanajuato, Veracruz, Tabasco y Jalisco (ver Tabla 5, Figura 4 en Apéndice 1 y hoja muestras analizadas en archivo anexo). Amplificamos la región del cloroplasto utilizando los pares de primers trnT (UGU) a + trnL (UAA) b (Taberlet et al., 1991; Saltonstal, 2002). Los productos de PCR amplificados se mandaron a secuenciar de manera comercial en la Universidad de Washington, EUA, en su *High-Throughput Genomics Unit*. La calidad de las secuencias obtenidas fue analizada con el programa Consed (Gordon et al., 1998) y se corroboró la presencia de sitios variables mediante la inspección manual de los cromatogramas correspondientes. Cada secuencia fue recortada en los extremos para evitar la presencia de sitios variables originados por artefactos en la secuenciación, los alineamientos se realizaron con el programa Clustal X (Thompson et al., 1997).

6.- Métodos de análisis de genética de poblaciones.

6.1 *Arundo donax*

Se utilizó la matriz depurada de presencias y ausencias para calcular los parámetros básicos de variación genética. Las frecuencias alélicas se obtuvieron en base a los alelos recesivos (q), esto es a partir de los individuos sin banda (debido a que los heterocigos no pueden ser distinguidos), calculando la raíz cuadrada de la frecuencia de las ausencias (x), es decir $q = x^{1/2}$ y la frecuencia del alelo dominante como $p = 1 - q$. Para calcular la heterocigosis esperada promedio en una población (H_s) se utilizó la fórmula $H_s = 1 - \sum p^2$, siendo p_i la frecuencia promedio del alelo p para todos los loci (Eguiarte, 1990; Nybom y Bartish, 2000), y toma valores que van de cero cuando no se registra variación en ninguno de los genes analizados, a uno cuando todos los loci son polimórficos. Para disminuir el sesgo se utilizó la corrección propuesta por Lynch y Milligan (1994) para marcadores dominantes, en la cual el algoritmo propone realizar el análisis utilizando sólo las bandas con frecuencias $< 1-(3/N)$ para evitar seleccionar loci con altas frecuencias de alelos nulos (Lynch y Milligan, 1994). El porcentaje de loci polimórficos se obtuvo utilizando el criterio del 95%, es decir que solo se considera un loci polimórfico si el alelo más común tiene una frecuencia alélica máxima del 95%.

En el caso de la estructuración genética, se calculó como análogo a la F_{ST} el coeficiente de coancestría (θ) y sus intervalos de confianza mediante bootstrap al que se le indicaron 5000 replicas con intervalos de confianza del 95%. La F_{ST} se obtiene a partir de H_T y H_S , donde H_S es la proporción de heterocigos esperados promedio a nivel de subpoblaciones y H_T es la proporción de heterocigos esperados a nivel global (Eguiarte, 1990; Nybom y Bartish, 2000), y se puede obtener a partir de la

siguiente formula: $F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$. Si es igual a cero nos indica que las poblaciones están bajo equilibrio

de Hardy-Weinberg y si es igual a uno todas las poblaciones serían diferentes entre si, es decir no comparten ningún alelo, lo cual se explicaría si en cada una de las poblaciones se hubiera fijado un alelo (Eguiarte, 1990).

Para estimar el flujo génico se utilizó un método indirecto, el cual utiliza observaciones de las frecuencias alélicas para deducir que cantidad de flujo génico ocurrió para producir los patrones espaciales observados. Wright (1951) introdujo un método basándose en su modelo de islas, definiendo F_{ST} como la cantidad de consanguinidad causada por las diferencias en las frecuencias génicas entre las poblaciones, calculando el flujo génico a partir del valor de F_{ST} .

Las distancias genéticas entre las poblaciones se estimaron mediante el algoritmo de Nei (1972) y se graficaron mediante el método de *Neighbor-Joining*. Con el fin de saber si ésta especie sigue un modelo de aislamiento por distancia se realizó la prueba de Mantel (1967), la cual permite evaluar la correlación que hay entre dos matrices, es decir, se puede establecer si existe una relación entre la distancia genética y la distancia geográfica, para lo cual fue necesario generar la matriz de distancias geográficas las cuales fueron calculadas a partir de las coordenadas geográficas mediante el programa ARCVIEW 3.2. Cuando la correlación es positiva y posee una $p < 0.05$ se considera que es estadísticamente significativa y que existe aislamiento por distancia entre las poblaciones.

El porcentaje de variación inter- e intrapoblacional se calculó mediante la prueba de análisis de varianza molecular (AMOVA; Excoffier, 1992), la cual calcula la distancia entre los diferentes haplotipos (en el caso de los ISSRs, un haplotipo consiste en el patrón de 1 y 0 que representa todas las bandas observadas y las ausencias de bandas para cada individuo) y produce estimados de los componentes de la varianza que son similares a los estadísticos F de Wright. Los llamados estadísticos Φ , reflejan la correlación de la diversidad haplotípica en diferentes niveles de subdivisión jerárquica, es decir los individuos que integran a las poblaciones, los grupos de poblaciones y el total de las poblaciones (Excoffier, 2001). Las poblaciones se organizaron en cinco grupos (Norte, constituido por las poblaciones localizadas en el estado de Coahuila; Oriente, contiene a las poblaciones de los estados de Hidalgo, San Luis Potosí y Puebla; Pacífico, que contiene a las poblaciones del estado de Jalisco y Nayarit; Centro, conformado por las poblaciones de Michoacán y en el grupo denominado Golfo se encuentran las poblaciones del estado de Veracruz).

La mayor parte de los análisis se realizó con el programa TFGA 1.3 (Miller, 1997), excepto el AMOVA, que se realizó con el programa ARLEQUIN 2.0 (Schneider et al., 2000) y el dendrograma de *Neighbor-Joining* que se elaboró con el programa MEGA5 (Tamura, et al, 2011).

6.2 *Phragmites australis*

Con los datos obtenidos de las secuencias de cpADN en muestras de 20 poblaciones localizadas en los estados de Coahuila, Michoacán, Guanajuato, Veracruz, Tabasco y Jalisco (ver Tabla 5, Figura 4 en Apéndice 1 y hoja muestras analizadas *Phragmites* en archivo anexo), se estimaron los índices de diversidad nucleotídica y haplotípica para cada población y para el total de las poblaciones analizadas con el programa DnaSP v. 4.50.3 (Rozas et al., 2008), que también fue usado para calcular la diferenciación genética (G_{st}) mediante el índice de Nei (1973) y el flujo génico.

Se elaboró una matriz de distancia entre poblaciones a partir del número de sitios nucleotídicos distintos entre secuencias. A partir de esa matriz se generó un dendrograma de distancia entre poblaciones con el algoritmo *Neighbor-Joining* en el programa MEGA5 (Tamura, et al, 2011).

El análisis molecular de la varianza AMOVA se llevó a cabo con el programa ARLEQUIN 2.0 (Schneider et al., 2000). Se definieron para el análisis cuatro grupos, denominados Norte, Centro, Oeste y Sur. El primero contiene a las poblaciones del estado de Coahuila, el segundo contiene las poblaciones de los estados de Michoacán, Guanajuato y Jalisco, el grupo Oeste incluye a las poblaciones localizadas en Jalisco y el grupo del Sur contiene a las poblaciones de Veracruz y Tabasco. La varianza fue particionada en tres componentes: 1) Entre grupos, 2) Entre poblaciones dentro de los grupos y 3) Dentro de las poblaciones.

La correlación entre distancias genéticas (diferencias nucleotídicas) y distancias geográficas entre poblaciones fue analizada mediante la prueba estadística de Mantel (1967) y se llevó a cabo con el programa TFPGA 1.3 (Miller, 1997).

7.- Resultados

7.1 *Arundo donax*

Se analizaron entre 18 y 32 individuos por población de 20 poblaciones, dando un total de 450 individuos (ver Tabla 1 en Apéndice 1 y hoja muestras analizadas *Arundo* en archivo anexo). Este es un número de individuos por población y de poblaciones adecuado para estudios de este tipo con estos marcadores, donde el promedio según Nybom (2004) de individuos es 16.8 y el promedio de poblaciones es 10.73. Las diferencias en el número de individuos analizados se deben a que en algunas de las muestras se obtuvo ADN de calidad pobre o moderada o que las amplificaciones por PCR en 1 ó 2 primers fueron muy débiles. Se amplificaron un total de 84 loci, un número alto de marcadores para estudios poblacionales (donde el promedio en estudios con ISSRs es de 54.9 loci, (Nybom, 2004)): 24

loci con el primer 827, 21 loci con el primer 841, 20 con el primer 846 y 19 con el primer 850 (ver hoja matriz de ISSRs en archivo anexo).

Para analizar la variación genética de los 84 loci amplificados por medio de los ISSRs, se utilizó fundamentalmente el programa TFGA (*Tools for Population Genetic Analyses*) versión 1.3 (Miller, 1997) con la corrección de Lynch y Milligan (1994) para marcadores dominantes.

La población que presentó los valores de variación genética más altos fue la población La Escondida, en el estado de Veracruz, con una $H_s = 0.15$ y una $P = 38.1\%$. La población que presentó los valores más bajos fue la población de La Montaña, localizada en el estado de Nayarit, con una $H_s = 0.04$ y $P = 9.5\%$ (ver Tabla 2 en Apéndice 1 y la hoja variación genética ISSRs en archivo anexo).

La estructura poblacional se obtuvo en base al coeficiente de coancestría (θ) propuesto por Cockerham (1969), el cual es equivalente a la F_{ST} usando un enfoque de análisis de varianza. Se obtuvo un valor promedio de θ para todos los loci de 0.517, con un intervalo de confianza al 95% de 0.434 a 0.593 (utilizando 5,000 replicas bootstrap). Este valor promedio de F_{ST} se puede considerar como muy alto. Por ejemplo, según Nybom (2004), el promedio de la F_{ST} de 146 estudios usando marcadores genéticos dominantes similares (RAPDS, ISSR y AFLPs) fue de 0.34. El flujo génico se calculó a partir del valor promedio de θ y nos dio un estimado de $Nm = 0.233$, lo cual indica que el flujo génico es limitado.

Las distancias genéticas de las poblaciones fueron calculadas con el programa TFGA versión 1.3 (Miller, 1997) en base a la distancia no-sesgada de Nei (1972). Se obtuvo una distancia mínima de $D = 0.0111$ y una máxima de $D = 0.1888$, siendo las poblaciones de San Juan y Venados las más parecidas genéticamente y las dos más diferentes fueron las poblaciones de San Lucas Pío y Montaña (ver Tabla 3 en Apéndice 1 y hoja distancias *Arundo* en archivo anexo).

Se construyó un dendrograma por medio del algoritmo de *Neighbor-Joining* (ver Figura 2 en Apéndice 1), en donde se pueden ver de manera gráfica las relaciones genéticas entre las poblaciones analizadas. Se observa que se forman dos grupos bien definidos, siendo las poblaciones de San Juan y Venados las localidades genéticamente más cercanas, sin embargo no se detecta una relación clara entre las poblaciones geográficamente más próximas. Por ejemplo, la población de Río, en el estado de Nayarit, resultó ser genéticamente más parecida a las poblaciones de Mancha y Escondida, ubicadas en el estado de Veracruz, que a la población Montaña localizada en el mismo estado de Nayarit; o la población de Cococingo, en el estado de Hidalgo, que resultó ser genéticamente más parecida a la población de Florida ubicada en el estado de Michoacán que a cualquiera de las poblaciones pertenecientes al estado de Hidalgo; mientras que la población de Cuatrociénegas se situó como la más

distante genéticamente a todas las demás (ver Figura 2 en Apéndice 1). Estos patrones complicados sugieren importantes eventos históricos en su evolución reciente en México, principalmente de efecto fundador y cuellos de botella.

En el análisis de aislamiento por distancia realizado mediante la prueba de Mantel con el programa TFPGA versión 1.3 (Miller, 1997) nos dio una $r = 0.1637$ y $P = 0.0244$, lo que sugiere que hay una correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas entre cada par de poblaciones que, aunque débil, indica que esta especie sigue en términos generales un modelo de aislamiento por distancia, pero con las claras excepciones que mencionamos en el párrafo anterior (ver Figura 3 en Apéndice 1 y hoja Mantel *Arundo* en archivo anexo).

Para analizar la distribución de la variación genética jerárquicamente de manera más fina, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) utilizando el programa Arlequin versión 2.0 (Schneider et al., 2000). Los resultados obtenidos nos indican que el menor porcentaje de la variación se encuentra repartida entre los cuatro grupos geográficos, con el 23.31% de la varianza genética entre las poblaciones dentro de los grupos, mientras que los cinco grupos geográficos representan el 35.81% de la variación y el mayor porcentaje de la variación se encuentra dentro de las poblaciones con el 40.88% (ver Tabla 4 en Apéndice 1 y hoja Amova *Arundo* en archivo anexo). El valor de estructuración total obtenido para esta comparación (y que es análogo a F_{ST}) es de $\Phi_{ST} = 0.59118$.

7.2 *Phragmites australis*

La secuencia de nucleótidos de ADN de cloroplasto (cpDNA) fue determinada para 276 muestras de 20 poblaciones pertenecientes a los estados de Coahuila, Guanajuato, Michoacán, Veracruz, Tabasco y Jalisco. La longitud total obtenida para la región de trnT (UGU) a – trnL (UAA) b fue de 800 pares de bases (pb).

La diversidad nucleotídica (π) encontrada en las poblaciones de *P. australis* fue de $\pi = 0.00251$. Entre las 20 poblaciones analizadas, la diversidad nucleotídica osciló de cero en las poblaciones El Mojarral, Minatitlán, Estación y Venta, localizadas en los estados de Coahuila, Veracruz y Tabasco (las dos últimas) respectivamente, a $\pi = 0.00249$ en la población Pedrito en el estado de Michoacán (ver Tabla 6 en Apéndice 1 y hoja diversidad *Phragmites* en archivo anexo).

La diversidad haplotípica (H_d) global estimada fue de 0.86727. Dentro de las poblaciones la diversidad haplotípica mínima fue de 0 en las poblaciones El Mojarral, Minatitlán, Estación y Venta, a una máxima en la población La Desviación en el estado de Coahuila con un valor de $H_d = 0.84848$ (ver Tabla 6 en Apéndice 1 y hoja diversidad *Phragmites* en archivo anexo).

Los análisis de diferenciación genética y flujo génico mostraron que las poblaciones son genéticamente diferentes, y que tienen limitado flujo génico entre ellas. El valor de estructuración genética G_{st} estimado fue de 0.32705 y el estimado de flujo génico (Nm) fue 1.03 (según el programa DNAsp).

A partir del cálculo de distancias genéticas (número de diferencias nucleotídicas) entre las secuencias de la región no-codificante de cloroplasto trnT (UGU) a – trnL (UAA) b, se elaboró un dendrograma de distancias entre las poblaciones analizadas. En este análisis de las 20 poblaciones de *P. australis* se ve que se asocian en la parte superior las poblaciones pertenecientes al estado de Tabasco, con excepción de la población de La Estación, que queda agrupada con las poblaciones de Minatitlán y Mojarral, que a su vez son las localidades genéticamente más cercanas. En la parte inferior del dendrograma quedaron agrupadas tres de las cinco poblaciones localizadas en el estado de Jalisco y la población de Cuitzeo del estado de Michoacán es genéticamente más parecida a este grupo de poblaciones que a la población de Pedrito. La población La Reja de Jalisco es genéticamente más cercana a la agrupación conformada por las poblaciones pertenecientes al estado de Tabasco, mientras que las dos poblaciones más distantes fueron La Desviación en el estado de Coahuila y la de Melaque, ubicada en el estado de Jalisco (ver Figura 5 en Apéndice 1). Este análisis indica resultados interesantes, ya que se observa que las poblaciones genéticamente más parecidas no son necesariamente aquellas que se encuentran geográficamente más cercanas, sugiriendo de nuevo una complicada historia evolutiva, puntuada por eventos de colonización a larga distancia, efectos de fundador y cuellos de botella en algunas poblaciones y extinciones locales.

En total en *P. australis* en México se detectaron 42 diferentes haplotipos de cloroplasto entre las 20 poblaciones analizadas (ver Tabla 7 en Apéndice 1 y hoja frecuencia haplotipos en archivo anexo). Los haplotipos 1, 3 y 19 son los que presentaron la distribución geográfica más amplia. El haplotipo 1 se encontró en 13 de las 20 poblaciones analizadas, los haplotipos 3 y 19 presentaron una distribución geográfica más restringida, encontrándose en 9 y 8 poblaciones respectivamente (ver Tabla 7, Figura 6 en Apéndice 1 y hoja frecuencia de haplotipos en archivo anexo). Los haplotipos 7 a 11 sólo se encontraron en la población de Mezquite, los haplotipos 12 a 16 se presentaron exclusivamente en la población de la Poza X. Los haplotipos 17 y 18 están presentes en la población de la Vereda y Melaque, los haplotipos 20 y 21 en la población Pedrito, los haplotipos 22, 23 y 26 se encontraron principalmente en el estado de Jalisco y en la población de Cuitzeo, así como los haplotipos 24 y 25 que están presentes de manera exclusiva en esta última población. El haplotipo 27 sólo se encontró en la población Yuriria, el haplotipo 28 se encontró en tres poblaciones del estado de Tabasco y el haplotipo 29 resultó ser exclusivo a la población de Grijalva. El haplotipo 30, solamente se detectó en

la población de Melaque, mientras que el haplotipo 31 quedó restringido a 3 poblaciones en el estado de Jalisco y los haplotipos 32 a 35 son únicos a las poblaciones de Melaque, Barra, Majahua y Reja respectivamente. Los haplotipos 36 a 42 sólo fueron detectados en la población el Ermitaño en el estado de Jalisco (ver Tabla 7, Figura 6 en Apéndice 1 y hoja frecuencia de haplotipos en archivo anexo). Esta abundancia de haplotipos únicos indica bajo flujo génico entre las poblaciones.

Para analizar la distribución de la variación genética jerárquicamente, se realizó el análisis de varianza molecular (AMOVA), donde las muestras fueron organizadas en cuatro grupos denominados Norte, Centro, Oeste y Sur. El análisis sugiere que el mayor porcentaje de la variación se encuentra entre las poblaciones dentro de los grupos con el 81.28 % de la variación y el menor porcentaje se encuentra entre los grupos, con 7.38% de la variación (estimado con el programa Arlequin) (ver Tabla 8 en Apéndice 1 y hoja Amova *Phragmites* en archivo anexo).

En el análisis de aislamiento por distancia realizado mediante la prueba de Mantel con el programa TFGA versión 1.3 (Miller, 1997) entre las distancias geográficas y el número promedio de diferencias nucleotídicas entre secuencias (ver Tabla 9 en Apéndice 1 y hoja distancias *Phragmites* en archivo anexo) nos dio valores de $r = 0.1455$ y $P = 0.0420$, lo que indica que en esta especie también hay una correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas presentes entre cada par de poblaciones. Es decir, que esta especie sigue en términos generales un modelo de aislamiento por distancia (ver figura 7 en Apéndice 1 y hoja Mantel *Phragmites* en archivo anexo).

8.- Discusión

H.G. Baker, en dos artículos clásicos en la ecología (1965, 1974) describió las características que podrían definir el síndrome de la planta invasora: habilidad para reproducirse tanto de manera sexual como asexualmente, un rápido crecimiento de plántula a adulto reproductivo, adaptación al estrés ambiental y alta tolerancia a la heterogeneidad ambiental. Más recientemente, Newsome y Noble (1986) proponen que las especies invasoras exitosas germinan temprano y en masa, crecen rápido, son competidoras agresivas y capturan eficientemente los recursos limitantes y como adultas sobreviven bien durante mucho tiempo. Diferentes plantas invasoras tienen diversas características y no todas comparten la lista de Baker, pero se ha demostrado que se puede predecir con bastante éxito a las posibles plantas invasoras analizando sus formas de crecimiento y las características del ambiente (Sakai et al., 2001).

Por otra parte, en una excelente revisión sobre la genética de los organismos invasores, Dlugosch y Parker (2008) describen que los cuellos de botella y efectos de fundador son importantes fuentes de reducción en la variación genética en la mayoría, pero no en todos los organismos invasores.

Las especies invasoras que tienen altos niveles de variación genética usualmente son el resultado de varios eventos de introducción. En 69 estudios de genética de poblaciones de organismos invasores, tanto plantas como animales, se encontró que en promedio la variación genética, medida como la heterocigosis esperada por población, H_s se reduce en un 15% en las poblaciones invasoras con respecto a las originales (Dlugosch y Parker, 2008).

Por otro lado se ha descrito que a corto plazo un mejor indicador de la variación genética puede ser el número de alelos, tanto para la genética de la conservación como para el estudio de las plantas invasoras. En 59 estudios con estimaciones tanto de H_s como de riqueza alélica, la pérdida de alelos en las poblaciones invasoras con respecto a las originales fue 5.1% veces más intensa que la pérdida de heterocigosis (Dlugosch y Parker, 2008).

Dentro de las plantas invasoras más importantes de los Estados Unidos se menciona a *Phragmites australis* y *Arundo donax*, mismas que presentan muchas de las características de las plantas invasoras descritas en el primer párrafo (Saltonstall et al., 2010). *P. australis* se ha sugerido que es una de las angiospermas de mayor distribución mundial (Ridley, 1930). En Estados Unidos *P. australis* es una especie nativa y dominante de los humedales, pero se ha propuesto que su abundancia es una señal de perturbación del humedal (Saltonstall et al., 2010). Crece en muchos tipos de hábitats, incluyendo humedales salobres y de agua fresca, corredores riparios y a la orilla de caminos. Una vez establecida, es resistente a las inundaciones, soportando un amplio rango de salinidad. Re-emerge fácilmente después de que se remueve su biomasa aérea, por lo que su control puede ser difícil. Su éxito posiblemente se deba en parte a su hábito de crecimiento perenne y rizomatoso y a que se puede reproducir tanto por semillas como clonalmente, además de que tiene altos niveles de plasticidad fenotípica (Saltonstall et al., 2010).

Saltonstall (2002; Saltonstall y Hauber, 2007; Saltonstall et al., 2004) proponen tres linajes en Norte América, que han descrito como las subespecies que discutimos a continuación. *Phragmites australis* ssp. *americanus*, designado como el linaje “Nativo de Norte América” y se encuentra en todo Estados Unidos; el linaje “Costa del Golfo”, que es la subespecie *Phragmites australis* ssp. *berlandieri*, y se encuentra en el sur de Estados Unidos, de Florida a California; y el linaje “Introducido de Europa”, *P. australis*, que se reconoce con el haplotipo de cloroplasto “M” (Saltonstall et al. 2010). Los niveles de clonalidad, usando microsatélites e isoenzimas difieren entre cada uno de estos linajes, siendo la mayor clonalidad la registrada en el linaje de la “Costa del Golfo”, Genotipos/ Muestra total (C/N) en isoenzimas = 0.26, microsatélites = 0.63. Para los “Nativos de Norte América, Introducidos y Europeos” C/N es cercano a 1, tanto en isoenzimas como en microsatélites (Tabla 2, Saltonstall et al. 2010). Saltonstall et al. (2010) consideran que la alta diversidad del linaje “Introducido” en Norte

América se debe a que han ocurrido varias introducciones diferentes. Sin embargo, los análisis de genética de poblaciones para la especie con marcadores nucleares son complicados, debido a la poliploidía de la especie, que varía entre poblaciones y subespecies y va de 2x hasta 22x (Saltonstall et al. 2010). Por esa razón, no se pueden dar índices sencillos de la reducción de la variación genética en términos de H_s o de la proporción de loci polimórficos ($P \%$). En parte por este problema, y para obtener mayor resolución, decidimos llevar a cabo el presente estudio utilizando un análisis formal de genética de poblaciones y filogeográficos con el ADN de cloroplasto, que al ser heredado solo por vía materna simplifica los análisis y permite comparar diferentes poblaciones y ploidias.

En ocho poblaciones Mexicanas de *Phragmites australis* encontramos que la mayor parte de los haplotipos de cloroplasto se relacionan con los que Saltonstall ha llamado el linaje de la “Costa del Golfo”, pero la mayoría son nuevos haplotipos. También tenemos un grupo de haplotipos relacionados con el linaje que ella llama “Nativos de Norte América”, representando nuevos y pocos haplotipos en un sitio en Cuatro Ciénegas. Pero el resultado más importante es que no se encontró a ningún individuo de los analizados para México con el genotipo invasor, M.

En la Tabla 10 (ver Apéndice 1 y hoja comparación cloroplasto en archivo anexo) comparamos nuestros resultados con otros estudios similares usando secuencias de cloroplasto en plantas mexicanas. Encontramos un total de 42 diferentes haplotipos, que es un número alto considerando que Saltonstall (2002) encontró 27 haplotipos para todo el mundo y sólo 11 nativos para Norte América. Los niveles de variación genética por población (estimados como la diversidad nucleotídica (π)) parecen altos, claramente superiores a los reportados en *Oxalis alpina*, las dos especies de *Callitropsis* o en *Pseudotsuga menziesii* (Tabla 10).

La alta diversidad haplotípica en *Phragmites australis* en México, junto con el hecho que encontramos gran cantidad de haplotipos únicos para el país y la estimación de variación genética a nivel nucleótido, π y la diversidad H_d , indican que es una especie nativa de México, y que el país no ha sido invadido por el genotipo invasor Europeo M.

La diferenciación genética usando las secuencias de cloroplasto en *Phragmites australis*, $G_{st}=0.327$ es relativamente baja para secuencias de cloroplasto, similar a la del conjunto de especies del género *Abies* del sur de México (Jaramillo-Correa et al., 2008) (ver Tabla 10 en Apéndice 1 y hoja comparación cloroplasto en archivo anexo). De cualquier forma, el análisis de aislamiento por distancia fue significativo, lo que indica que aunque la diferenciación no es tan extrema como en otras plantas Mexicanas, esta si existe, y es mayor entre más lejanas estén las poblaciones.

Por otra parte, *Arundo donax* fue estudiado con RAPDs en Europa por Lewandowski et al. (2003) y encontraron variación y diferenciación geográfica. A lo largo de los ca. de 160 km del río

Santa Ana en los alrededores de Los Angeles en California, Khudamrongsawat et al. (2004) estudiaron a *A. donax* con isoenzimas. Analizaron sólo dos isoenzimas polimórficas, la ME (enzima málica) y PGI (fosfogluco-isomerasa), y pudieron distinguir ocho diferentes genotipos. Analizaron ocho poblaciones, usando entre 8 y 19 plantas por población. Usando el índice C/N (genotipos/ total de plantas) encontraron índices entre 0.20 a 0.63 por población. Ninguna población es puramente clonal, aunque en todas hay algún genotipo dominante. De hecho, dos genotipos representaron el 56% de todas las plantas. Khudamrongsawat et al. (2004) también utilizaron RAPDs en sus análisis de los mismos individuos y poblaciones. Usaron tres primers, que les dieron 9 loci polimórficos, con los que pudieron distinguir 41 genotipos. Un genotipo fue el más abundante, y representó el 26% de la colección. Los cocientes C/N variaron entre 0.30 y 0.85; como se podría esperar, los RAPDs detectaron mayor variación genética, pero en las conclusiones son las mismas que para las isoenzimas: las poblaciones no son completamente clonales, y todas presentan varios fenotipos, de 4 a 11, pero el tamaño de muestra por población (y el número de poblaciones y el ámbito geográfico total) son muy pequeños.

Recientemente, en un estudio en todo Estados Unidos con 10 loci de microsatélites, J. Manhart (en Saltonsall et al., 2010) encontró muchos genotipos y señales de múltiples introducciones. En contraste, Ahmad et al. (2008) analizaron 185 plantas de los Estados Unidos, 20 de Francia y 10 cultivares y considerando todas las muestras analizadas con el método de marcadores SRAP (Sequence Related Amplification Polymorphism) obtuvieron 185 bandas repetibles y con los marcadores relacionados con los elementos móviles (TEs) detectaron 164 bandas repetibles. Ahmad et al. (2008), encontraron que todas las muestras analizadas de *A. donax*, incluyendo los de Estados Unidos, los de Francia y los cultivares son idénticos, con la excepción de cuatro individuos, tres de ellos de California, que diferían en una sola banda. Saltonstall et al. (2010) concluyen que éste artículo es erróneo, y que sus resultados se deben a un artefacto de las técnicas empleadas, que detectan diferencias entre especies, pero no tienen el poder de distinguir variación genética dentro de una especie.

Nuestros resultados apoyan a los estudios de Lewandowski et al. (2003), Khudamrongsawat et al. (2004) y los resultados preliminares de J. Manhart. En México, *Arundo donax* tiene niveles similares a lo que se puede esperar en una especie herbácea e invasora. Por ejemplo, la H_s en RAPDs para plantas anuales es de 0.13 (Nybom, 2004), que a su vez es el grupo de plantas con menores niveles de variación. En nuestro estudio con *A. donax*, la población con el valor más alto fue de $H_s = 0.15$, pero la más baja fue de $H_s = 0.04$. También los valores de C/N concuerdan en lo general con los reportados por Khudamrongsawat et al. (2004) para RAPDs.

Dado que la variación genética es baja en *A. donax*, no se pudieron detectar marcadores polimórficos con el cloroplasto, pero los niveles de variación genética con los ISSRs permiten detectar

diferenciación genética elevada ($F_{ST} = 0.517$), ya que por ejemplo, como mencionamos arriba, el promedio de F_{ST} de 146 estudios usando marcadores genéticos dominantes similares (RAPDS, ISSR y AFLPs) fue de apenas 0.34 (Nybom, 2004). Los niveles de variación genética también permiten detectar aislamiento genético significativo con una prueba de Mantel: las poblaciones más cercanas geográficamente se parecen más genéticamente, pero esta relación dista de ser perfecta y hay mucha dispersión en los puntos.

La heterogeneidad espacial en los niveles de variación genética y el pobre ajuste (aunque significativo) en el análisis de aislamiento por distancia, sugieren que las poblaciones no han llegado al equilibrio. Sin embargo, los 2 ó 3 grandes clados que detecta el UPGMA sugieren varias introducciones, y tal vez varios grupos genéticos que pueden estar adaptados a diferentes condiciones, y que representan introducciones independientes. Así, para *A. donax* posiblemente tengamos un clado norteño (Cuatro Ciénegas), uno del Altiplano y otro de las Costas de México. Sin embargo se necesitan experimentos de trasplantes recíprocos para conocer su vigor y adaptación local, junto con análisis de un mayor número de poblaciones adaptadas a condiciones ambientales contrastantes y estudios genómicos (cantidad de ADN por núcleo, diferencias en alelos en plantas de condiciones contrastantes, etc., ver Turner et al. 2010).

En conclusión, podemos señalar que ambos estudios representan uno de los trabajos de genética de poblaciones más completos que se han realizado en México, tanto por el número de poblaciones como por el tamaño poblacional y el número de marcadores. Ambos estudios son únicos para México en el sentido que, hasta donde sabemos, son los más detallados en especies consideradas como invasoras. El estudio *A. donax* es el más detallado que se ha publicado para la especie, ya que los otros o son aparentemente erróneos, o muy generales, o sólo cubren un área muy pequeña (de California). El trabajo con *P. australis* es el análisis más detallado de su genética de poblaciones usando cloroplasto, ya que las descripciones de Saltonstall son muy generales y cualitativas.

Nuestros análisis sugieren que las dos especies parecen estar fuera del equilibrio flujo génico/ deriva génica, que indican dinámicas poblacionales activas y recientes y en particular cuellos de botella. Los datos sugieren que *P. australis* es una especie nativa, con muchos años en México, lo que se refleja en su alta variación si se compara con EUA y no se detectó el linaje invasor. Por otra parte, parece ser que *A. donax* sufrió varias introducciones al país, lo que en parte ha limitado el que se reduzca mucho su variación genética, además de obtenerse en en los análisis dos o tres clados. Estos datos deben ser primordiales al considerar su manejo y es importante recalcar que aunque hay *A. donax* en muchos sitios de la República, sólo parece ser muy abundante en sistemas altamente

perturbados, donde existe claramente un exceso de nutrientes que han sido generados por deficientes manejos agrícolas.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a la Sra. Silvia Barrientos, Jonás Aguirre, Natalia Martínez, Oswaldo González y Manuel Rosas por su invaluable ayuda en las extracciones de ADN de las poblaciones de las especies analizadas en este proyecto. A la CONABIO por los recursos financieros.

Apéndice 1: Lista de tablas y figuras.

Tabla 1. Muestras analizadas con ISSR's en *Arundo donax*

Población	Estado	Individuos	COORDENADAS:						FUENTE (GPS)	PRECISION
			N	MIN	SEG	W	MIN	SEG		
1 Huayateno	Hidalgo	20	20 ^o	40	57.36	98 ^o	48	55.02	Garmin etrex	5
2 Venados	Hidalgo	19	20 ^o	28	18.3	98 ^o	40	45	Garmin etrex	5
3 San Juan	Hidalgo	18	20 ^o	34	50.52	98 ^o	45	46.08	Garmin etrex	5
4 Coccingo	Hidalgo	24	20 ^o	36	14.64	98 ^o	49	29.7	Garmin etrex	5
5 Tres Cruces	Hidalgo	22	20 ^o	30	58.44	98 ^o	42	46.38	Garmin etrex	5
6 Xilotla	Hidalgo	22	20	33	4.14	98 ^o	44	16.38	Garmin etrex	5
7 Santa Ma. Del Rio	San Luis Potosi	20	21 ^o	47	58.42	100 ^o	43	42.24	Garmin etrex	5
8 Atempán	Puebla	18	19 ^o	50	10.9	97 ^o	27	24.38	Garmin etrex	5
9 Tiripetío	Michoacán	19	19 ^o	33	17.02	101 ^o	20	22.32	Garmin etrex	5
10 Charo	Michoacán	19	19 ^o	46	24.19	101 ^o	2	35.51	Garmin etrex	5
11 San Lucas Pio	Michoacán	20	19 ^o	47	40.86	100 ^o	55	22.49	Garmin etrex	5
12 Florida	Michoacán	24	19 ^o	35	14.45	101 ^o	18	5.89	Garmin etrex	5
13 Puente	Jalisco	30	20 ^o	22	18.7	103 ^o	50	6.7	Garmin etrex	5
14 Cocula	Jalisco	23	19 ^o	47	28.5	104 ^o	13	46	Garmin etrex	5
15 Valle Cruya	Coahuila	28	27 ^o	47	40.08	100 ^o	42	41.04	Garmin etrex	5
16 Cuatrociénegas	Coahuila	32	26 ^o	57	10.02	102 ^o	6	17.76	Garmin etrex	5
17 Escondida	Veracruz	23	18	35	39.2	95	3	4.6	Garmin etrex	5
18 La Mancha	Veracruz	23	19	35	0.772	96	22	0.637	Garmin etrex	5
19 Rio	Nayarit	25	20	46	5.4	105	27	50.5	Garmin etrex	5
20 Montaña	Nayarit	21	20	53	39.1	105	24	36.2	Garmin etrex	5

Tabla 2. Heterocigosis esperada (He) y porcentaje de loci polimorficos (P) con el criterio del 95% en *Arundo donax*

ESTADO	POBLACION	INDIVIDUOS ANALIZADOS (N)	HETEROCIGOSIS (He)	LOCI POLIMORFICOS (95%)
1 HIDALGO	HUAYATENO	20	0.0842	21.4286
2 HIDALGO	VENADOS	19	0.0809	21.4286
3 HIDALGO	SAN JUAN	18	0.0695	19.0476
4 HIDALGO	COCCINGO	24	0.0471	13.0952
5 HIDALGO	TRES CRUCES	22	0.0529	14.2857
6 HIDALGO	XILOTLA	22	0.056	16.6667
7 SAN LUIS POTOSI	SANTA MARIA DEL RIO	20	0.0609	15.4762
8 PUEBLA	ATEMPAN	18	0.0998	28.5714
9 MICHOACÁN	TIRIPETIO	19	0.1153	32.1429
10 MICHOACÁN	CHARO	19	0.1331	33.3333
11 MICHOACÁN	SAN LUCAS PÍO	20	0.097	25
12 MICHOACÁN	FLORIDA	24	0.0507	14.2857
13 JALISCO	PUENTE	30	0.0782	19.0476
14 JALISCO	COCULA	23	0.0695	17.8571
15 COAHUILA	VALLE CRUYA	28	0.0876	22.619
16 COAHUILA	CUATROCIENEGAS	32	0.0544	16.6667
17 VERACRUZ	ESCONDIDA	23	0.1501	38.0952
18 VERACRUZ	MANCHA	23	0.0431	10.7143
19 NAYARIT	RIO	25	0.0739	19.0476
20 NAYARIT	MONTAÑA	21	0.0426	9.5238

Tabla 3. Distancias genéticas (Nei, 1972) y geográficas en Km en A. donax. En la diagonal superior en cursivas se muestran las distancias geográficas lineales en kilómetros, en la diagonal inferior se muestran las distancias no segadas de Nei (1972).

POBLACION	HUAYATENO	VENADOS	SAN JUAN	COCCINGO	TRES CRUCES	XILOTLA	SANTA MARIA DEL RIO	ATEMPAN	TIRIPETIO	CHARO	SAN LUCAS PÍO	FLORIDA	PUENTE	COCULA	VALLE CRUYA	CUATROCIENEGAS	Escondida	Mancha	Rio	Montaña
HUAYATENO	0.0000	26.1064	11.9199	8.2275	20.3199	15.8652	229.4423	166.8472	288.4749	250.8965	238.4444	283.4507	323.3945	572.0024	745.7792	719.8039	450.4976	280.0009	691.0554	685.4559
VENADOS	0.0157	0.0000	14.2302	20.4839	8.8099	10.2777	253.0812	143.7129	293.8072	257.1937	244.5158	288.9330	537.0290	583.4030	770.6477	745.8206	427.7945	258.6040	706.3075	701.1079
SAN JUAN	0.0202	0.0111	0.0000	8.9434	6.4935	4.0214	239.6253	156.7300	288.4779	252.3122	239.7372	284.5191	526.4791	576.0507	757.4285	731.7424	440.7107	270.9427	696.9994	691.5562
COCCINGO	0.0629	0.0741	0.0813	0.0000	14.8114	10.5963	232.8654	163.5835	284.3737	247.0399	234.5084	279.3892	325.0556	569.9601	753.4507	726.6524	447.5669	277.7442	690.3866	684.9442
TRES CRUCES	0.0988	0.1179	0.1132	0.0631	0.0000	4.4687	247.6120	148.9734	292.0038	255.1566	242.5158	287.0941	533.5518	580.4154	765.2563	740.0908	433.0192	283.5359	702.5139	697.2316
XILOTLA	0.0932	0.1097	0.1174	0.059	0.0318	0.0000	243.8602	152.3956	290.8057	253.7855	241.1780	285.8695	531.0048	578.2531	761.6897	725.6646	438.9937	287.2886	699.7082	694.3614
SANTA MARIA DEL RIO	0.0394	0.0262	0.0259	0.0749	0.1143	0.0952	0.0000	396.2940	241.8716	213.0189	209.2442	237.5569	354.4954	419.2808	694.7365	539.8672	679.9021	508.5554	501.8257	493.5120
ATEMPAN	0.0372	0.0237	0.0232	0.0812	0.1284	0.1149	0.0257	0.0000	407.2782	375.0095	382.3783	403.0479	667.9262	708.0417	874.0484	866.8663	294.0721	117.0441	840.1210	835.8236
TIRIPETIO	0.0395	0.0239	0.0413	0.0777	0.1179	0.0911	0.0331	0.0302	0.0000	38.5362	50.3544	52.2553	274.2703	333.3938	640.9765	759.3277	689.0462	620.6588	448.4638	448.8160
CHARO	0.0442	0.0263	0.0362	0.1034	0.143	0.121	0.0423	0.022	0.0204	0.0000	12.7276	33.3176	298.0212	333.1665	816.3042	740.3306	640.9096	489.6912	472.3405	469.7547
SAN LUCAS PÍO	0.0576	0.039	0.0626	0.114	0.1602	0.1343	0.072	0.0501	0.0237	0.0234	0.0000	46.1719	309.8467	345.7155	813.6587	740.0219	628.9315	477.1828	484.0772	481.3282
FLORIDA	0.0946	0.0971	0.1039	0.0764	0.0597	0.0599	0.0962	0.1132	0.0896	0.1191	0.1253	0.0000	278.9792	307.0586	837.2766	785.3274	654.5746	516.6280	451.2899	449.8334
PUENTE	0.0871	0.1039	0.1138	0.0949	0.0827	0.0606	0.1114	0.1036	0.1033	0.1138	0.1205	0.0812	0.0000	73.2444	816.9713	692.5553	938.8334	784.2784	174.3999	172.5465
COCULA	0.1245	0.138	0.1485	0.1179	0.0803	0.0878	0.1614	0.1604	0.1569	0.1669	0.176	0.1044	0.0402	0.0000	888.8831	781.8596	971.3483	822.9072	164.0969	168.3338
VALLE CRUYA	0.0778	0.0884	0.0938	0.081	0.0696	0.0791	0.1025	0.101	0.1042	0.1056	0.1165	0.0714	0.0288	0.0339	0.0000	160.6465	1103.2534	945.2691	859.2140	845.1614
CUATROCIENEGAS	0.0856	0.098	0.109	0.0564	0.0963	0.062	0.0788	0.099	0.074	0.0996	0.1148	0.0696	0.0904	0.1505	0.1071	0.0000	1120.5835	953.4240	715.2190	701.0663
Escondida	0.1451	0.1503	0.1601	0.1185	0.0809	0.0764	0.1603	0.1627	0.145	0.1486	0.1713	0.1023	0.0699	0.0458	0.0512	0.1464	0.0000	172.8513	1112.9610	1109.7796
Mancha	0.1432	0.1605	0.1622	0.1152	0.0844	0.0749	0.1673	0.1734	0.1656	0.1776	0.202	0.099	0.063	0.0281	0.0468	0.1583	0.0199	0.0000	956.8639	952.8996
Rio	0.1333	0.1386	0.146	0.1192	0.069	0.0835	0.1524	0.1572	0.148	0.1544	0.1714	0.1031	0.0561	0.0161	0.0327	0.1598	0.0285	0.0166	0.0000	14.2385
Montaña	0.1357	0.1523	0.1587	0.1083	0.0929	0.0997	0.1788	0.1751	0.1676	0.1817	0.1888	0.0906	0.0627	0.0338	0.0514	0.164	0.0594	0.0386	0.0466	0.0000

Tabla 4 . Resultados del análisis molecular de la varianza (AMOVA) para las poblaciones analizadas de *Arundo donax*

ORIGEN DE LA VARIACIÓN	g. l.	SUMA DE CUADRADOS	COMPONENTES DE LA VARIANZA	PORCENTAJE DE LA VARIACIÓN
Entre grupos	4	749.623	1.49007 Va	23.31
Entre poblaciones dentro de los grupos	15	795.166	2.28918 Vb	35.81
Dentro de las poblaciones	430	1123.805	2.61350 Vc	40.88

Tabla 5. Muestras analizadas con la region de cloroplasto en *Phragmites australis*

Población	Estado	Individuos	COORDENADAS						FUENTE (GPS)	PRECISIÓN	
			N	MIN	SEG	W	MIN	SEG			
1	La Desviación	Coahuila	12	26	54	47.3	102	8	24.8	Garmin etrex	5
2	Río Mezquites	Coahuila	14	26	55	11.9	102	6	25.3	Garmin etrex	5
3	Mojarral	Coahuila	6	26	55	22.38	102	7	22.26	Garmin etrex	5
4	La Poza X	Coahuila	13	26	49	41.8	102	1	37.3	Garmin etrex	5
5	La Vereda	Coahuila	15	26	49	47.3	102	3	32.1	Garmin etrex	5
6	Minatitlán	Veracruz	4	18	3	1.8	94	30	18.1	Garmin etrex	5
7	San Pedrito	Michoacan	9	19	32	54.03	101	37	23.28	Garmin etrex	5
8	Cuiltzeo	Michoacan	20	19	53	44.6	100	54	39.8	Garmin etrex	5
9	La Fabrica	Guanajuato	8	20	13	0.11	101	3	6.54	Garmin etrex	5
10	Yuriria	Guanajuato	9	20	13	15.65	101	8	10.61	Garmin etrex	5
11	La Estación	Tabasco	9	18	26	13.9	92	38	34	Garmin etrex	5
12	Grijalva	Tabasco	15	18	30	47.7	92	39	36.3	Garmin etrex	5
13	Medellin	Tabasco	15	18	5	24.4	92	51	54.8	Garmin etrex	5
14	Pantano	Tabasco	15	18	22	0.2	92	40	49.3	Garmin etrex	5
15	Venta	Tabasco	13	18	3	16.1	94	3	32.2	Garmin etrex	5
16	Melaque	Jalisco	21	19	13	37.9	104	41	43.3	Garmin etrex	5
17	Barra	Jalisco	20	19	12	44.8	104	41	23.4	Garmin etrex	5
18	Majahua	Jalisco	19	19	49	48.1	105	21	40.3	Garmin etrex	5
19	Reja	Jalisco	12	19	51	7.3	105	22	13.6	Garmin etrex	5
20	Ermitaño	Jalisco	27	19	58	59	105	28	16.4	Garmin etrex	5

Tabla 6 .Valores de diversidad genética en *Phragmites australis*. n: número de secuencias, h: número de haplotipos, Hd: diversidad haplotípica, Pi: diversidad nucleotídica

Estado	Población	n	h	Hd	Pi
Coahuila	La Desviación	12	6	0.84848	0.00189
Coahuila	Río Mezquites	14	6	0.73626	0.00181
Coahuila	Mojarral	6	1	0.00000	0.00000
Coahuila	La Poza X	13	5	0.62821	0.00101
Coahuila	La Vereda	15	3	0.25714	0.00054
Veracruz	Minatitlán	4	1	0.00000	0.00000
Michoacan	San Pedrito	9	4	0.75	0.00249
Michoacan	Cuiltzeo	20	7	0.82105	0.00204
Guanajuato	La Fabrica	8	2	0.42857	0.00058
Guanajuato	Yuriria	9	4	0.80556	0.00166
Tabasco	La Estación	9	1	0.00000	0.00000
Tabasco	Grijalva	15	6	0.79048	0.00153
Tabasco	Medellin	15	2	0.13333	0.00018
Tabasco	Pantano	15	2	0.51429	0.13333
Tabasco	Venta	13	1	0.00000	0.00000
Jalisco	Melaque	21	10	0.85714	0.00210
Jalisco	Barra	20	4	0.62105	0.00099
Jalisco	Majahua	19	5	0.61988	0.00118
Jalisco	Reja	12	5	0.66667	0.00134
Jalisco	Ermitaño	27	11	0.84615	0.00195
TOTAL				0.86727	0.00251

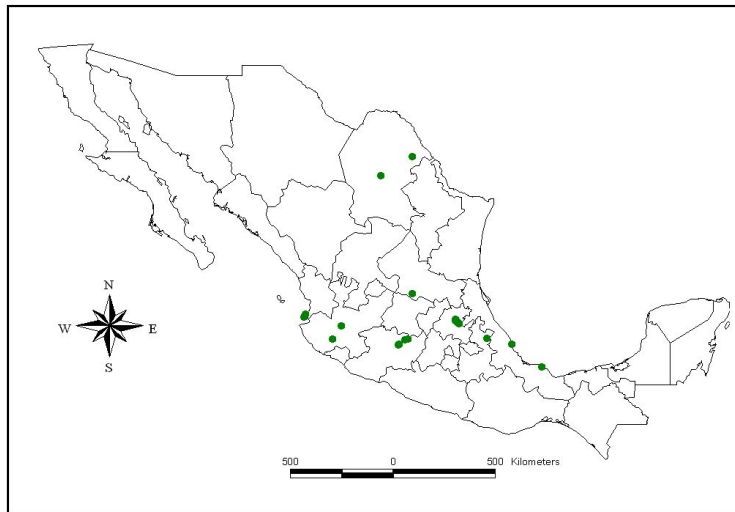


Figura 1. Distribución geográfica de las localidades analizadas en *A. donax*.

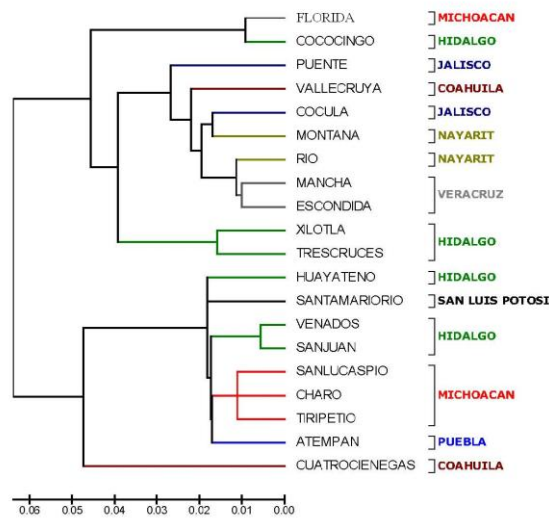


Figura 2. Dendrograma construido por medio del algoritmo *Neighbor-Joining (NJ)* utilizando las distancias genéticas de Nei (1972) en *Arundo donax*. Los colores indican los estados a los que pertenecen las poblaciones analizadas.

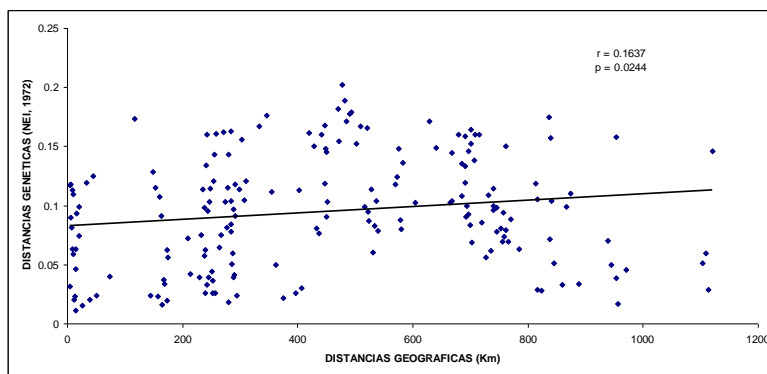


Figura3. Prueba de Mantel para evaluar el aislamiento por distancia entre cada par de poblaciones obtenida a partir de las distancias genéticas de Nei (1972) y las distancias geográficas (km) en *Arundo donax*.

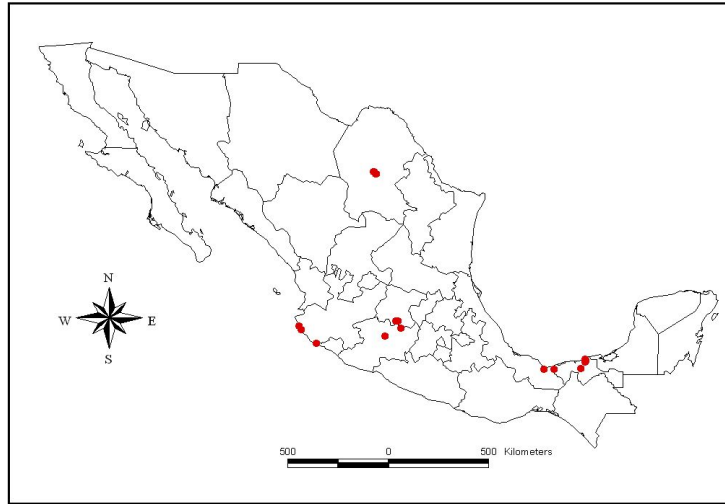


Figura 4. Localización geográfica de las poblaciones analizadas en *Phragmites australis*.

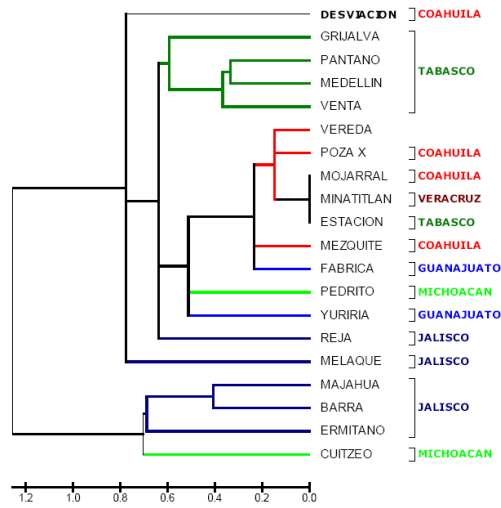


Figura 5. Dendrograma de Neighbor Joining (NJ) de distancias genéticas (promedio de diferencias nucleotídicas) en las poblaciones analizadas de *P. australis*. Los colores indican los estados a los que pertenecen las poblaciones analizadas.

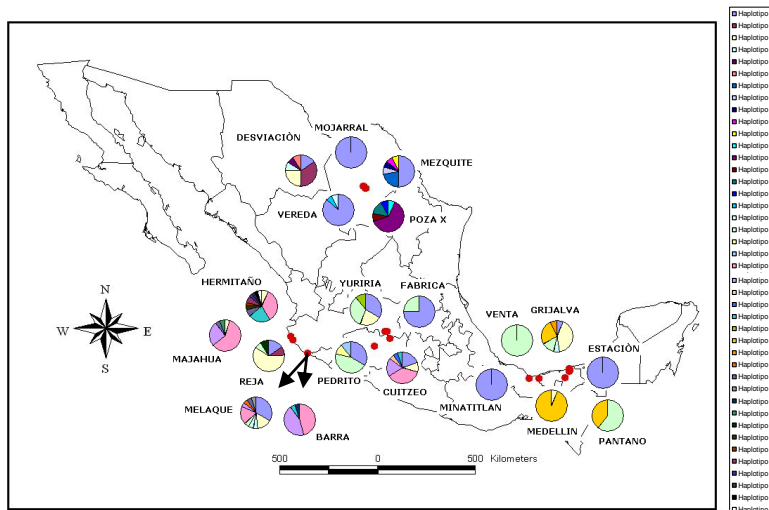


Figura 6. Mapa de la distribución geográfica y frecuencias relativas de los haplotipos encontrados con ADN de cloroplasto en *P. australis*.

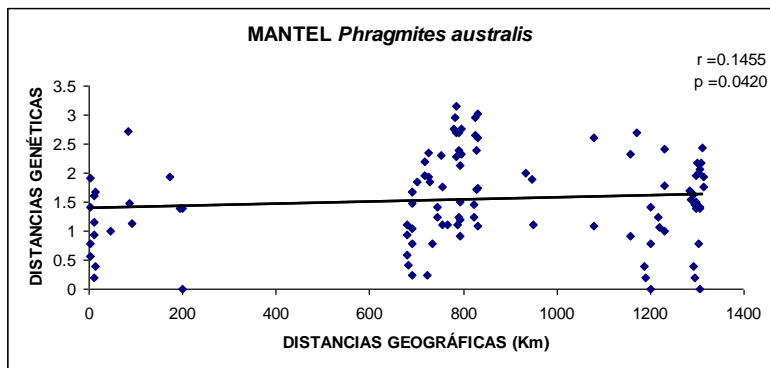


Figura 7. Prueba de Mantel para evaluar el aislamiento por distancia entre cada par de poblaciones obtenida a partir del promedio de las diferencias nucleotídicas entre secuencias y las distancias geográficas (km) en *Phragmites australis*.

LITERATURA CITADA

Ahmad, R., P. Liow, D. F. Spencer. & M. Jasieniuk. 2008. Molecular evidence for a single genetic clone of invasive *Arundo donax* in the United States. *Aquat. Bot.* 88:113–120.

Allendorf, F. W. & L. L. Lundquist. 2003. Introduction: Population Biology, Evolution, and Control of Invasive Species. *Conservation Biology.* 17:24–30.

Baker, H.G. 1965. Characteristics and modes of origins of weeds. In: Baker, H. G. & G. L. Stebbins, (eds.). *The Genetics of Colonizing Species.* Academic Press, London. pp. 141–172.

Baker, H. G. 1974. The evolution of weeds. *Annual Review of Ecology and Systematics.* 5: 1–24.

Barrett, S. C. H. 1992. Genetics of weed invasions In: S. K. Jain & L. W. Botsford, (eds.). *Applied Population Biology.* SPB Academic. Amsterdam. Pp. 91-119.

Bell, G. P. 1997. Ecology and management of *Arundo donax*, and approaches to riparian habitat restoration in southern California. In: Brock, J. H., M. Wade., P. Pysek. & D. Green, (eds.). *Plant invasion: Studies from North America and Europe.* Backhuys Publishers, Leiden. The Netherland. Pp. 103-113.

Bossdorf, O., H. Auge., L. Lafuma., W. E., Rogers., E. Siemann. & D. Prati. 2005. Phenotypic and genetic differentiation between native and introduced plant populations. *Oecologia* 144, 1–11.

Cockerham, C. C. 1969. Variance of gene frequencies. *Evolution.* 23: 72-83.

Cristescu, M. E. A., P. D. Hebert, J. D. S. Witt. F. J. MacIsaac. & I. A. Grigorovich. 2001. An invasion history for *Cercopagis pengoi* based on mitochondrial gene sequences. *Limnol Oceanogr.* 46(2):224–229.

Dame, L. L. & F. S. Collins. 1888. *Flora of Middlesex Country, MA* (Middlesex Institute, Malden, MA).

- Dlugosch, K. M. & I. M. Parker. 2008. Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology*. 17: 31–449
- Doyle, J. J. & J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19: 11-15.
- Dudley, T. L. 2000. *A. donax donax L.* In C.C. Bossard, J. M. Randall. & M.C. Hoshovsky, (eds.). *Invasive Plants of California's Wildlands*. Berkeley, CA: University of California Press. Pp. 53-58.
- Eguiarte, L. E. 1990. Genética de poblaciones de *Astrocaryum mexicanum* Liebm. en Los Tuxtlas, Ver. Tesis de doctorado. Centro de Ecología. UNAM. México, D.F.
- Excoffier, L. & P. E. Smouse. 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Excoffier, L. 2001. Analysis of population subdivision. In: D. J. Balding, M. Bishop. & C. Cannings, (eds.). *Handbook of Statistical Genetics*. John Wiley and Sons. Pp. 271-302.
- Goman, M. & L. Wells. 2000. Trends in river flow affecting the northeastern reach of the San Francisco Bay estuary over the past 7,000 years. *Quaternary Research* 54:206-217.
- Gordon, D., C. Abajian. & P. Green. 1998. Consed: A Graphical Tool for Sequence Finishing. *Genome Research*. 8 (3): 195-202.
- Graves, C. B., E. H. Eames, C. H. Bissel., L. Andrews, E. B. Harger. & C. A. Weatherby. 1910. *Bulletin of the Connecticut Geological and Natural History Survey* No. 14 (Case, Lockwood: Brainard, Hartford, CT).
- Hansen, R. M. 1978. Paleobiology. Shasta ground sloth food habits, Rampart Cave, Arizona. 3(4): 302-319.
- Hänfling, B., G. R. Carvalho. & R. Brandl. 2002. mt-DNA sequences and possible invasion pathways of the Chinese mitten crab. *Mar Ecol Prog Ser* 238:307–310.
- Hendrickson, D.A. & S. McGaugh. 2005. *Arundo donax* (Carrizo Grande / Giant Cane) in Cuatro Ciénegas (<http://desertfishes.org/cuatroc/organisms/non-native/arundo/Arundo.html>).
- Holm, L. G., D. L. Plucknett, J. V. Pancho. & J. P. Herberger. 1977. *The World's Worst Weeds: Distribution and Biology*. The University Press of Hawaii, Honolulu, Hawaii, USA.
- Hooper, D. U., & P. M. Vitousek. 1998. Effects of plant composition and diversity on nutrient cycling. *Ecological Monographs*. 68: 121-149.
- Jaramillo-Correa, J. P., E. Aguirre-Planter, D. P. Khasa, L. E. Eguiarte, D. Piñero, G. R. Furnier. & J. Bousquet. 2008. Ancestry and Holocene divergence of subtropical montane forest isolates: molecular biogeography of the genus *Abies* (Pinaceae) in southern México and Guatemala. *Molecular Ecology*. 17: 2476–2490.

- Khudamrongsawat, J., R. Tayyar. & J. S. Holt. 2004. Genetic diversity of giant reed (*Arundo donax*) in the Santa Ana River, California. *Weed Science* 52: 395-405.
- Lewandowski, I., J.M.O. Scurlock, E. Lindvall. & M. Christou. 2003. The development and current status of perennial rhizomatous grasses as energy crops in the US and Europe. *Biomass Bioenergy*. 25: 335–361.
- Lavergne, S. & J. Molofsky. 2007. Increased genetic variation and evolutionary potential drive the success of an invasive grass. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104(10): 3883–3888.
- Lynch, M. & B. G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27 : 209-220.
- Marks M., B. Lapin. & J. Randall. 1993. Element Stewardship Abstract for *Phragmites australis*. The Nature Conservancy.
- Miller, M. P. 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA). Ver.1.3. Northern Arizona University, Flagstaff, AZ.
- Mitchell, C.E., D. Tilman. & J.V. Groth. 2002. Effects of grassland plant species diversity, abundance, and composition of foliar fungal disease. *Ecology*. 83: 1713–1726.
- Mooney, H. A. & E. E. Cleland. 2001. The evolutionary impact of invasive species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:5446–5451.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*. 106(84,284): 238-292.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 3321-3323.
- Newsome, A. E. & I. R. Noble. 1986. Ecological and physiological characteristics of invading species. In: R.H. Groves. & J. J. Burdon, (eds.). *Ecology of biological invasions*. Cambridge Univ. Press. New York, N. Y. Pp. 1-20.
- Niering, W. A., R.S. Warren. & C. G. Weymouth. 1977. Our dynamic tidal marshes: Vegetation changes as revealed by peat analysis. *Connecticut Arboreum Bulletin* 12:22.
- Novak, S. J. 2007. The role of evolution in the invasion process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 10: 3671–3672.
- Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13: 1143-1155.
- Nybom, H. & I. Bartish. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD marker in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 3: 93-114.

- Oakins, A. J. 2001. Faculty of Earth Systems Science and Policy in the Center for Science, Technology, and Information Resources at California State University Monterey Bay In Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Bachelor of Science.
- Okada, M., M. Lyle. & M. Jasieniuk. 2009. Inferring the introduction history of the invasive apomictic grass *Cortaderia jubata* using microsatellite markers. *Diversity and Distributions*. 15: 148–157.
- Perdue, R. E. 1958. *Arundo donax*- source of musical reeds and industrial cellulose. *Economic Botany*. 12:368-404.
- Polunin, H. A. & A. Huxley. 1987. *Flowers of the Mediterranean*. Hogarth Press. London.
- Provan, J, M. Pamela., M. Darragh, & S. Mathews. 2004. Universal primers for the amplification of chloroplast microsatellites in grasses (Poaceae). *Molecular ecology notes* 4: 262-264.
- Ridley, H. N. 1930. *The Dispersal of Plants Throughout the World*. London: L. Reeve.
- Roux, J. L. & A. M. Wiczorek. 2009. Molecular systematics and population genetics of biological invasions: towards a better understanding of invasive species management. *Annals of Applied Biology* 154: 1–17.
- Rozas, J., J. C. Sánchez-DelBarrio., X. Messeguer. & R. Rozas. 2008. DnaSP, DNA Polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*. 19: 2496-2497.
- Sakai, A. K., F. W. Allendorf, J. S. Holt, D. M. Lodge, J. Molofsky, K. A. With, S. Baughman, R. J. Cabin, J. E. Cohen, N. C. Ellstrand, D. E. McCauley, P. O’Neil, I. M. Parker, J. N. Thompson, & S. G. Weller. 2001. The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology and Systematics* 32:305–332.
- Sala, O. E, Chapin FSIII, Armesto J.J., Berlow, E, Bloomfield J, Dirzo R, Huber-Sanwald E, Huenneke L.F, Jackson, R. B, Kinzig A. Leemans R. Lodge D.M, Mooney H.A, Oesterheld M., Skyes, M.T., Walsker, B.H., Walsker M. & Wall, D. H. 2000. Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287:1770–1774.
- Saltonstall, K. 2002. Cryptic invasion by a non-native genotype of the common reed, *Phragmites australis*, into North America. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 99:2445-2449.
- Saltonstall, K. 2003. Microsatellite variation within and among North American lineages of *Phragmites australis*. *Molecular ecology* 12: 1689-1702.
- Saltonstall, K., P. M. Peterson, & R. J. Soreng. 2004. Recognition of *Phragmites australis* subsp. *americanus* (Poaceae: Arundinoideae) in North America: evidence from morphological and genetic analyses. *SIDA Contrib. Bot.* 21:683–692.
- Saltonstall, K. & M. J. Sweringen. 2006. Plant Conservation Alliance, Alien Plant Working Group. <http://www.nps.gov/plants/alien/fact/phau1.htm>.
- Saltonstall, K. & D. P. Hauber. 2007. Notes on *Phragmites australis* (Poaceae: Arundinoideae) in North America. *J. Bot. Res. Inst. Texas* 1:385–388.

- Saltonstall, K. & J. C. Stevenson. 2007. The effect of nutrients on seedling growth of native and introduced *Phragmites australis*. *Aquat. Bot.* 86:331–336.
- Saltonstall, K. A. Lambert & L. A. Meyerson. 2010. Genetics and Reproduction of Common (*Phragmites australis*) and Giant Reed (*Arundo donax*). *Invasive Plant Science and Management*. 3:495-505.
- Schneider, S., D. Roessli. & E. Excoffier. 2000. Arlequin Version 2.0. A Software for Population Genetic Data Analysis. University of Geneva, Geneva.
- Stone, W. 1910. Annual Report of the New Jersey State Museum (New Jersey State Museum, Trenton).
- Tamura, K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., & Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
- Taberlet, P., L. Gielly., G. Pautou. & J. Bouvet. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*. 17: 1105-1109.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak., F. Jeanmougin. & D. G. Higgins. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25:4876-4882.
- Tillman, D. 1996. Biodiversity: Population versus ecosystem stability. *Ecology* 77: 350-363.
- Turner, T. L., E. C. Bourne, E. J. Von Wettberg, T. T Hu & S. V Nuzhdin. 2010. Population resequencing reveals local adaptation of *Arabidopsis lyrata* to serpentine soils. *Nature Genetics* 42: 260-263.
- Torrey, J. 1843. *Flora of the State of New York* (Carroll and Cook, Albany).
- Van Driesche, R. G. & T. S. Bellows Jr. 1996. *Biological Control*. Chapman & Hall. 539 pp. N. Y.
- Vitousek, P. M. 1992. Global environmental change: an introduction. *Annu Rev Ecol Syst* 23:1–14.
- Vitousek, P.M. 1994. Beyond global warming: ecology and global change. *Ecology* 75:1861–1876
- Walker, B. & W. Steffen. 1997. An overview of the implications of global change for natural and managed terrestrial ecosystems. *Conservation Ecology* 1 (2): <http://www.consecol.org/vol1/iss2/art2>.
- Wares, J.P., A. R, Hughes. & R. K. Grosberg. 2005. Mechanisms that drive evolutionary change: insight from species introductions and invasions. In: D.F. Sax, J.J. Stachowicz. & S.D. Gains, (eds.). *Species invasions: insights into ecology, evolution, and biogeography*. Sinauer Associates Inc., Sunderland, Massachusetts. Pp. 229-257.
- Wright, S. D. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*. 15: 395-420.
- Zohary, M. 1962. *Plant life of Palestiène*. Ronald Press, New York.