



00361
30-2ej
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

BIOLOGIA REPRODUCTIVA Y
ESTRUCTURA GENETICA DE
Psychotria faxluensis (RUBIACEAE)
EN LOS TUXTLAS, VERACRUZ.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
(B I O L O G I A)
P R E S E N T A :

NIDIA PEREZ NASSER

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1990



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 está 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.

INDICE

CONTENIDO	PAGINAS
AGRADECIMIENTOS	
RESUMEN	1
I. INTRODUCCION	2
II. OBJETIVOS	12
III. DESCRIPCION DEL SITIO Y ESPECIE DE ESTUDIO	13
IV. MATERIALES Y METODOS	21
V. RESULTADOS	35
VI. DISCUSION	63
VII. CONCLUSIONES	76
APENDICE	77
BIBLIOGRAFIA	83

RESUMEN

Se estudiaron algunos aspectos de la biología reproductiva y la estructura genética de una población de Psychotria faxlucens en la selva de Los Tuxtlas, Veracruz, México, utilizando métodos ecológicos y métodos bioquímicos los cuales consistieron de electroforesis en geles de almidón.

Psychotria faxlucens es una árbol heterostilico dominante del estrato inferior de la selva. Se encontró una proporción de morfos cercana a 1. Mostró muchas de las características típicas de la distilia. La longitud de los estilos y estambres fueron significativamente diferentes entre los dos morfos. El morfo pin presentó estilos largos y estambres cortos, el morfo thrum tiene estambres largos y estilos cortos. Los estigmas y anteras están localizados reciprocamente en las flores. Las flores pin producen más granos de polen y son más pequeños que las flores tipo thrum. Las flores abren al anochecer, la máxima producción de néctar se registró entre las 9 y 10 de la mañana, no habiendo diferencias significativas entre los morfos. La concentración de néctar para el morfo pin y thrum fueron en promedio, 13.38 % y 12.63%, respectivamente. Las visitan pequeños esfíngidos, palomillas y colibríes. Las proporciones polen/óvulo fueron más grandes en el morfo pin y en general indicaron que su sistema reproductivo corresponde a xenogamia. Las polinizaciones experimentales indican un sistema de auto-incompatibilidad ligado al dimorfismo floral, sin embargo, existe cierto grado de auto-compatibilidad dentro de cada morfo. Las cargas de polen variaron entre los morfos, pero fue mayor en estigmas pin. La tasa de entrecruzamiento obtenida por métodos ecológicos fue menor a la estimada por medio de isoenzimas. Esta última tasa, fue cercana a 1 en ambos morfos con un rango de 0.934 a 1.

Mostró alta variabilidad genética expresada en el polimorfismo ($P=0.400$), la heterocigosis promedio ($H=0.496$), el número de alelos por loci ($A=2.37$) y número efectivo de alelos ($A_e=2.22$). Estos datos se basaron en 20 loci ensayados. El análisis de la estructura genética se realizó con datos de 6 enzimas (GDH, LAP, MDH, 6-PGD, PGI y PGM). Los índices de fijación mostraron cierta variación entre loci para una misma subpoblación y entre subpoblaciones, esto sugiere que las subpoblaciones se encuentran estructuradas espacialmente. Los valores del índice de fijación multilocus (F_m) en ambas subpoblaciones, tanto para adultos como para plántulas fueron distintos entre sí, (plántulas = 0.027 y 0.206; adultos = 0.046 y 0.1265)) pero ninguno fue significativamente diferente de 0, lo cual nos sugiere que la población se encuentra en muy cercana al equilibrio.

Los valores de los estadísticos-F encontrados en el total de la población fueron muy pequeños, lo que sugiere poca diferenciación geográfica entre subpoblaciones (plántulas $F_{is}=0.133$, $F_{it}=0.160$ y $F_{st}=0.031$; adultos $F_{is}=0.115$, $F_{it}=0.138$ y $F_{st}=0.026$).

I. INTRODUCCION

Los niveles y patrones de variación genética juegan un papel muy importante en determinar el potencial evolutivo de una especie o población. Estos patrones de variación genética están fuertemente determinados por los efectos de cinco procesos evolutivos fundamentales: 1) deriva génica, 2) migración (flujo génico), 3) sistemas de apareamiento, 4) mutación y 5) selección natural. Por consiguiente, un requisito para entenderla biología evolutiva de una especie es el conocimiento de su variación genética (Lewontin 1974; Endler 1977; Gottlieb 1977; Brown 1979; Slatkin 1980).

Los estudios de variación genética involucran dos aspectos principalmente: el primero se refiere a la descripción de los niveles de variación mantenida dentro de las poblaciones; el segundo, concierne a la manera en cómo está repartida la variación entre las poblaciones y tiene particular importancia para la conservación de recursos genéticos. De esta manera, el conocimiento de la estructura genética no solo proporciona elementos para entender los mecanismos de evolución que operan en los organismos, sino también para conocer los procesos de domesticación de plantas cultivadas e información para programas de manejo y conservación de recursos naturales (Franklin 1980; Frankel y Soule 1981; Clegg y Brown 1983; Tanksley y Orton 1983 a, b).

El conocimiento de la distribución de la variación genética ofrece información complementaria para el entendimiento de las interacciones entre características ecológicas y de historia de vida, tales como mecanismos de polinización, dispersión de semillas y fecundidad, y de cómo estas interacciones moldean la estructura genética de las poblaciones. Los sistemas de apareamiento y el movimiento de genes se consideran los factores más importantes en la determinación de la estructura genética (Levin y Kerster 1974; Brown et al. 1975; Clegg y Brown 1983; Layton y Ganders 1984; Loveless y Hamrick 1984; Clegg y Epperson 1985).

Los sistemas de apareamiento en las plantas pueden ser analizados con datos de biología floral y ecología reproductiva así como con datos obtenidos a partir de variación isoenzimática. Con estos análisis pueden estimarse las tasas de fecundación cruzada y de autofertilización. La tasa de fecundación cruzada tiene gran importancia en la composición genética de las poblaciones, pues se sabe que afecta directamente los niveles de endogamia, esto es, las tasas altas de fecundación cruzada reducen la endogamia (Clegg 1980; Loveless y Hamrick 1984; Lande y Schemske 1985; Bawa y O'Malley 1987). A su vez, se ha observado que las especies endogámicas mantienen menor variación dentro de

la población y mayor variación entre poblaciones que aquellas especies que presentan fecundación cruzada (Brown 1979; Hedrick 1983; Loveless y Hamrick 1987).

Por otro lado, las poblaciones se diferencian dependiendo de la magnitud y direccionalidad del movimiento de genes. Los niveles altos de flujo génico, aumentan el tamaño efectivo de las poblaciones y reducen la diferenciación local por deriva génica o selección natural. Por el contrario, si el flujo de genes es limitado, se reduce el tamaño efectivo de las poblaciones y aumenta la diferenciación entre subpoblaciones (Jain y Bradshaw 1966; Endler 1973; Schaal 1974; Roughgarden 1979; Hamrick 1987)

Actualmente son ya muy numerosos los estudios que se han hecho en plantas y animales sobre a los niveles de variación genética. Tales estudios involucran la aplicación de técnicas bioquímicas, principalmente electroforesis, para obtener índices de variación genética. Estos índices generalmente son cuantificados en términos del porcentaje de loci polimórficos por población, número efectivo de alelos por locus y la proporción promedio de loci heterocigos por individuo (Crow y Kimura 1970; Hedrick 1983; Futuyma 1986; Hamrick y Loveless 1986; Nei 1987).

Utilizando estos estimadores se ha encontrado que los vertebrados presentan menor variación que los invertebrados (Nevo 1978); y que las poblaciones de plantas tienen altos niveles de variación, similares a los invertebrados (Hamrick, Linhart y Mitton 1979). Las plantas de vida larga, de amplia distribución, localmente abundantes y de estados sucesionales tardíos, presentan altos niveles de variación genética, comparadas con aquellas plantas que no presentaban alguna o ninguna de esas características (Brown 1979; Hamrick et al. 1979; Hamrick y Loveless 1986; Ledig 1986).

La mayor parte de los datos referentes a plantas se obtuvieron de estudios llevados a cabo en especies de origen templado, sin embargo, muy pocos trabajos se han hecho en zonas tropicales (Hamrick y Loveless 1986)

Por otro lado, la creciente preocupación sobre la conservación de reservas naturales tropicales, ha demostrado la necesidad de realizar estudios de genética de poblaciones, pues de esta manera se conocería cómo está organizada espacial y temporalmente la variación genética, la cual está relacionada con la adecuación y ecología de las plantas. Esto permitiría el diseño de estrategias de manejo y conservación de áreas naturales dan una idea más precisa sobre las metodologías adecuadas para la colecta de germoplasma en donde se tenga la mayor variación genética posible. (Brown 1978; Frankel y Soulé 1981; Schonewald-Cox et al. 1983).

Los índices frecuentemente usados para medir la variación

genética son dos básicamente: la proporción de loci polimórfico (P) que nos indica que proporción de todos los loci son polimórficos y la heterocigosis promedio (H) que es la proporción de heterocigotos de todos los loci de una cierta población. El polimorfismo se refiere a la ocurrencia de diferentes formas genéticas en una misma población y la heterocigosis se refiere a la proporción de genotipos diploides compuesto de dos diferentes alelos (Nevo 1978; Brown y Moran 1981; Hedrick 1983). En general, los árboles tropicales presentan niveles altos de variación genética, se ha reportado una $P = 0.28$ y una $H = 0.11$, para 29 especies de árboles), similares a los de otros árboles de zonas templadas ($P = 0.37$ y $H = 0.14$, $n = 113$ especies), pero menores a las coníferas ($P = 0.52$, $H = 0.17$, $n = 40$) y mayores a los de plantas herbáceas ($P = 0.35$, $H = 0.14$) (Hamrick et al. 1979; Hamrick y Loveless 1986; Ledig 1986). Sin embargo, hay casos en donde los niveles de variación de especies tropicales son bajos. Así, el arbusto Lisianthus skinneri (Sytsma y Schaal 1985) presentó una $P = 0.00$ y $H = 0.00$.

Los niveles de diferenciación geográfica tienden a ser pequeños, esto es, la mayor parte de la variación (cerca del 95%) se encuentra en un sólo sitio. Para 8 especies tropicales se han reportado valores pequeños de F_{st} o G_{st} (índice que mide la diferenciación entre poblaciones) en un rango de 0.021 a 0.094 (Hamrick y Loveless 1987), Psychotria nervosa presentó un valor de F_{st} de 0.0038 (Dewey y Heywood 1988), en Piper amalago el valor fue de 0.057 (Heywood y Flemming 1986) y en Acacia crassicarpa fue de 0.093 (Moran et al. 1989)'

Se ha demostrado con datos ecológicos y de electroforesis, que una gran proporción de árboles tropicales así como especies de vida larga en general, tienen tasas de fecundación cruzada cercanas a 1 (Loveless y Hamrick 1987; O'Malley y Bawa 1987; Moran et al. 1989). Esto se explica en parte, porque los árboles tropicales presentan mecanismos que reducen las posibilidades de autopolinización, por ejemplo, el dioicismo, el monoicismo, la heterostilia y la dicogamia, entre otros (Bawa 1974, 1979; Bullock 1985). No obstante, este comportamiento es similar a una buena parte de coníferas y de árboles de zonas templadas, pues generalmente presentan tasas de fecundación cruzada cercanas a 1 (Moran y Bell 1983; Schemske y Lande 1985).

En resumen, los patrones que presentan los árboles tropicales, esto es: altos niveles de diferenciación genética (polimorfismo y heterocigosis), pequeños niveles de diferenciación geográfica (valores bajos de F_{st} o G_{st}) y tasas de fecundación cruzada cercanas a 1, sugieren dos cosas: primero, que casi no hay diferencias en la composición genética entre sitios, y esto puede deberse a que exista mucho movimiento de polen y semillas (flujo génico) entre las poblaciones; segundo, que recientemente se fundaron las poblaciones y la deriva génica y/o selección natural han tenido poco o ningún efecto en ellas

(Slatkin 1987). En cuanto a las altas tasas de fecundación cruzada, éstas explican en parte, la gran variación genética encontrada dentro de las poblaciones y los bajos niveles de diferenciación entre ellas (Ledig 1986; Loveless y Hamrick 1987; Bawa y O'Malley 1987). Además, se sugiere que altas tasas de polinización cruzada, son una adaptación de los árboles para reducir la carga producida por mutaciones somáticas (Ledig 1986).

Los sistemas de incompatibilidad en plantas ocupan un lugar especial dentro de los sistemas de cruzamiento que favorecen la fecundación cruzada. En parte, se debe a que la incompatibilidad es fácilmente identificada por las diferencias morfológicas como es el caso de las plantas heterostilicas y también porque al parecer, son relativamente sencillos los mecanismos genéticos involucrados.

La heterostilia es un fenómeno en donde diferentes individuos de una misma población, producen flores hermafroditas que difieren en las longitudes relativas de sus estilos y estambres y favorece el entrecruzamiento entre los diferentes tipos de flor (Crowe 1964; Ornduff 1969; Vuilleumier 1967; Ganders 1979 a y b). Este polimorfismo está controlado genéticamente y generalmente está asociado a un sistema de auto-incompatibilidad, por lo que la fertilización se lleva a cabo sólo entre morfos diferentes (Frankel y Galun 1977; Nettancourt 1977; Ganders 1979).

Hay dos tipos de heterostilia: distilia y tristilia. Las especies distilicas son aquellas especies que presentan individuos con dos morfos. El morfo pin produce flores con estilo largo y estambres cortos y el morfo thrum produce flores con estilo corto y estambres largos (los términos "pin" y "thrum" fueron introducidos por Darwin (1877) para distinguir a la flores distilicas, en cuanto a la morfología de sus estambres y estilos). La distilia no es una forma de apareamiento común pero está ampliamente distribuida entre los grupos taxonómicos; las familias mejor representadas son las Rubiaceae, Boraginaceae, Plumbaginaceae y Primulaceae, Turneraceae entre otras (Darwin 1877; Baker 1953 a y b, 1958, 1962; Bir-Bahadur 1963, 1968; Dulberger 1973; Ganders 1974, 1975, 1979a y b; Ornduff 1975, 1976, 1980; Wyatt y Hellwig 1979; Weller 1980, 1981; Olesen 1987; Riveros et al. 1987).

Las plantas tristilicas poseen tres morfos florales: estilos largos, estilos medianos y estilos cortos. Es un sistema de apareamiento muy raro. Se ha reportado en tres familias: Lytracae, Oxalidaceae y Pontederiaceae (Mulcahy 1964; Dulberger 1970; Ganders 1979; Weller y Denton 1976; Barrett 1977a y b; Weller 1981; Price et al. 1984).

En la mayoría de las especies distilicas, la posición de los estilos y anteras son reciprocas en los dos morfos florales

(Ganders 1979a y b), aunque hay ejemplos en donde no se cumple esta condición como en varias especies de Cordia (Boraginaceae) (Opler et al. 1975), en algunas especies de Villarsia (Menyanthaceae) (Ornduff 1986) y un caso más raro es en la planta Quinchamalium chilensi (Santalaceae) (Riveros et al. 1987) en donde la reciprocidad se pierde después de la antesis por crecimiento alométrico de estilos y estambres. Ganders (1979) evalúa la importancia de la posición recíproca de los estilos y estambres como una condición que promueve la polinización cruzada y concluye, como ya Darwin (1877) había sugerido, que efectivamente promueven éste tipo de polinización.

En muchos de los trabajos que se han hecho con plantas heterostilísticas se ha reportado que los granos de polen de flores pin son más pequeños que los de flores thrum. Además, las flores pin producen más polen que el morfo thrum (Darwin 1877; Vuilleumier 1967; Dulberger 1974; Ornduff 1975, 1979; Ganders 1979a y b; Weller 1980, 1981; Schou 1983; Sobrevila et al. 1983; Riveros et al. 1987). Por otro lado, Ornduff (1980) no encontró diferencias en la producción de polen entre morfos en algunas poblaciones de Hedyotis caerulea (Rubiaceae). No obstante, el dimorfismo en el tamaño y producción de polen parecen ser características comunes en plantas distilísticas.

Usualmente, las especies heterostilísticas presentan diferente producción de semillas entre morfos. En la mayoría de los casos, las flores pin producen más semillas que las flores thrum (Ganders 1979; Richards 1986) pero en otras especies se presenta lo contrario (Ornduff 1979). Por otro lado, Sobrevila et al. (1983), en su trabajo con dos especies de Palicourea (Rubiaceae) reportan alta variación en la producción de frutos entre poblaciones y entre morfos dentro de una misma especie.

En poblaciones naturales las cargas de polen en los estigmas reflejan el flujo de polen entre morfos y dentro de cada morfo. Consecuentemente, dan una idea de la eficiencia de la heterostilia (Ganders 1979). Los análisis de cargas de polen en estigmas de flores distilísticas muestran que los estigmas de pin reciben, en general, más granos de polen que los estigmas thrum (Ganders 1979; Ornduff 1980 a y b; Lewis 1982; Schou 1983, Richards 1986). Se conocen dos excepciones, en Jepsonia heterandra (Saxifragaceae), en donde las cargas de polen son similares en los dos morfos (Ornduff 1971) y Anchusa officinalis (Boraginaceae), donde los estigmas thrum reciben más granos de polen (Philipp y Schou 1981). En varios estudios se ha encontrado más polen pin en estigmas pin que en estigmas thrum, y no hubo diferencias en las cargas de polen tipo thrum en estigmas de ambos morfos. Esto indica que las diferencias en las cargas totales de polen entre morfos es atribuible a diferencias en el número promedio de granos de polen pin (Ganders 1974; Ornduff 1980; Nic Lughadha y Parnell 1989).

Se ha sugerido que los estigmas pin reciben más granos de polen que los estigmas thrum, por el hecho de que los estigmas pin son más accesibles a los polinizadores (Levin 1968; Ganders 1979; Weller 1980). Sin embargo, depende el tipo de polinizador de cada planta pues se ha demostrado en Jepsonia heterandra que las moscas mueven más el polen pin y las abejas el polen thrum (Ornduff 1971)

En especies distilicas, los dos tipos de estigmas son polinizados ilegítimamente a un grado considerable, es decir, polinización cruzada entre individuos del mismo morfo. Se ha encontrado más polen ilegítimo en estigmas pin que en estigmas thrum (Ganders 1976, 1979; Ornduff 1975, 1980; Schou 1983; Richards 1986). Beach y Bawa (1980) sugieren que el transporte de polen legítimo depende de la disponibilidad y del tipo de polinizadores que existan en las poblaciones naturales, entre otros factores.

En la mayoría de los estudios hechos con plantas distilicas, se han encontrado proporciones de morfos cercanas a la unidad (1:1) (Martin 1965; Bir-Bahadur 1968; Ornduff 1975, 1979; Ganders 1979; Schou 1983; Sobrevila et al. 1983). Sin embargo, algunas especies muestran diferente comportamiento, por ejemplo, Ornduff (1980) reporta que algunas poblaciones de la rubiácea Hedyotis caerluea contiene exceso de plantas pin, y menos común fue la proporción de morfos 1:1. Lo más interesante de este estudio, es que las proporciones cambiaron en el tiempo. Contrario a estos resultados, se reportan proporciones por debajo de la unidad del morfo pin en poblaciones de Quinchamalium chilense (Riveros et al. 1987). Datos similares (exceso de flores thrum) fueron encontrados en varias poblaciones de varias especies de Villarsia (Menyanthaceae) (Ornduff 1986). Entre las especies que presentan desviaciones de la proporción 1:1 hay también cierto grado de auto-compatibilidad. Hay una estrecha relación entre el nivel de incompatibilidad y las proporciones entre morfos. Generalmente, cuando hay una fuerte incompatibilidad la estructura de la población se acerca al equilibrio (Mulcahy 1964; Martin 1967; Ganders 1975; Sobrevila et al. 1983)

Los primeros estudios de la genética de la heterostilia se hicieron con algunas especies de Primula (Bateson y Gregory 1905; Gregory 1911, en Vuilleumier 1967; Ernst 1955; Lewis 1949, 1954; Ford 1971). En estas especies la distilia está controlada por un locus con dos alelos y la tristilia por dos loci, cada uno con dos alelos. Posteriormente se demostró que en la distilia hay un supergene que segrega como un factor mendeliano simple (Charlesworth y Charlesworth 1979). Las plantas pin y thrum presentan dos loci estrechamente ligados, uno de los cuales controla la longitud del estilo (E, e) y el otro la longitud de las anteras (A, a); el alelo E está casi siempre asociado con el alelo A y el alelo recesivo e con a. Las plantas thrum (estilos cortos/anteras largas), generalmente son heterocígas EA/ea y las

plantas pin se comportan como homocigas *ea/ea* en la mayoría de las especies (Vuilleumier 1967; Yeo 1975; Ganders 1979; Ford 1971).

El loci con el alelo E de estilo corto está en desequilibrio de ligamiento con el loci de anteras largas (A) y los alelos e y a también están asociados. Otras características dimórficas de las plantas heterostilicas como son el tamaño del polen, papila estigmática, compatibilidad de estigma y polen, también están controlados por al menos 7 loci estrechamente ligados, heredados como un **supergene** con fuerte desequilibrio de ligamiento (Lewis 1954; Ford 1971; Futuyma 1986). Por otra parte, la heterostilia representa un ejemplo de apareamiento no aleatorio ("assortative mating") fenotípico negativo y se refiere a que individuos de fenotipos similares se aparean con menor frecuencia de lo que se esperaría al azar, hay un incremento en la heterocigosis respecto a la esperada, cambian las frecuencias alélicas y muchas veces se ven favorecidos alelos raros (Crow y Kimura 1970; Hedrick 1983; Falconer 1986).

Generalmente la heterostilia se asocia con sistemas de auto-incompatibilidad. En especies distilicas, el polen de una flor pin es compatible con estigmas de flores thrum y el polen de una flor thrum es compatible con un estigma de flor pin pero la polinización entre flores del mismo morfo es incompatible (Ganders 1979).

La mayoría de los taxa heterostilicos presentan auto-incompatibilidad que puede ser más fuerte en algunas especies que en otras (Mulcahy 1964; Baker 1966; Ornduff 1972, 1980, 1986, 1988; Barrett 1977, 1979; Ganders 1979; Sobrevila *et al.* 1983). La presencia de auto-incompatibilidad entre morfos con compatibilidad intramorfo es poco común y tiende a ser más fuerte la auto-incompatibilidad en el morfo thrum que en el morfo pin. Ejemplos de esto son algunas especies distilicas de Hedyotis (Rubiaceae; Ornduff 1980), Melochia (Sterculiaceae; Martin 1967), Amsinckia (Boraginaceae; Weller y Ornduff 1977; Ganders 1979), Villarsia (Menyanthaceae; Ornduff 1988).

La heterostilia ha evolucionado independientemente y convergentemente en 24 familias de Angiospermas. Los taxa heterostilicos presentan herencia simple mendeliana y son particularmente susceptibles a modificaciones genéticas que influyen en el sistema de apareamiento de las poblaciones (Barrett 1989).

Ganders (1979) considera que la evolución de la heterostilia es un problema aún no resuelto. Sin embargo, Charlesworth y Charlesworth (1979) presentan un modelo que describe cómo evolucionó la heterostilia. Proponen que los progenitores de plantas distilicas fueron monomórficos y auto-compatibles, pero se entrecruzaban frecuentemente. Esto originó la acumulación de una carga genética significativa con alelos recesivos deletéreos.

Un cambio en los polinizadores incrementa la autopolinización y la depresión endogámica. Posteriormente, una mutación produce un nuevo tipo de polen que no es compatible con los individuos de la población y estos no pueden autofertilizarse. De esta manera se establece el ginodioicismo funcional. Después la mutación produce un nuevo tipo de estigma con incompatibilidad con el polen original, pero compatible con el nuevo tipo de polen. En este momento, se genera un sistema de auto-incompatibilidad dialélica. Si se supone que las especies distílicas poseían un locus multialélico incompatible (Crowe 1964; Grant 1975; Nettancourt 1977; Beach y Kress 1980, entre otros), entonces es posible que se alcance un estado dialélico por pérdida de alelos (Crowe 1964). Este proceso es bien conocido y puede ser particularmente importante cuando los tamaños de población son pequeños y opera la deriva génica.

Se ha propuesto que la heterostilia ha evolucionado en dos direcciones: una hacia el dioicismo y subdioicismo y otra hacia la homostilia y auto-compatibilidad (Baker 1966; Vuilleumier 1967; Ganders 1979; Charlesworth y Charlesworth 1979; Beach y Bawa 1980; Wyatt 1983; Barrett 1988, 1989). Existen varios estudios en donde se demuestra la transición de especies de plantas heterostílicas hacia el dioicismo, ejemplos de estas son: Nymphoides (Menyanthaceae; Ornduff 1966; Pratap Reddy y Bir Bahadur 1976, en Wyatt 1983; Barrett 1980), Byrsocarpus (Connaraceae; Baker 1962), Cordia (Boraginaceae; Opler *et al.* 1975; Lloyd 1979), Psychotria (Rubiaceae; Sohmer 1977) y Coussarea (Rubiaceae; Beach y Bawa 1980) entre otras. En todos estos casos, las flores pin han evolucionado para convertirse funcionalmente en hembras y las flores thrum en machos (Ganders 1979; Beach y Bawa 1980). Se sugieren tres hipótesis principalmente, para apoyar estos cambios en los morfos florales: 1) flujo de polen asimétrico (Baker 1958; Willson 1979; Beach y Bawa 1980), 2) asignación de recursos (Casper y Charnov 1982) y 3) selección gametofítica (Mulcahy 1974).

En cuanto al origen de individuos homostílicos, se propone que éstos se derivaron de plantas distílicas a través del cambio de un sistema de apareamiento auto-incompatible a un sistema auto-compatibile. Esta transición puede darse en un sólo paso y está íntimamente asociado con el desarrollo de aislamiento reproductivo y especiación (Baker 1961; Stebbins 1970; Ganders 1979). Ejemplos de estos cambios en los sistemas reproductivos son: Amsinckia (Ray Chisaki 1957, en Barrett 1989), Arenaria (Wyatt 1984), Armeria (Baker 1966), Clarkia (Lewis 1973), Leavenworthia (Lloyd 1965), Melochia (Martin 1967); Oxalis (Ornduff 1972), Plectris (Carey y Ganders 1986), Stephanomeria (Gottlieb 1973). En muchos de los casos, la evolución de la homostilia está asociada con dramáticas reducciones en el tamaño de la flor, adquisición de hábitos que permiten la autopolinización y la evolución de aislamientos reproductivos (Ganders 1979; Ornduff 1969; Barrett 1988).

Recientemente, Barrett (1989) realizó una extensa revisión sobre la evolución de sistemas reproductivos en plantas heterostilicas. Ahí se evalúa la evolución de la homostilia a partir de la distilia en el complejo Turnera ulmifolia (Turneraceae) y a partir de la tristilia en Eichhornia (Pontederiaceae). Concluye que los cambios en los sistemas reproductivos de las plantas son muy rápidos con alteraciones genéticas relativamente simples pero con profundos efectos en los patrones de apareamiento, lo cual puede tener consecuencias evolutivas y ecológicas muy importantes.

En Turnera, la compleja recombinación del supergene de la distilia asociado con la poliploidia, permiten un cambio grande en el sistema de apareamiento con aislamiento reproductivo, alcanzado en un sólo paso mutacional. En cambio, en Eichhornia el rompimiento de la heterostilia involucra varios pasos, con cambios en el sistema de apareamiento, pasando de la condición de fecundación cruzada a autofertilización. De estos dos estudios Barrett concluye que las constricciones genéticas asociadas con el desarrollo floral juegan un papel importante al dirigir las modificaciones reproductivas específicas que puedan ocurrir.

La heterostilia, por consiguiente, es un sistema que ofrece buenas oportunidades para contrastar la estructura genética de la población con los sistemas de apareamiento..

En este estudio se pretende conocer los niveles de variación genética que presenta una población de una especie heterostilica tropical de la zona de Los Tuxtlas, Ver., Méx. Esta especie es Psychotria faxluens Lorence & Dwyer (Rubiaceae). El interés por esta especie se debe a que es relativamente abundante en el estrato inferior de la selva de Los Tuxtlas. Se ha reportado una densidad de 65 individuos por hectárea (Bongers et al. 1988) y tiene la característica de ser distilica.

Este trabajo tiene dos enfoques principalmente. En el primero, se quiere conocer, a partir de datos ecológicos, aspectos de la biología floral y de la biología reproductiva de esta especie, pues esta información nos servirá como una herramienta mas para entender la estructura genética de la población. En el segundo, utilizando técnicas de electroforesis en geles de almidón se pretende estimar los niveles de variación genética y conocer cómo está distribuida ésta variación en la población.

La información proveniente de datos ecológicos, así como de las electroforesis, proporcionarán un mejor entendimiento de las interacciones bióticas y de los procesos evolutivos que se dan en las comunidades tropicales. Finalmente, esta información podrá ofrecer algunos elementos para la realización de programas de conservación de reservas naturales tropicales. Esto es, con datos

de genética de poblaciones se sabrá con mayor precisión las metodologías adecuadas para colectas de germoplasma, en donde se encuentre la mayor variación genética posible, el área mínima requerida para reservas naturales o conservación de bosques entre otras cosas (Franklin 1980, Frankel y Soulé 1981; Brown y Clegg 1983).

II. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son de manera general, conocer la variación genética y algunos aspectos de la biología reproductiva de una población de Psychotria faxlucens en la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas, Ver.

Los objetivos particulares son:

- 1) Estimar los niveles de variación genética de dos poblaciones de Psychotria faxlucens utilizando marcadores enzimáticos.
- 2) Describir la estructura genética de dos poblaciones de P. faxlucens.
- 3) Determinar la tasa de entrecruzamiento de P. faxlucens utilizando métodos genéticos.
- 4) Conocer aspectos de la biología floral y reproductiva de P. faxlucens y usarlos como una herramienta para interpretar su estructura genética.

III. DESCRIPCION DEL SITIO Y ESPECIE DE ESTUDIO.

1. Sitio de Estudio.

Este trabajo se realizó en la Estación de Biología Tropical "Los Tuxtlas", reserva de 700 hectáreas perteneciente al Instituto de Biología de la UNAM. Se encuentra en la vertiente del Golfo de México, en el SE de Veracruz, entre las coordenadas 95° 04' a 95° 09' de longitud oeste y 18° 34' a 18° 36' de latitud norte (Fig. 3.1). Sus elevaciones varían de 150 a 530 m.s.n.m. (Lot-Helgueras 1976).

La región de Los Tuxtlas es de origen volcánico y data del Terciario Superior (Ríos-Macbeth 1952). El sustrato está compuesto principalmente por rocas basálticas y andesíticas, mezclado con cenizas volcánicas y con algunas calizas, areniscas y arcillas.

Estudios realizados sobre el suelo de la región, indican que hay litosoles en áreas de mayor pendiente y regosoles y andosoles tropicales en el resto (FAO-UNESCO 1979). En general son suelos jóvenes y poco desarrollados debido a los efectos de la erosión fundamentalmente producida por lluvia y la pendiente, con grandes cantidades de materia orgánica debido a la contribución que hace la vegetación (Chizón 1984).

El clima de la región de Los Tuxtlas es de tipo "A" (cálido-húmedo), según la clasificación de Koeppen (Soto 1976). En la estación meteorológica de Coyame que se encuentra a 35 Km de la Estación de Biología Tropical "Los Tuxtlas", se han registrado datos de precipitación y temperatura de 1953-1981 (Ibarra-Manríquez y Sinaca 1987), y para la Estación de Los Tuxtlas, se tienen datos de precipitación, registrados durante 10 años (Estrada et al. 1985). La temperatura media anual es de 24.6 °C, la máxima de 32.18 °C y la mínima de 16.4 °C. La precipitación media anual es de 4725.2 mm (Fig. 3.2) (Ibarra-Manríquez 1985). La distribución de las lluvias es irregular a lo largo del año. La estación seca se extiende de marzo a mayo con una época de lluvias de junio a octubre. Una segunda época de lluvias se produce por la irrupción de los llamados "nortes" que alcanzan velocidades de hasta 80 Km/h producen descensos de la temperatura de hasta 10 °C durante el invierno, así como precipitaciones abundantes (el 15% de la cantidad total). Estos "nortes" son de suma importancia para la estructura de la vegetación, pues promueven la producción de claros (huecos en el dosel de la selva) por la caída de árboles o ramas (Martínez-Ramos 1985).

El tipo de vegetación dominante que se desarrolla en la Estación de Los Tuxtlas es la selva alta perennifolia (Miranda y

Hernández-X. 1963) o bosque tropical perennifolio (Rzedowski 1978).

La información que existe sobre la estructura y composición de la selva de Los Tuxtlas, indica que, en esencia, la selva es un "mosaico" de parches de vegetación en diferentes etapas serales y de diferente composición florística. Sin embargo, pueden caracterizarse especies dominantes localmente que alcanzan diferentes alturas. Las especies más altas que constituyen el dosel (20 m o más), son: Brosimum alicastrum (Moraceae), Cordia megalantha (Boraginaceae), Ficus insipida (Moraceae), Lonchocarpus guatemalensis (Leguminosae), Nectandra ambigens (Lauraceae), Omphalea oleifera (Euphorbiaceae), Poulsenia armata (Moraceae), entre otras. Especies de talla mediana (10-20 m) son Cymbopetalum baillonii (Annonaceae), Dendropanax arboreus (Araliaceae), Pouteria durlandii (Sapotaceae), Pseudolmedia oxyphyllaria (Moraceae), Stemmadenia donnell-smithii (Apocynaceae). Finalmente, árboles y palmas de tamaño pequeño (1-10 m) caracterizan el estrato inferior de la selva, y dentro de éstas puede destacarse a Astrocaryum mexicanum (Palmae), Bactris tricophylla (Palmae), Chamaedorea spp. (Palmae), Faramea occidentalis (Rubiaceae), Psychotria spp. (Rubiaceae). Los claros presentan una composición diferente, siendo las especies más comunes Carica papaya (Caricaceae), Cecropia obtusifolia (Moraceae), Heliconia appendiculata (Tiliaceae), Myriocarpa longipes (Urticaceae), Piper auritum (Piperaceae) (Martínez-Ramos 1985; Núñez-Farfán 1985; Álvarez-Buylla 1986).

Actualmente se tiene un listado florístico de las especies de la Estación de Los Tuxtlas, que incluye todas las formas de vida. Comprende 817 especies, de las cuales más de 200 son árboles, distribuidos en 118 familias. Las familias mejor representadas son: Araceae (18), Bignoniaceae (16), Bromeliaceae (15), Compositae (59), Cyperaceae (13), Euphorbiaceae (24), Gramineae (16), Lauraceae (15), Leguminosae (54), Moraceae (20), Orchidaceae (60), Palmae (10), Piperaceae (21), Polypodiaceae (50), Rubiaceae (40) y Solanaceae (20). El número entre paréntesis indica el número de especies (Ibarra-Manríquez y Sinaca-Colín 1987).

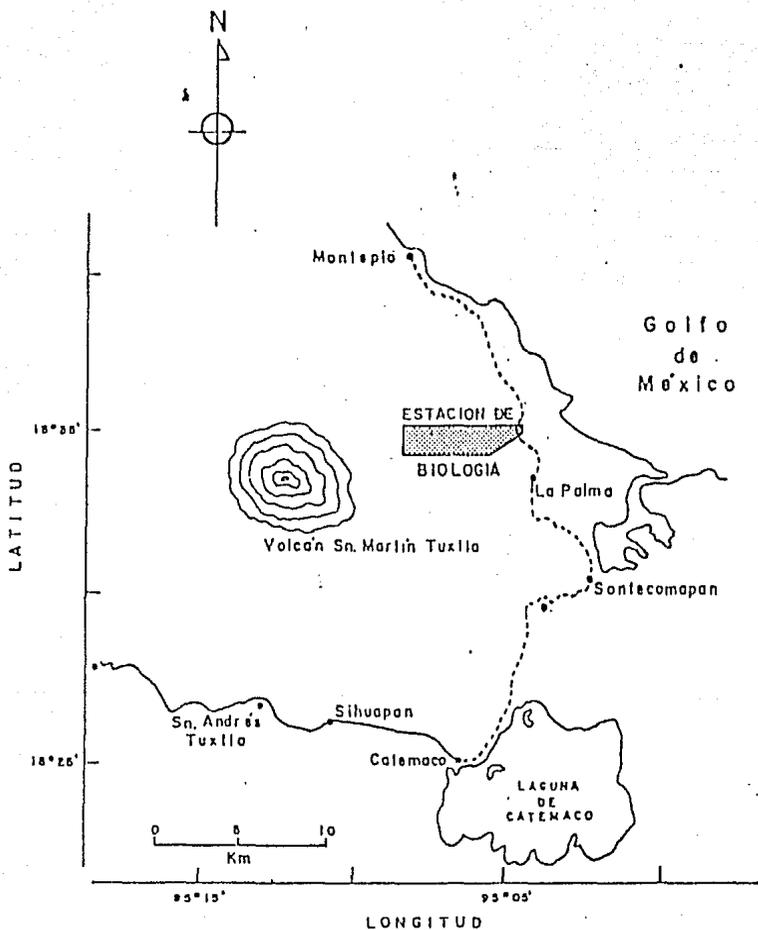


Fig. 3.1. Localización de la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas en el Estado de Veracruz.

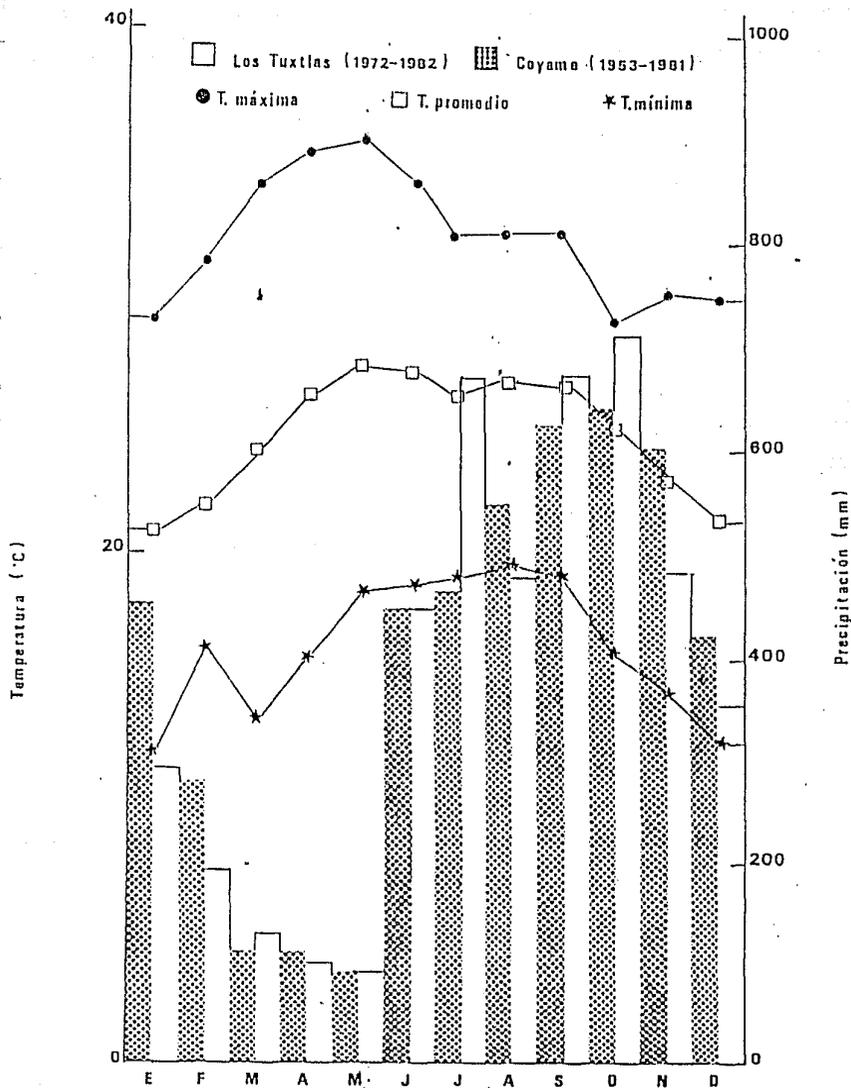


Fig. 3.2. Climograma de la Estación meteorológica de Coyame (30 km al Sur de la Estación Los Tuxtlas).

2. La Especie de estudio.

Psychotria faxlucens Lorence & Dwyer (Rubiaceae). Es un árbol dominante en la selva de Los Tuxtlas. Se ha clasificado dentro del grupo de especies independientes de claros, es decir, capaces de completar su ciclo de vida en la sombra (Hartshorn 1980; Martínez-Ramos 1985). Bongers et al., (1987) reportan 65 individuos por Ha, incluyéndola dentro del grupo de especies abundantes, de talla pequeña, de la selva de Los Tuxtlas. Este grupo es caracterizado por la concentración de muchos individuos en la primera categoría de tamaño de clases, con el resto de las clases pobremente representadas (estructura de tamaños de tipo J invertida). Esta especie forma un banco de plántulas con densidades apreciables, donde ocurre una alta mortalidad.

A continuación se reproduce, con ligeras modificaciones, la descripción de P. faxlucens elaborada por Ibarra-Manríquez (1985) basada en las colectas realizadas en la Estación de Los Tuxtlas.

Psychotria faxlucens . ARBOL de 3-9 m de alto y diámetro a la altura del pecho de 4-20 cm, tronco cilíndrico, recto. Corteza lisa a ligeramente fisurada, parda, con lenticelas no evidentes y con olor a mentol. Copa redondeada, densa.

HOJAS. Simples. opuestas. Pecíolo de 4-15 mm de largo y 0.5-1 mm de ancho, plano por el haz, glabro. Lámina de 3.5-14 cm de largo y 2-5.5 mm de ancho, elíptica u ovada, recurvada, base aguda, raramente redondeada, ligeramente asimétrica, ápice agudo a cuspidado, margen liso, haz brillante, oscuro, glabro, grisáceo al secar, envés pálido, glabro, venación pinnada, 6-8 venas secundarias, más prominentes por el envés. Estípulas de 1-1.5 mm de largo, deltoides o truncadas, con dos pequeños dientes en el ápice, prontamente caducas.

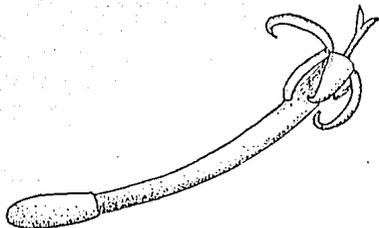
FLOR. Plantas monoclinas. Inflorescencia terminal, de 40-70 mm de largo incluyendo el pedúnculo. Pedúnculo de 13-20 mm de largo y 0.5-1 mm de ancho, glabro. Cáliz copuliforme, de 5.5-7 mm de largo y 2.5-3.5 mm de ancho, verdoso, ligeramente bilobulado, con 4-6 dientes pequeños; corola tubular de 20-44 mm de largo y de 2-3 mm de ancho, blancas, glabras, con 5 lóbulos de 8-14 mm y de 1.5-2.5 mm de ancho, reflexos; 5 estambres de 20-52 cm de largo, petalostémonos; pistilos de 2-5cm de largo, ovario cilíndrico, bilocular, estigma bifido. Las flores presentan dimorfismo en las longitudes relativas de los estambres y estilos. Así las flores de estilos largos y estambres cortos se denominan pin y las flores con estilos cortos y estambres largos se llaman thrum (Fig. 3.3).

FRUTO. Infructescencias similares a las inflorescencias. Los frutos son bayas de 1.5-2.3 cm de largo y de 1-2 cm de ancho, negras, elipsoides, brillantes y 1-2 semillas por

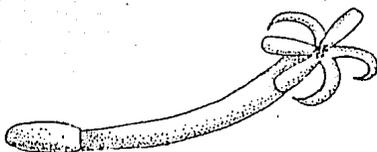
fruto. Semillas de 15-17 mm de largo, 8-9 mm de ancho y 4-5 mm de grueso, blanco amarillentas, hemiesféricas, ligeramente sulcadas por su parte dorsal. Endospermo presente.

FENOLOGIA. Especie perennifolia que produce hojas verde pálidas de febrero a abril. Florece de marzo a mayo y fructifica de noviembre a enero.

DISTRIBUCION. La distribución de P. faxlucens está restringida al sur de México. Se ha reportado en la zona de Los Tuxtlas, alrededor de Catemaco, San Andrés Tuxtla, y Santiago Tuxtla. Las colectas más distantes provienen del Río Uxpanapa y alrededor de Nanchital, cerca de la frontera entre Veracruz y Tabasco (Ibarra-Manríquez 1985; Lorence & Dwyer 1987).



A



B

Fig. 3.3. Flores distílicas de Psychotria faxiucens. La figura A corresponde al morfo Pin y la B al morfo Thrum.

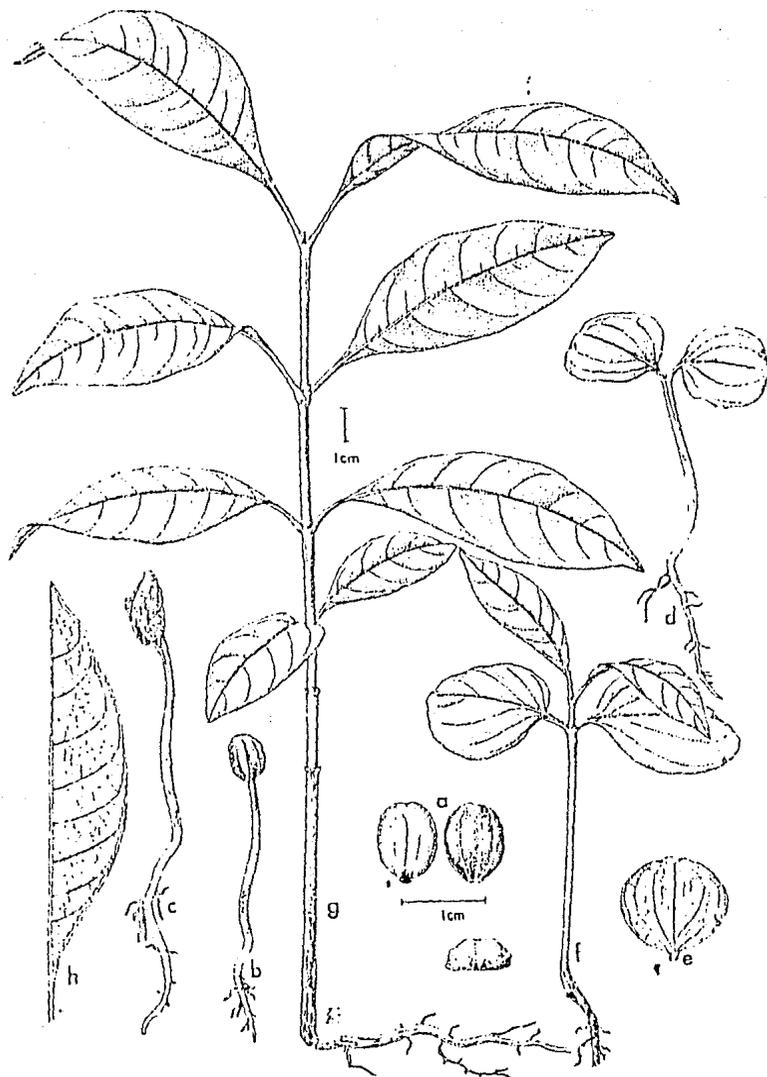


Fig. 3.4. *Psychotria faxlucens* . a) semilla (2x); b) y c) emergencia de los cotiledones de la plántula; d) plántula; e) cotiledón; f) y g) estados juveniles; en la base de las hojas se aprecian las estípulas interpeciolares; h) venación de la hoja. (Tomado de Del Amo 1979).

IV. MATERIALES Y METODOS.

El trabajo se realizó en dos partes básicamente. El trabajo de campo que corresponde al estudio de algunos aspectos de biología floral y biología reproductiva de la planta y el trabajo de laboratorio en donde se estudió la variabilidad genética de dos subpoblaciones de P. faxlucens. El trabajo de campo se realizó en abril, noviembre y diciembre de 1987 y en abril de 1988.

1. Trabajo de Campo.

1.1. Patrones de distribución y estructura de la población de Psychotria faxlucens.

Con objeto de conocer más sobre la abundancia y distribución de esta especie, se realizaron censos en dos diferentes sitios (sitio I y sitio II), dentro de la selva y a 1 km de distancia entre ellos (Fig. 4.1). En cada sitio se delimitó una parcela de 25 x 30 m, dividida en 5 cuadros de 10 x 15 m cada uno y en ellos se registraron todos los individuos de P. faxlucens mayores de 50 cm de altura. Las parcelas funcionaron como sitios permanentes de trabajo.

Para determinar el patrón de distribución a un nivel local, en los sitios permanentes de observación se hizo un análisis preliminar usando un método con área, derivado de las suposiciones de que se comporta según una distribución de Poisson, en donde la varianza debe ser igual a la media de individuos por cuadro (Kershaw 1966)

La estructura poblacional de P. faxlucens en los sitios de observación, se examinó usando las distribuciones de frecuencias de diámetro a la altura del pecho de individuos mayores a los 50 cm de altura. Se utilizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para comparar las distribuciones de diámetros entre sitios (Zar 1984).

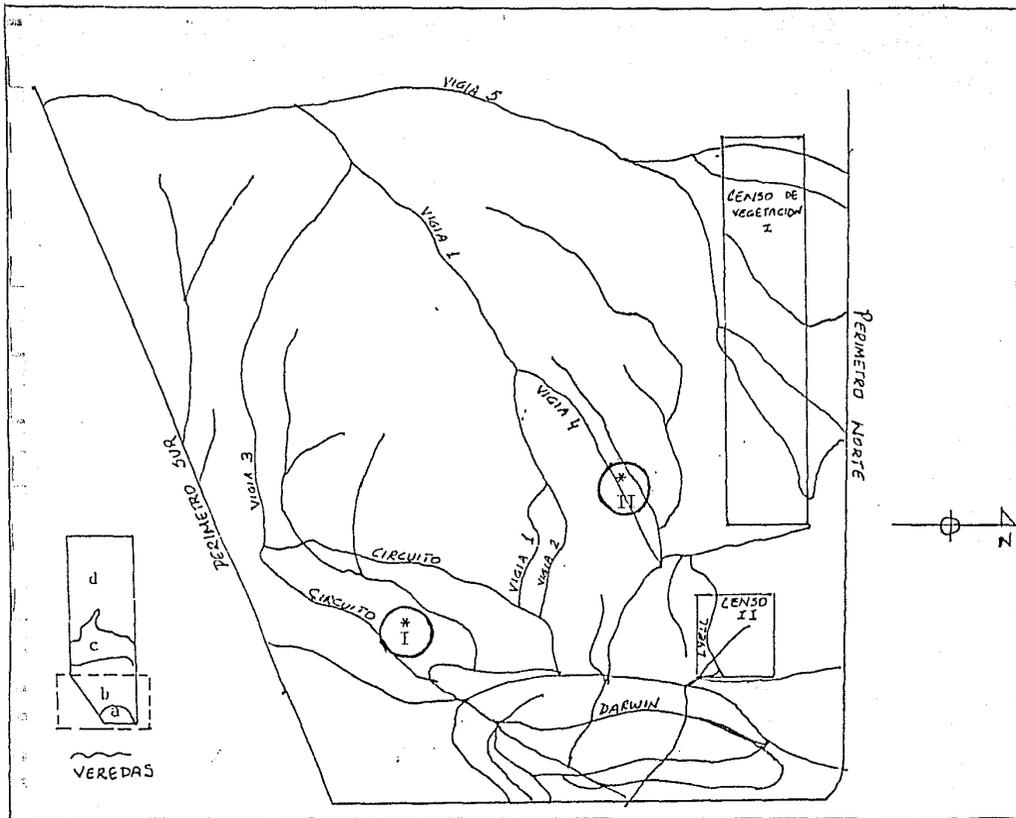


Fig. 4.1. Localización de los sitios de estudio (*) en la Estación de Los Tuxtlas, Ver. a) área de enseñanza y difusión, b) zona de investigación, c) zona experimental, d) zona de Reserva.

1.2. Biología Floral y Sistemas Reproductivos.

1.2.1. Proporción de morfos.

En abril de 1987, cuando P. faxlucens se encontraba en floración, se marcaron todos los individuos reproductivos que se hallaban en los sitios de estudios arriba mencionados. Se registró el morfo floral de cada individuo y de esta manera se obtuvo la proporción de los morfos florales.

1.2.2 Morfología floral.

Para caracterizar el dimorfismo floral se colectaron 70 flores de 14 individuos y se tomaron las siguientes medidas: i) longitud del tubo de la corola, ii) longitud de los estambres (de la base de la corola hasta la punta de las anteras) iii) longitud del estilo (desde la base del estilo hasta la punta de los lóbulos) y iv) se contó el número de granos de polen por antera en un microscopio estereoscópico.

1.2.3 Antesis.

Para conocer el periodo de antesis (apertura y duración de flores) de P. faxlucens, se hicieron observaciones de flores durante el día y la noche. Se consideró que una flor comenzaba a abrir cuando los segmentos de la corola empezaban a expandirse.

1.2.4 Producción de néctar.

Con el propósito de estimar la producción de néctar de flores de P. faxlucens se empleó la siguiente metodología: Se trabajó durante cinco días (entre el 12 y 18 de abril de 1987). Se aislaron botones florales que estuvieran a punto de abrir con bolsas de malla fina (gasa o tul) para asegurar que ningún polinizador o ladrón de néctar visitara la flor. Esto se hizo con los dos tipos de flores, pin y thrum. Posteriormente, se colectaron flores ya abiertas a diferentes horas (09:30 , 10:00 , 18:30 y 19:20 hrs.). Se colectaron de 2 a 10 flores para cada morfo y para cada hora. Se extrajo el néctar acumulado con micropipetas calibradas de 5 microlitros. La concentración de azúcar fue medida con un refractómetro de campo (Erma Mod 400 A). La cantidad de azúcar por flor fue calculada siguiendo el método propuesto por Cruden et al. 1983. Esta cantidad está dada en miligramos y es el producto del volumen, la concentración y un

factor de corrección. Este factor de corrección fue propuesto por Cruden y Hermann (1982) en Cruden et al. (1983) y está determinado por la ecuación de regresión $Y = 0.0046 X + 0.9946$, en donde X es la concentración.

1.2.5 Proporción polen-óvulos.

Se hicieron evaluaciones de las proporciones de polen/óvulos para tener más elementos que permitan determinar el sistema reproductivo de P. faxlucens.

Las proporciones polen/óvulo fueron determinadas dividiendo el número de granos de polen por flor entre el número de óvulos por flor (Cruden, 1977). Se contaron el número de granos de polen de 20 flores de cada morfo. El número de óvulos se calculó de una muestra de 150 frutos de cada morfo. Se contó el número de semillas y abortos por fruto. La suma de la semillas y de los abortos corresponde al número de óvulos.

1.2.6 Polinizaciones controladas.

En abril de 1988 se realizaron polinizaciones controladas con el propósito de precisar el sistema reproductivo de P. faxlucens. Se llevaron a cabo tres tratamientos diferentes que se describen a continuación. Se utilizaron botones florales previamente embolsados para evitar cualquier contaminación de polen. Después de realizar los tratamientos las flores se mantuvieron embolsadas hasta verificar la producción de frutos. Los individuos empleados en estos tratamientos son algunos de los marcados en los sitios de estudio.

a) Tratamiento I. Autopolinización (Autogamia)

Para este caso, el polen de los estambres de una flor es depositado en su propio estigma. Se autopolinizaron 38 flores de morfo pin en 9 individuos y 38 flores del morfo thrum en 10 individuos.

b) Tratamiento II. Polinización Intramorfo (Xenogamia).

Consistió en acumular polen de un tipo de morfo proveniente de varios individuos; con ésta mezcla de polen, se polinizaron flores del mismo morfo. El tratamiento se hizo con 52 flores pin de 9 individuos y 52 flores thrum de 10 individuos.

c) Tratamiento III. Polinización Inter-morfo (Xenogamia).

Se colectó polen de varios individuos de un tipo de morfo y se depositó en flores con morfo diferente al polen colectado, es decir, polen thrum sobre estigmas pin y viceversa. Para este caso, se hicieron tratamientos en 100 flores colectadas de 22 individuos pin y en 100 flores de 23 individuos del morfo thrum.

1.2.7 Movimiento del polen.

Para estimar el movimiento del polen entre las flores de P. faxlucens, se utilizaron dos métodos: el primero consistió en contar el número de granos de polen presentes en los estigmas de cada tipo de flor. Dentro de este método se realizaron dos tipos de muestreo, primero se tomó una muestra de flores que permanecieron expuestas a los polinizadores por un día. La segunda muestra fueron flores expuestas a los polinizadores por dos días. El segundo método fue aplicar polvos fluorescentes a las anteras de flores recién abiertas de ambos morfos florales. El movimiento de los polvos proporciona una idea aproximada del patrón de movimiento del polen en las plantas (Linhart 1973; Stockhouse 1976). Al día siguiente, se colectaron 10 flores de todos los individuos vecinos que se encontraban alrededor de las plantas con las flores marcadas con polvos fluorescentes. Se registró la distancia a la cual se encontraron flores con polvo.

1.2.8. Visitantes florales.

Para conocer a los visitantes y posibles polinizadores de P. faxlucens, se hicieron observaciones directas de las visitas a las flores los días 12 y 13 de abril de 1987 de 7:00 am a 2:00 pm, y de 4:00 pm a 12:00 pm.

1.3 Colecta de semillas.

En noviembre y diciembre de 1987 se colectaron frutos de los individuos marcados en los dos sitios de estudio. Posteriormente se sembraron 10-15 semillas por familia, en bolsas de polietileno de 15 x 30 cm con suelo de la selva y se colocaron en un invernadero dentro de la selva. En total se sembraron 26 familias por sitio. Una familia la constituye el conjunto de semillas colectadas por individuo. Esto se hizo con el fin de obtener las plántulas para su posterior análisis electroforético.

2. Trabajo de Laboratorio.

Una vez que las plántulas alcanzaron un tamaño aproximado de 20-30 cm de altura y que hubieron desarrollado el primer par de hojas (6 meses después aproximadamente) se trasladaron al laboratorio.

2.1 Electroforesis.

Se realizaron electroforesis en geles de almidón horizontal. La electroforesis permite la separación de proteínas extraídas del tejido de los organismos, bajo la influencia de una carga eléctrica. La separación de las enzimas resulta de la interacción entre la corriente eléctrica, el pH del gel y el pH del buffer del electrodo del recipiente (Prakash et al. 1969; Gottlieb 1977; Conkle et al. 1982; Richardson et al. 1986). A continuación se hará una breve descripción de la metodología de electroforesis, tomada y modificada ligeramente de las técnicas empleadas por: Piñero (1982), Vallejos (1982), Soltis et al., (1983), González de León (1985), Richardson et al., (1986) y Piñero y Eguiarte (1988).

2.1.1. Sistemas de buffers.

Se usaron dos sistemas de buffers para los geles y las charolas (electrodos). El sistema I (Histidina), es un sistema continuo lo cual quiere decir que el pH del buffer del gel es igual al pH del buffer de charola (pH = 7.0). Para este buffer se usa una corriente constante de 60 miliamperios. El sistema II (Poulik) es discontinuo y en éste el pH del buffer del gel es diferente del pH de buffer de charola (pH del gel = 8.1; pH de charola = 8.6). Una corriente constante de 270 voltios es usada para estos buffers. El procedimiento para la preparación de los buffers se describe en el apéndice I.

2.1.2 Preparación del gel.

Los geles fueron preparados con almidón hidrolizado especial para electroforesis (Sigma No. S-4501). Para cada gel se usaron 60 gr. de almidón (12%) disuelto en 500 ml del buffer del gel. Se mezclan vigorosamente e inmediatamente después se pone a hervir sin dejar de agitar. Se deja hervir durante 3-5 min., se retira del fuego y se coloca en la bomba de vacío para eliminar todas las burbujas de aire. Se vacía en los moldes de acrílico, dejándose 30 min a temperatura ambiente, luego 30 min en el

refrigerador y posteriormente toda la noche a temperatura ambiente tapado con plástico delgado ("Egapack" o "Kleenpack") para evitar la desecación. Al día siguiente se refrigera mientras se preparan las muestras.

2.1.3. Homogenado de las muestras.

El objeto de la homogenización es la ruptura de las células del tejido para liberar las enzimas. El homogenado se hizo con una porción de 1 cm (aproximadamente) de tejido foliar fresco, el cual se maceró manualmente con 0.5 ml de buffer del gel. Cada muestra consistió de un papel ("wick") para cromatografía Whatman No. 17 de 15 x 4 mm saturado con líquido derivado del tejido foliar macerado y el buffer del gel.

2.1.4. Aplicación de las muestras al gel y electroforesis.

Una vez que se tuvieron las muestras homogenizadas se sacaron los geles del refrigerador y se removió la cubierta de plástico. Se hizo un corte a aproximadamente 4 cm del origen del borde catódico. Las dos porciones del gel se separaron y se colocaron 22 muestras con unas pinzas de tal manera que no quedaran muy pegadas entre ellas. Después se unieron las dos porciones del gel. Para seguir la migración de la muestra en el gel se agregaron en los extremos de éste, dos wicks embebidos en una solución de amaranto (colorante).

Los geles se colocaron en las charolas que contenían el buffer de charola. El gel se colocó de tal manera que el origen quedó hacia el lado de la conexión catódica. Se pusieron las esponjas en contacto con la superficie del gel y con el electrodo, una a cada lado. Estas charolas fueron colocadas dentro del refrigerador y conectadas a las fuentes de poder para dejar pasar corriente durante 15-20 min. El tipo de corriente depende del sistema que se esté trabajando. Posteriormente se apagaron las fuentes de poder y se removieron las muestras. Se unieron bien las dos porciones del gel, sin dejar burbujas de aire entre ellas, se colocaron las esponjas, el plástico delgado, y por último, una bolsa con hielo para evitar que se sobrecalentaran y resecaran los geles. Se dejó correr hasta que la muestra de amaranto migró 9 cm. a partir del origen. Para el caso de Histidina, se dejó correr entre 4-4.5 hrs. y Poulík corrió 3-3.5 hrs.

2.1.5 Tinción de los geles.

Después de que terminó la electroforesis, los geles son cor-

tados horizontalmente en 7 rebanadas. Se colocó una rebanada por cada enzima que se tiñó en cajas de tinción con sus respectivas soluciones para teñir. Las soluciones de tinción contienen sustratos específicos y las enzimas de las muestras actúan junto con esos sustratos y producen una reacción (Gottlieb 1977; Conkle et al. 1982).

Previamente se prepararon los buffers de tinción y soluciones de tinción. En el apéndice I se encuentran las recetas de las enzimas ensayadas.

El tiempo que deben de permanecer los geles con las soluciones y las condiciones de luz, oscuridad y temperatura, dependen de los requerimientos específicos de cada enzima (ver apéndice I).

Después de la tinción, los geles se fijaron en una solución de alcohol al 50 % en agua.

2.1.6. Interpretación de geles.

Cada banda producida por un individuo en un gel teñido para una enzima dada, representa una ISOENZIMA. Los fenotipos de las isoenzimas pueden ser considerados como alternativos para un loci (ALOENZIMA).

Para un locus dado, el número de bandas varía entre individuos homocigos y heterocigos, y también varía dependiendo de la estructura cuaternaria de la enzima, es decir, si es monomérica los individuos homocigos presentan una banda (esto es porque consiste de una sola subunidad polipeptídica) y los heterocigos dos bandas; si es dimérica los heterocigos presentan tres bandas (dos polipeptidos diferentes); si es tetramérica entonces los heterocigos tienen 5 bandas.

Se asignó el número 1 al loci que haya tenido migración anódica menor, número 2 al siguiente y así sucesivamente. Para identificar los alelos el criterio fue el mismo, esto es, alelo 1 a la banda que está más cerca del borde catódico y así sucesivamente.

Análisis de datos.

La variación genética se estimó con las medidas generalmente usadas para tal propósito: 1) proporción de loci polimórfico (P), 2) heterocigosis promedio esperada por locus individual (H), 3) heterocigosis promedio total por loci (Ht), 4) número de alelos por locus (A) y 5) número de alelos efectivo (Ae) (Hedrick 1983;

Futuyma 1986; Nei 1987).

1) Proporción de loci polimórficos (P). Generalmente un locus se considera polimórfico cuando el alelo más común presenta una frecuencia menor a 0.95 o 0.99 (Nevo 1978; Brown y Moran 1981; Hamrick et al. 1981; Hedrick 1983; Futuyma 1986; Nei 1987). Toma valores de 0 (ningún loci es polimórfico) a 1 (todos los loci son polimórficos). Se obtiene de la siguiente manera:

$$P = x/m$$

donde x es el número de loci polimórfico y m es el número total de loci muestreados.

2) Heterocigosis o diversidad genética. Es la heterocigosis promedio esperada en equilibrio Hardy-Weinberg, se calcula de la siguiente manera:

$$H = 1 - \sum P_i^2$$

donde P_i es el promedio de las frecuencias alélicas. Toma valores de 0 (cuando no hay variación) a 1 (cuando se tiene un número infinito de alelos por loci). Este estimado es el más utilizado y menos subjetivo, además de que se conoce mejor su estadística. La heterocigosis promedio multilocus (H) para n locus, es el promedio de la heterocigosis por locus sencillo y se calcula:

$$H = \frac{\sum_{j=1}^n h_j}{n}$$

donde h_j es la heterocigosis para el j-ésimo locus (Nei 1987). Cuando el tamaño de la población es pequeño, se usa una ecuación corregida (Nei 1987):

$$H = \frac{2N \left(1 - \sum_i^n p_i^2 \right)}{2N - 1}$$

En el caso de multilocus sería:

$$\bar{H} = \left(\sum_{j=1}^r h_j \right) / r$$

donde h_j es la diversidad genética para el j-ésimo locus y r es el número de loci

3) Número promedio de alelos por locus y número de alelos efectivo. El número de alelos es el promedio simple de alelos por locus, y el número efectivo de alelos es el inverso de la homocigosis teórica (Nevo 1978; Brown y Moran 1981; Hamrick et al., 1981; Loveless y Hamrick 1987).

$$N_e = 1 / \sum_{i=1}^k p_i$$

donde p_i es la frecuencia del alelo i en la población. De esta manera N_e toma en cuenta no sólo el número de alelos en un locus, sino también sus frecuencias relativas.

Para determinar niveles de variación genética dentro y entre poblaciones, se pueden utilizar los índices de Nei (1973, 1987), éstos son:

Hs: es la proporción de diversidad genética compartida entre las poblaciones.

Dst: mide la diferenciación genética entre las poblaciones

Ht: es la diversidad genética total

Para cada subpoblación (o sitio de estudio) se calcularon las frecuencias alélicas, las frecuencias genotípicas y el índice de fijación con un programa en turbo pascal elaborado por G. Coello y A. Escalante (1989), basado en las fórmulas no sesgadas de Nei (1987). Estos parámetros se obtuvieron para un locus sencillo (dos alelos) y multilocus (más de dos loci). Se calcularon los intervalos de confianza al 95% con una aproximación a la normal y $Z(0.05) = 1.96$ (Richardson et al 1986) de las frecuencias alélicas. Además se compararon las frecuencias entre los sitios de estudio con una prueba de Chi-cuadrada de heterogeneidad de varianzas (Hedrick 1983).

Una manera de describir la estructura genética de las poblaciones es usando los índices de fijación de Wright (1951; 1965, 1969 en Nei 1987). Estos índices miden cuánto se desvían las frecuencias genotípicas de una población subdividida de lo que se espera al azar. Consisten en tres diferentes coeficientes que describen la diferenciación a nivel local y total y son F_{is} , F_{it} y F_{st} . Además permiten separar las posibles causas de la diferenciación genética de las poblaciones, las cuales pueden ser deriva génica (F_{is}), consanguinidad, flujo génico y selección natural (F_{st}).

Los tres coeficientes están relacionados entre ellos, mediante la siguiente expresión:

$$F_{st} = \frac{F_{it} - F_{is}}{1 - F_{is}}$$

Fis. Índice de fijación de un individuo relativo a la subpoblación. Fis mide la desviación en un individuo en una población. Toma valores entre -1 y +1. Si es negativo significa que hay un exceso de heterocigotos y puede deberse principalmente a selección a favor del heterocigoto. Si es de 0 quiere decir que la población está en equilibrio de Hardy-Weinberg. Valores de Fis positivos indican una deficiencia de heterocigotos, si es de 1 quiere decir que todos los individuos son homocigotos y los alelos vienen de un ancestro común. Estos valores pueden deberse a autopolinización, consanguinidad por apareamiento entre parientes, por el efecto de Wahlund y por selección a favor de homocigotos.

Considérese una población dividida en s subpoblaciones en donde no necesariamente hay equilibrio Hardy-Weinberg. Se tienen los alelos A_1 y A_2 en donde p_k y F_{is_k} es la frecuencia del alelo A_1 y el índice de fijación en la subpoblación k, respectivamente. La frecuencia del homocigoto A_1A_1 en la subpoblación k (D_k) está dada por $D_k = p_k^2 + F_{is_k} p_k (1-p_k)$, entonces:

$$F_{is_k} = \frac{D_k - p_k^2}{p_k (1-p_k)}$$

El índice de fijación para todas las subpoblaciones es:

$$F_{is} = \frac{\bar{D} - \bar{p}^2}{p - \bar{p}^2}$$

donde $\bar{D} = \sum w_k D_k$ es la frecuencia ponderada de A_1A_1 en la población total; $\bar{p} = \sum w_k p_k$ es la frecuencia ponderada del alelo A_1 en la población total, $\bar{p}^2 = \sum w_k p_k^2$ y $w_k = 1/s$ ($s = \#$ de subpoblaciones).

Fit. Índice de fijación de los individuos respecto al total de la población. Es el total de la diferenciación que se tiene en una población, respecto al equilibrio Hardy-Weinberg. Toma valores de -1 a +1. Valores negativos indican exceso de heterocigotos que puede ser por selección natural a favor de ellos, valores positivos indican exceso de homocigotos y puede ser debido a deriva génica y/o endogamia. Si el valor es de 0, nos indica un tamaño efectivo de población grande y alto flujo génico (Fit resume la información de Fis y Fst). Fit se calcula de la

siguiente manera:

$$Fit = \frac{\bar{D} - \bar{p}^2}{\bar{p}(1-\bar{p})}$$

y la frecuencia del genotipo A_1A_1 en la población total es expresada como:

$$\bar{D} = (1 - Fit)\bar{p}^2 + Fit \bar{p}$$

Fst es el índice que mide la diferenciación genética de las subpoblaciones. Siempre toma valores positivos que van de 0 a 1. Cuando es de 0 indica que todas las subpoblaciones de la población total son iguales. Si es de 1 todas las subpoblaciones son distintas. Fst es el resultado de los efectos de la deriva génica y/o selección natural. Valores altos de Fst indican que está actuando la deriva génica o la selección natural. Si es por selección natural se espera que diferentes alelos tengan diferentes valores de Fst en las subpoblaciones y si es por deriva, los valores de Fst deberían ser iguales. Fst se estima de la siguiente manera (Hedrick 1983):

$$Fst = \frac{\overline{p^2} - \bar{p}^2}{\bar{p}(1-\bar{p})}$$

Fst también se define, indirectamente, como:

$$Fst = \frac{Fit - Fis}{1 - Fis}$$

Fst es el equivalente de Gst utilizado por Linhart et al. 1981 y Nei (1987).

Nei (1987) desarrolló los estadísticos F para loci multialélicos en términos de la heterocigosis observada dentro de las subpoblaciones, así tenemos:

$$Fis = (\bar{H}_s - \bar{H}_o) / \bar{H}_s$$

$$Fit = (\bar{H}_t - \bar{H}_o) / \bar{H}_t$$

$$Fst = (\bar{H}_t - \bar{H}_s) / \bar{H}$$

en donde \bar{H}_o es el promedio de la heterocigosis observada dentro de una subpoblación. \bar{H}_s es el promedio de la heterocigosis esperada en las subpoblaciones y \bar{H}_t es la heterocigosis esperada promedio en la población total.

Dado que los estadísticos F deben estimarse a partir de un muestreo, entonces, se debe tomar en cuenta el error de muestreo. Nei (1987) desarrolló las estimaciones no sesgadas para los índices de fijación y son:

$$\hat{H}_o = 1 - \sum_{k=1}^s \sum_{i=1}^m Dk_{ii}/s$$

(m = # de alelos y s = # de subpoblaciones)

$$\hat{H}_s = \frac{x}{x-1} \left[\frac{1 - \sum_{k=1}^s p^2_{ki} - H_o}{2x} \right]$$

donde $\overline{p^2_{ki}} = \sum_{i=1}^s p^2_{xi}/s$ que es el promedio del cuadrado de las

frecuencias alélicas calculadas en cada subpoblación y x es la media armónica del tamaño de muestra usado en cada subpoblación. Por lo tanto, las estimaciones no sesgada de los índices de fijación están dados por:

$$\hat{F}_{is} = (1 - \hat{H}_o) / \hat{H}_s ; \quad \hat{F}_{it} = (1 - \hat{H}_o) / \hat{H}_t ; \quad \hat{F}_{st} = (1 - \hat{H}_s) / \hat{H}_t$$

La estimación de los índices de fijación antes descritos se hizo mediante un programa de turbo pascal basado en las fórmulas propuestas por Nei (1987). Para evaluar la probabilidad de que el índice de fijación (F), F_{is} y F_{it} fueran diferentes de 0, se usó la prueba $X^2 = F^2 N$ con $a(a-1)/2$ grados de libertad. Donde N es el tamaño de la muestra y a el número de alelos. Para F_{st} se usó una $X^2 = 2NF_{st}$ con $(a-1)(s-1)$ grados de libertad, donde s es el número de subpoblaciones (Hedrick 1983).

La tasa de fecundación cruzada se estimó con el programa MLT de Ritland (1988), basado en el algoritmo de Ritland y Jain (1981). Para estimar el error estándar se utilizaron 50 iteraciones.

V. RESULTADOS

1. Biología Floral y Sistemas Reproductivos.

1.1. Resultados de la distribución y estructura de la población de P. faxlucens

Los análisis de distribución y estructura se hicieron sólo con aquellos individuos que presentaron una altura mayor de 50 cm (juveniles y adultos). En el sitio I se encontraron 82 individuos , mientras que en el sitio II se encontraron 37 individuos (Tabla 5.1.1). En estos sitios están incluidos los individuos reproductivos del estudio genético.

Se estimaron las medias y las varianzas a partir del número de individuos presentes en cada cuadro de 10 x 15 m en los dos sitios. Cada sitio lo constituye una parcela de 10 cuadros. Posteriormente se calcularon los cocientes varianza/media y se probaron estadísticamente con una prueba de t ($t = (\text{observado} - \text{esperado}) / \text{error estándar}$) para ver si son significativamente diferentes de 1 (o que los valores observados difieren del azar). Estos resultados se muestran en la Tabla 5.1.1. En el sitio I se encontró un cociente de 6.84, que fue significativamente diferente de 1, lo cual indica un patrón agregado. Cabe mencionar que en este sitio hubo mayor frecuencia de juveniles, los cuales se encontraban en un claro dentro de la selva. El sitio II mostró un cociente de 0.31 y no fue significativamente diferente de 1, lo cual sugiere que los individuos se encuentran distribuidos al azar.

En la figura 5.1 se presenta los histogramas de frecuencias de diámetros de las dos poblaciones estudiadas. En los dos sitios los individuos más grandes alcanzan diámetros hasta de 16 cm. En el sitio I se observa que la categoría de 0 a 2 cm es la mejor representada, mientras que en el sitio II, la categoría con más individuos fue la de 12 a 14 cm. Se realizó una prueba de Kolmogorov-Smirnov (Zar 1984) para ver si hay diferencias en la distribución de frecuencias de diámetros de los individuos en los dos sitios de estudio y se encontró que si hay diferencias significativas entre sitios (D. obs. = 0.379; D. máx (0.05) = 0.269).

Estos datos de distribución y estructura de la población de P. faxlucens, nos indican, de manera general que existen diferencias en las características estructurales de los sitios estudiados y además la especie parece estar favorecida por los claros para su desarrollo.

Tabla 5.1.1. Patrón de distribución de individuos mayores de 50 cm de altura de Psychotria faxlucens en Los Tuxtlas, Ver., mayores de 50 cm de altura y censados en diciembre de 1987. Análisis basado en el cociente varianza/media para el sitio I y II. Cada parcela está constituida de 10 cuadros de 10 x 15 m cada uno.

Sitio	Parcela	Ind./Cuadro X ± E.E.	Cociente V/M	t	Patrón
I	750 m ²	16.4 ± 10.5	6.84	8.25 (P<0.001)	Agregado
II	750 m ²	7.4 ± 1.5	0.31	0.97 (n.s.)	Azar

1.2 Proporción de morfos.

La proporción de morfos florales en los dos sitios fue prácticamente idéntica (Tabla 5.1.2). Para el sitio I el cociente fue de 1.17:1.0 del morfo thrum respecto al morfo pin y para el sitio II fue de 1.0:1.0. Se hizo una prueba de Chi-cuadrada para cada sitio y se observa que no hay diferencias significativas en las proporciones relativas de los dos morfos.

Tabla 5.1.2. Proporción de morfos entre poblaciones de individuos reproductivos en diciembre de 1987 de Psychotria faxlucens en Los Tuxtlas, Ver.

Sitio	Total Ind.	Ind. Reprod.	Morfo Pin	Morfo Thrum	Cociente Pin/Thrum	X ²
I	82	26	12	14	1.17	0.153 (n.s.)
II	37	26	13	13	1.0	0.000 (n.s.)
Total	119	52	25	27	1.08	0.000 (n.s.)

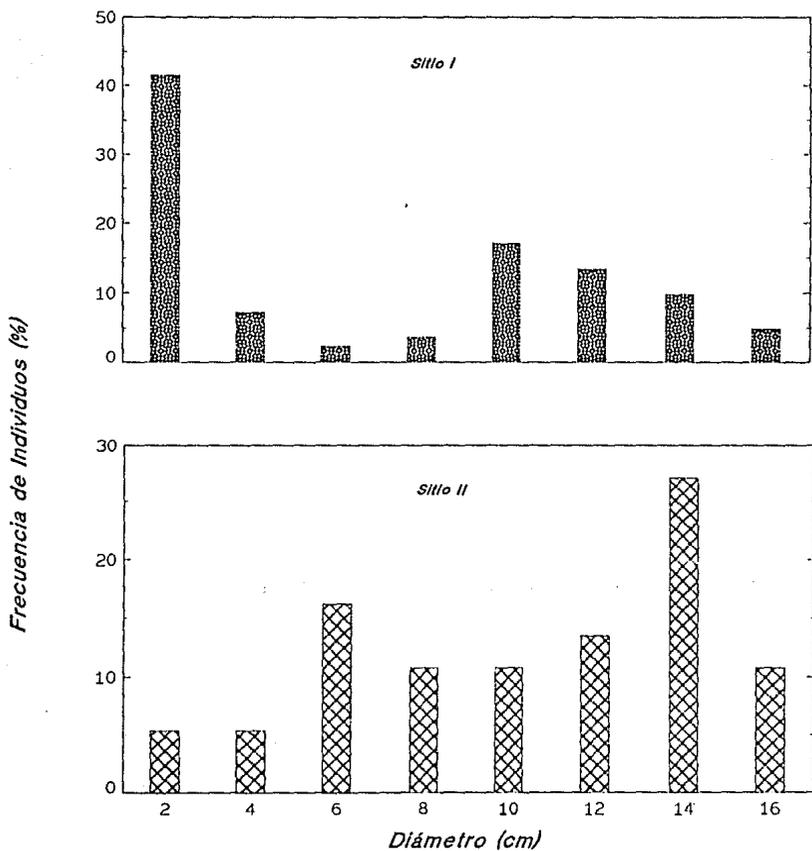


Fig. 5.1. Distribución de frecuencia de diámetros de individuos de Psychotria faxlucens mayores de 50 cm de altura, en los sitios de estudio I (n=82) y II (n=37) en LosTuxtlas, Ver. en 1987.

1.3 Morfología floral.

Las flores de *P. faxluceus* son blancas, glabras, tubulares. con fuerte aroma dulce al anochecer, corola de 2 a 4 cm de largo, 5 estambres de 3.3 a 4.0 cm y estilo de 2-4 cm. De acuerdo con estas características, la especie entra en el grupo de plantas con síndrome de polinización por esfíngidos.

La longitud de los estilos fue significativamente diferente ($t = 11.94$ $P = 0.000$) entre los dos morfos. Los estilos del morfo pin fueron más grandes ($X = 3.97 \pm 0.47$) que el morfo thrum ($X = 2.80 \pm 0.32$) (Fig. 5.2). Las anteras y los estigmas están localizados recíprocamente en los dos tipos de flores, es decir, la altura del estigma pin corresponde a la altura de las anteras de flores thrum y viceversa. Se compararon los promedios de la longitud de los estilos de flores pin con los promedios de longitud de estambres de flores tipo thrum y no se encontraron diferencias significativas ($t = 2.44$ $0.01 < P < 0.02$). Asimismo se compararon los promedios de longitudes de los estilos de flores thrum respecto a los estambres de flores pin, los cuales fueron similares ($t = 2.39$ $0.01 < P < 0.02$).

Los estambres de las flores thrum son más grandes que los estambres del morfo pin (thrum $X = 3.06 \pm 0.61$; pin $X = 2.43 \pm 0.42$), esta diferencia fue estadísticamente significativa (Fig. 5.3).

La longitud del tubo de la corola es ligeramente más grande en flores thrum que en flores pin, sin embargo, no hubo diferencias significativas ($t = 2.62$ $0.01 < P < 0.02$). El ancho del tubo de la corola, también fue más grande en thrum que en pin, y la diferencia fue estadísticamente significativa ($t = 4.00$ $P = 0.001$).

Las anteras de flores pin contenían más granos de polen ($X = 959.5 \pm 162.95$) que las anteras de flores thrum ($X = 665.5 \pm 217.93$) (Tabla 5.1.3). Las flores pin producen más granos de polen que las flores thrum por un factor de 1.4.

Tabla 5.1.3 . Características florales de dos morfos de individuos de Psychotria faxlucens.

Medidas	N	$\bar{X} \pm D. E.$	t	P
Longitud Estilo (cm)				
Pin	35	3.97 \pm 0.47		
Thrum	35	2.80 \pm 0.32	11.94	P<0.001
Longitud Estambre (cm)				
Pin	35	2.47 \pm 0.42		
Thrum	35	3.06 \pm 0.61	4.57	P<0.001
Longitud Corola (cm)				
Pin	35	3.21 \pm 0.46		
Thrum	35	3.56 \pm 0.59	2.62	0.01<P<0.02
Ancho tubo de la Corola (cm)				
Pin	35	0.20 \pm 0.05		
Thrum	35	0.26 \pm 0.06	4.00	P<0.001
No. de Granos de Polen/Antera				
Pin	20	959.5 \pm 162.95		
Thrum	20	665.5 \pm 217.93	4.79	P<0.001

1.4 Antesis

No se observaron diferencias entre morfos en el periodo de antesis. Las flores comienzan a abrir al anochecer (1800 hrs), y se mantienen abiertas durante 15 hrs en promedio, después de este tiempo comienzan a caerse (a las 1500 hrs del día siguiente).

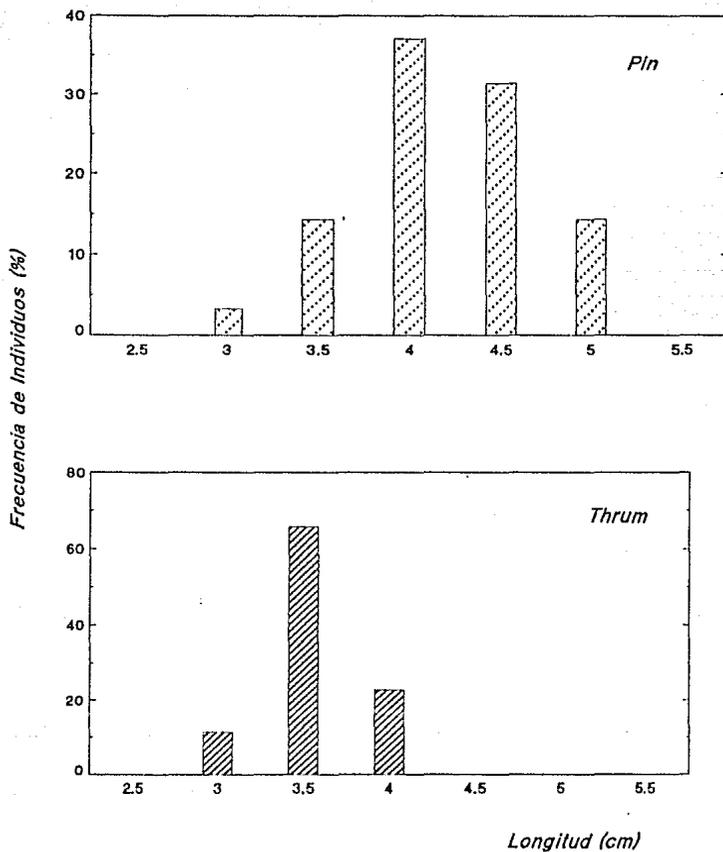


Fig. 5.2. Distribución de frecuencia de la longitud de estilos de flores Pin (n=35) y flores Thrum (n=35) de Psychotria laxilucens en Los Tuxtlas, Ver. en 1987.

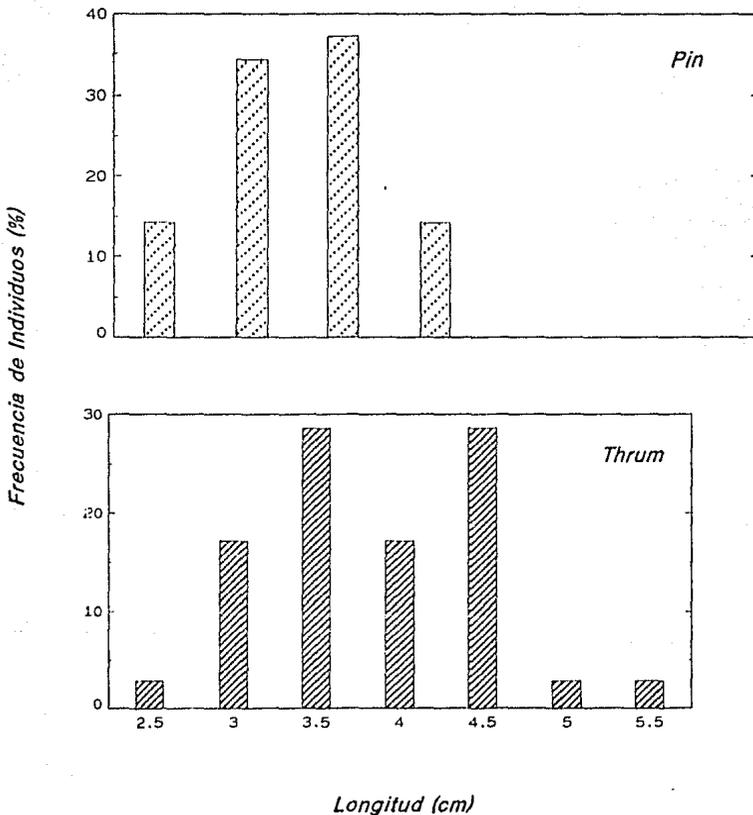


Fig. 5.3. Distribución de frecuencia de la longitud de estambres de flores Pin (n=35) y flores Thrum (n=35) de Psychotria faxlucens en Los Tuxtlas, Ver. en 1987.

1.5 Producción de néctar y polinizadores.

En relación a las mediciones de la producción de néctar, se observa que entre las 9 y 10 de la mañana se encuentra la máxima cantidad acumulada en los dos tipos de flores. El morfo pin presentó un registro máximo de 8.17 ml y para el morfo thrum fue de 4.6 ml. Respecto a las concentraciones de azúcar en el néctar, la mínima para las flores pin fue de 8% que se presentó entre las 19:00 y 20:00 hrs. y la máxima fue de 20 % que se presentó a las 9:00 y 10:00 horas. Las flores thrum tuvieron una concentración mínima de 6% a las 18:30 y la máxima concentración registrada fue de 20 % a las 10:00 de la mañana. En promedio, las concentraciones para el morfo pin y morfo thrum fueron de 15.9 % y 14.7 %, respectivamente.

La cantidad de azúcar en miligramos presentó un comportamiento similar al volumen a lo largo del día y entre cada morfo. Las flores pin presentaron la máxima cantidad a las 9:30 de la mañana, y las flores thrum a la 10:00 hrs. Los promedios de estos valores en las diferentes horas se muestran en la Tabla 5.1.4.

Se realizó un análisis de varianza con los datos de volumen, concentración y contenido de azúcar para comparar entre horas y entre morfo estas características. No se encontraron diferencias significativas entre morfos en la producción de néctar ($F = 1.59$, $P = 0.215$), ni en la concentración ($F = 2.99$, $P = 0.091$) ni en el contenido de azúcar ($F = 2.21$, $P = 0.145$). Sin embargo, la interacción entre morfo y hora respecto al volumen fue significativa ($F = 4.69$, $P = 0.0072$) lo que indica que el volumen del néctar varía en el tiempo de diferente manera para cada morfo.

Por otro lado, se realizó un análisis de correlación entre el volumen y el contenido de azúcar del néctar y se observó que el azúcar está altamente correlacionado con el volumen ($F = 342.65$, $P = 0.00000$; $r = 0.943$). También se hizo un análisis de regresión entre la concentración y el volumen y mostró que el volumen sólo explica el 31.73 % de la variación en la concentración ($F = 19.52$, $P = 0.00007$; $r = 0.563$).

Se observaron pequeños esfíngidos, principalmente del género Xilophanes, (A. Ibarra, com. per.) y polillas pequeñas que visitan las flores durante la noche. Las visitas durante el día corresponden al colibrí Campylopterus sp.

Por otro lado, se encontró una gran cantidad de flores mordidas en la base. Los responsables de estos daños son la abeja carpintera Xilocopa nertrama (L. Eguarte, com. per.) y algunos escarabajos pequeños. Esto nos sugiere que son ladrones de néctar y no polinizadores.

1.6 Proporción polen/óvulos.

Las proporciones polen/óvulos encontradas en P. faxlucens fueron de 477.3±79.9 del morfo pin y 392.8±108.9 del morfo thrum. El morfo pin mostró una proporción significativamente mayor que el morfo thrum ($t = 4.83$ $P < 0.001$). Parece que el factor que principalmente afecta al cociente P/O es el número de granos de polen por flor y no el número de óvulos/ovario, ya que el número de óvulos por flor es de 2 y fue constante para los dos morfos florales.

Tabla 5.1.4. Cambios en el volumen, concentración y contenido de azúcar del néctar, registrados en 5 días de abril de 1987, en flores distilicas de Psychotria faxlucens en Los Tuxtlas, Ver.

	HORA	PIN		THRUM	
		$\bar{X} \pm D.E.$	N	$\bar{X} \pm D.E.$	N
Volumen (ml)	1830	1.41±0.99	3	0.52±0.53	3
	1920	1.99±0.83	4	2.33±1.03	5
	0930	4.84±2.54	5	1.45±0.90	5
	1000	2.12±1.02	8	2.78±1.25	11
Concen- tración de néctar (%)	1830	6.66±5.73	3	5.33±4.10	3
	1920	15.0±4.58	4	12.1±3.92	5
	0930	13.2±1.72	5	10.0±2.0	5
	1000	15.9±2.34	8	14.7±3.76	11
Contenido de azúcar (mg)	1830	0.14±0.12	3	0.05±0.04	3
	1920	0.32±0.14	4	0.30±0.19	5
	0930	0.71±0.43	5	0.16±0.13	5
	1000	0.37±0.19	8	0.43±0.23	11

1.7 Polinizaciones controladas.

No hubo producción de frutos por autopolinización en ninguna flor de los dos morfos (Tabla 5.1.5). La producción de frutos

por cruzas "ilegítimas" (entre el mismo morfo) fue significativamente menor en los individuos pin ($X^2 = 4.8$, $P < 0.025$) que en los individuos thrum .

La producción de frutos por cruzas entre morfos (cruzas legítimas), se incrementó respecto a la producción de frutos del tratamiento intramorfo, este aumento fue estadísticamente significativo ($X^2 = 17.09$ $P < 0.001$). En cuanto a las polinizaciones cruzadas para cada tipo de flor, el morfo thrum presentó mayor producción de frutos (45%) cuando es polinizado por flores del morfo pin , sin embargo, esta producción no es significativamente más grande que en el caso de las flores pin (producción de 40%) que son polinizadas por polen thrum.

Tabla 5.1.5. Resultados de las polinizaciones controladas de Psychotria faxlucens, realizadas en abril de 1988 en Los Tuxtlas, Ver. R significa receptor y D donador de polen.

Tratamiento	No. de Individuos	No. de Flores Polinizadas	Flores con Frutos (%)	X^2
AUTOPOLINIZACION (AUTOGAMIA)				
Pin X Pin (R) (D)	9	38	0	
Thrum X Thrum (R) (D)	10	38	0	
POLINIZACION INTRAMORFO (XENOGAMIA)				
Pin X Pin (R) (D)	9	52	9.6	
Thrum X Thrum (R) (D)	10	52	26.9	4.8*
POLINIZACION INTERMORFO (XENOGAMIA)				
Pin X Thrum (R) (D)	23	100	40.0	
Thrum X Pin (R) (D)	22	100	45.0	1.3
* $P < 0.025$				

1.8 Movimiento del polen.

Se realizó un análisis de varianza para ver si hay diferencias en la cantidad y el tipo de polen que reciben los dos morfos florales (primer método) (Tablas 5.1.6). Se encontró que las flores thrum recibieron más polen thrum que polen pin en los dos días del muestreo. Esta diferencia fue estadísticamente significativa ($F(0.05), 1, 164 = 20.03$ $P < 0.0005$). Respecto al comportamiento entre días, se observa que para el primer día, las flores thrum presentaron más granos de polen de ambos morfos que en el segundo día ($F(0.05), 1, 164 = 9.58$ $P < 0.0023$).

Las flores pin presentaron la misma tendencia en cuanto al polen que reciben tanto en el tipo como entre días. Esto es, reciben más granos de polen pin que polen thrum en los dos días, la diferencia fue altamente significativa ($F(0.05), 1, 170 = 48.42$ $P < 0.0001$). También hubo diferencias significativas en los dos días, el primer día presentaron mucho más polen de los dos morfos que el segundo día ($F(0.05), 1, 170 = 21.19$ $P < 0.0001$).

Tabla 5.1.6 . Número de granos de polen presentes en estigmas de flores pin y thrum de P. faxlucens en Los Tuxtlas Ver. N representa el número de flores muestreadas.

Día	Flor Pin		Flor Thrum	
	$\bar{X} \pm D.E.$	N	$\bar{X} \pm D.E.$	N
15/04/87				
Polen Pin	63.15±59.04	46	11.16±22.87	31
Polen Thrum	10.02±13.99	46	52.84±58.81	31
16/04/87				
Polen Pin	21.09±25.06	41	11.94±13.03	53
Polen Thrum	4.43± 7.13	41	21.35±20.50	53

Asimismo, con los datos del número de granos de polen presentes en cada tipo de flor se realizó una estimación preliminar de la tasa de entrecruzamiento. Las suposición son que los dos tipos de polen se comportan igual, que la especie es autocompatible, que no están ocurriendo fenómenos como competencia entre granos de polen de morfo diferente o bien problemas de

aborción no al azar. Los valores de "t" en la Tabla 5.1.7, nos indican la proporción de granos de polen procedentes de otros individuos del morfo opuesto, esto es, es el resultado de la polinización cruzada intermorfo. El valor "s" representa el polen proveniente de la misma planta más el procedente de otros individuos con el mismo morfo floral. Esta proporción de "s" supone autopolinización más polinización intramorfo, por lo cual se espera encontrar valores altos de esta proporción y no distinga entre autopolinización y polinización cruzada intramorfo, sin embargo si da una idea del movimiento de polen.

Tabla 5.1.7. Tasa de entrecruzamiento a partir del número de granos de polen presentes en flores distílicas de Psychotria faxlucens en Los Tuxtlas, Ver. "s" es el valor de autopolinización más polinización cruzada intramorfo y "t" es el resultado de polinización cruzada intermorfo.

Morfo	No. de Ind.	No. de Flores	Polen	Polen	(s)	(t)
			Pin	Thrum		
			$\bar{X} \pm D.E.$	$\bar{X} \pm D.E.$		
15/04/87						
Pin	10	46	63.1 \pm 59.0	10.0 \pm 13.9	0.73	0.27
Thrum	7	31	11.1 \pm 22.8	52.8 \pm 58.8	0.65	0.35
16/04/87						
Pin	9	41	21.0 \pm 25.0	4.43 \pm 7.13	0.65	0.35
Thrum	11	53	11.9 \pm 13.0	21.3 \pm 20.5	0.28	0.72

Por otro lado, la aplicación de polvos fluorescentes, nos proporcionó una idea de qué tanto se mueven los polinizadores de P. faxlucens. Se encontraron 8 individuos del morfo pin que tenían flores con polvos, la distancia promedio fue de 31.8 (\pm 21.7) metros, y once individuos tipo thrum con una distancia promedio de 51.83 (\pm 48.9) metros. El rango de distancia en el cual se encontraron polvos, fue de 0-150 metros; la mayor frecuencia de flores con polvos se presentó entre 10 y 20 metros (Fig. 5.4).

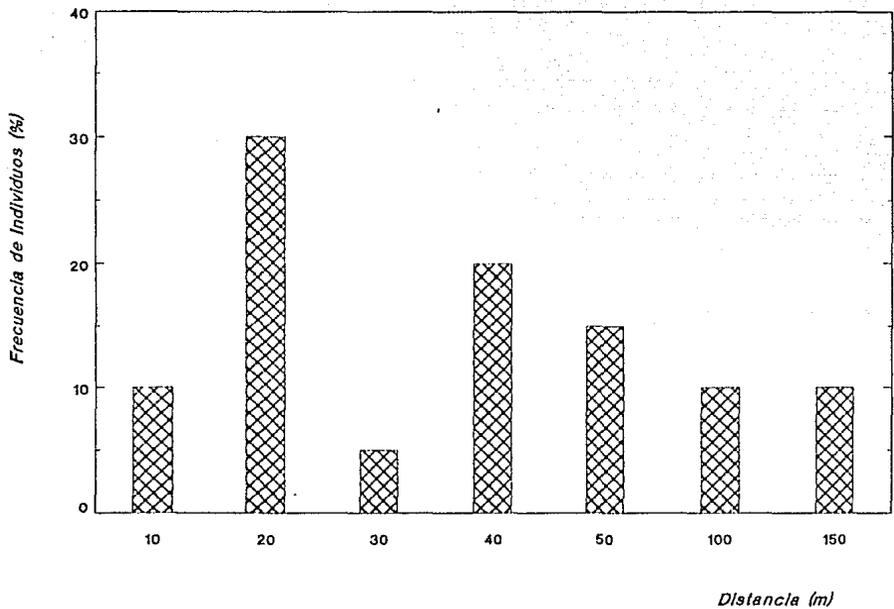


Fig. 5.4 Movimiento del polen de *Psychotria faxlucens* estimado con el método de los polvos fluorescentes en Los Tuxtlas, Ver. en 1987 (el procedimiento se detalla en Materiales y Métodos).

2. Sistemas enzimáticos.

Los análisis genéticos se realizaron con los datos de electroforesis de plántulas provenientes de semillas colectadas en diciembre de 1987. Se ensayaron un total de 16 enzimas, de las cuales 5 no presentaron actividad (ACO, G-6PD, ME, RUB, SDH). De las 11 enzimas con actividad, dos fueron monomórficas (ACPH y APX) para los loci que mejor se expresaron, y 9 fueron polimórficas para un locus. En la Tabla 5.2.1 se presentan los datos del número total de loci monomórficos y polimórficos para cada enzima, así como la estructura cuaternaria y el buffer donde se observó mejor resolución de las enzimas.

El buffer de Histidina (Sistema continuo pH 7.0) fue el más adecuado para la mayoría de las enzimas. Con el buffer de Poulik (Sistema discontinuo pH 8.1 y pH 8.6) presentaron mejor resolución de las enzimas GDH, GOT y PGM.

2.1) Glutamato deshidrogenasa (GDH).

El zimograma de la enzima GDH es ilustrado en la Figura 5.5. Se observaron dos locus (Gdh-1 y Gdh-2). El locus Gdh-1 presentó una sola banda con idéntica migración para todos los individuos, por lo cual se consideró monomórfico. Para el locus Gdh-2, se observaron tres bandas, la banda 1 corresponde al alelo A_1 , la banda tres al alelo A_2 . La banda dos aparece cuando se forma el heterócigo A_1A_2 . En este locus se encontraron los tres genotipos posibles: A_1A_1 , A_1A_2 y A_2A_2 .

2.2) Malato deshidrogenasa (MDH).

En la Figura 5.5 se observan los fenotipos encontrados para esta isoenzima. Se encontraron dos locus, uno monomórfico con poca resolución de las bandas y el otro polimórfico con dos alelos. Los individuos heterócigos presentaron tres bandas y se debe a que la enzima es un dímero con subunidades idénticas y cuando están presentes ambos alelos, las cadenas polipeptídicas forman una tercera banda intermedia (Richardson *et al.* 1986). Los homócigos presentaron una banda.

2.3) 6-Fosfogluconato deshidrogenasa (6-PGD).

En esta enzima se observaron tres locus. El locus 6-Pgd-3 fue monomórfico y el locus 6-Pgd-1 polimórfico con dos alelos.

El tercer locus también fue monomórfico (se observó una sola banda fija) y se encontraba sobrepuesto con el segundo locus, por lo cual los individuos homocigos presentaban dos bandas y los heterocigos tres bandas claramente distinguibles (Fig. 5.5).

2.4) Fosfoglucomutasa (PGM).

La Figura 5.5 muestra el patrón de bandeo encontrado en esta enzima. Puede verse la presencia de dos locus. En el locus Pgm-2 no se observó variación, sólo hubo una banda que migró a la misma distancia para todos los individuos. El locus Pgm-1 fue polimórfico con tres alelos (A_1 , A_2 y A_3). Como es una enzima monomérica, los heterocigos mostraron dos bandas y los homocigos una banda.

2.5) Fosfoglucosa isomerasa (PGI)

Se presentó un locus polimórfico para esta enzima con tres alelos. Las bandas de los individuos heterocigos para los tres alelos no tuvieron buena resolución, por lo cual, el grosor de las bandas fue variable en los diferentes heterocigos. Se observó otro locus (Pgi-2) que fue monomórfico (Fig. 5.5).

2.6) Leucil aminopeptidasa (LAP).

El zimograma encontrado en esta enzima es mostrado en la Fig. 5.5. Se detectaron dos loci, el locus Lap-2 no presentó variación, es decir, fue monomórfico, mientras que el locus Lap-1 mostró variación. En este locus se expresaron tres alelos con el número de bandas típico de una enzima monomérica.

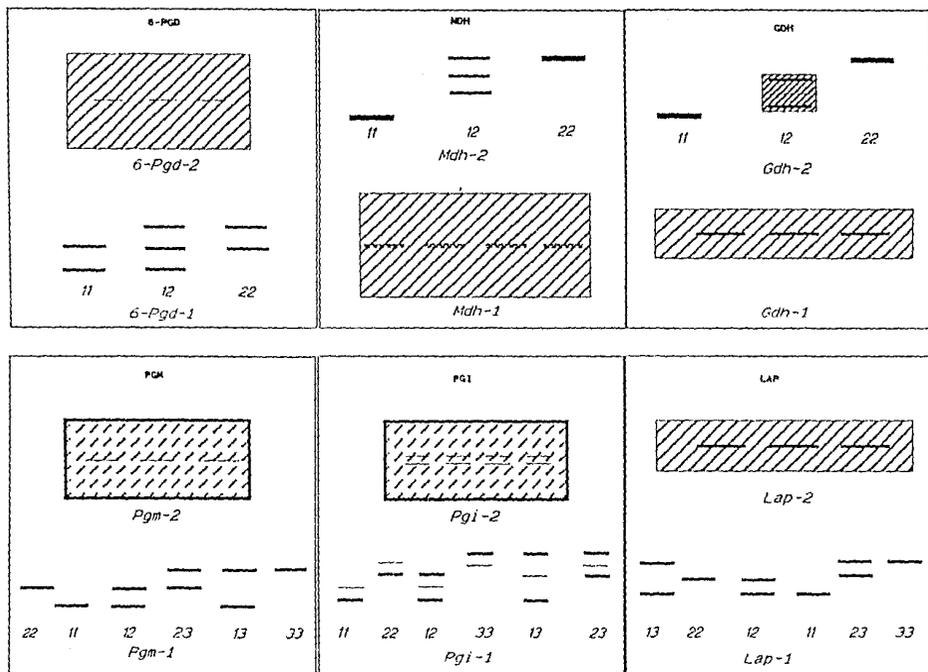


Fig. 5.5. Zimograma de los patrones de variación de las enzimas ensayadas en plántulas de *Psychotria faxlucens* de la selva de los Tuxtlas, Ver. en 1988.

Tabla 5.2.1. Sistemas enzimáticos ensayados en plántulas de *Psychotria faxlucens*. Se presenta el número de loci total por enzima y el número de loci polimórficos. Las letras H y P significan buffer de Histidina y Poulik, respectivamente.

ENZIMA	ESTRUCTURA CUATERNARIA	SISTEMA BUFFER	# DE LOCI	# DE LOCI POLIMORFICOS
ACO	Monómero	H y P	----	----
ACPH	Dímero o Monómero	H	3	1
APX	Monómero	H	3	1
GDH	Dímero	P	2	1
G-6PD	Dímero	H y P	----	----
GOT	Dímero	P	1	0
IDH	Dímero	H	1	0
LAP	Monómero	H	2	1
MDH	Dímero	H	2	1
ME	Tetramero	H y P	----	----
6-PGD	Dímero	H	2	1
PGI	Dímero	H	2	1
PGM	Monómero	P	2	1
RUB	Tetramero	H y P	----	----
SDH	Monómero	H y P	----	----

ACO: Aconitasa (sin actividad)

ACPH: Fosfatasa ácida

APX: Peroxidasa

GDH: Glutamato deshidrogenasa

G-6PD: Glucosa-6 fosfato deshidrogenasa (sin actividad)

GOT: Glutamato oxaloacetato transaminasa

IDH: Isocitrato deshidrogenasa

LAP: Leucil aminopeptidasa

MDH: Malato deshidrogenasa

ME: Enzima málica (sin actividad)

6-PGD: 6-Fosfogluconato deshidrogenasa

PGI: Fosfoglucoisomerasa

PGM: Fosfoglucomutasa.

RUB: Ribulosa-5' difosfato carboxilasa (sin actividad)

SDH: Shikimato deshidrogenasa (sin actividad)

Total de loci: 20

Loci polimórficos: 8

Proporción de loci polimórfico (P): 0.400

Heterocigosis total: 0.198

3. Variación genética enzimática.

Se detectaron un total de 20 loci, de los cuales, 8 fueron polimórficos. El índice de polimorfismo (P) fue de 0.400 (al 95%) en la población total. Los valores para el número efectivo de alelos (Ae) para cada enzima y por sitio se muestran en la Tabla 5.2.2. El número promedio de alelos (A) fue de 2.50 (obtenido de 6 loci polimórficos) y el número efectivo promedio de alelos (Ae) fue muy cercano en los dos sitios de estudio; el sitio I con 2.37 y el sitio II con 2.33. La heterocigosis total (H) fue 0.198 y la heterocigosis promedio esperada (H) fue de 0.495 ± 0.066 .

4. Frecuencias alélicas y heterocigosis.

En las Tablas 5.2.3 y 5.2.4, se muestran las frecuencias alélicas con sus intervalos de confianza, la heterocigosis observada (Ho) y heterocigosis esperada (He), para cada enzima y para cada subpoblación estudiada de P. faxlucens, tanto para plántulas como para adultos, respectivamente. Estos parámetros fueron calculados de 6 loci polimórficos, no se tomaron en cuenta los loci Acph-1 y Apx-1 por ser poco consistentes en la definición de sus bandas. Los genotipos maternos se estimaron a partir de los genotipos de los hijos (plántulas) con el programa de Ritland y Jain (1981).

Tabla 5.2.2. Número efectivo de alelos para 6 loci polimórficos de dos subpoblaciones de Psychotria faxlucens en Los Tuxtlas, Ver.

ENZIMA	SITIO I	SITIO II	TOTAL
MDH	1.92	2.00	1.98
6-PGD	1.98	1.98	1.77
PGI	3.00	2.97	2.92
GDH	1.85	1.99	1.93
LAP	2.78	2.53	2.84
PGM	2.74	2.53	2.67

La mayoría de los intervalos de confianza de las frecuencias alélicas de plántulas fueron similares en la población, no obstante, las pruebas de Chi-cuadrada para la heterogeneidad de varianzas demostraron que hay diferencias significativas en las frecuencias alélicas de dos enzimas entre los dos sitios. Las enzimas fueron LAP ($X^2 = 15.07$ $P < 0.001$) y PGM ($X^2 = 10.83$ $P < 0.001$), siendo la más diferenciada la LAP. Un patrón similar se encontró en las frecuencias alélicas de los adultos. Las pruebas de Chi-cuadrada mostraron diferencias en las enzimas LAP y PGM (LAP, $X^2 = 25.88$ $P < 0.001$; PGM, $X^2 = 9.27$ $P < 0.01$).

En la población de plántulas la heterocigosis observada fue mayor en el sitio I para todas las enzimas; el rango de variación fue de 0.410 a 0.594. En el sitio II la heterocigosis observada varió entre 0.406 a 0.566. Los rangos de variación de la heterocigosis esperada en las dos subpoblaciones fueron similares, para el sitio I fue de 0.460-0.665 y en el sitio II la heterocigosis esperada fue de 0.495-0.663. En cuanto a los adultos se observa la misma tendencia, esto es, el sitio I presentó un rango de heterocigosis mayor respecto al sitio II (Tabla 5.2.4).

Tabla 5.2.3. Frecuencias alélicas, heterocigosis observada (Ho) y heterocigosis esperada (He) de plántulas de *P. faxluceus* en Los Tuxtlas, Ver. N es el número de plántulas ensayadas para cada subpoblación. El número entre paréntesis indica el intervalo de confianza al 95%.

ENZIMA/ LOCUS	ALELO	SITIO I	N	SITIO II	N	TOTAL
MDH-2	1	0.399 (0.081)	70	0.493 (0.076)	83	0.450
	2	0.599 (0.081)		0.505 (0.076)		0.548
	Ho	0.457		0.433		0.444
	He	0.479		0.499		0.494
6-PGD-1	1	0.542 (0.074)	85	0.453 (0.075)	84	0.515
	2	0.457 (0.074)		0.546 (0.075)		0.545
	Ho	0.475		0.406		0.477
	He	0.496		0.495		0.562
PGI-1	1	0.340 (0.079)	69	0.349 (0.085)	60	0.344
	2	0.326 (0.078)		0.291 (0.081)		0.309
	3	0.333 (0.078)		0.358 (0.085)		0.344
	Ho	0.594		0.566		0.581
	He	0.665		0.663		0.665
GDH-2	1	0.358 (0.085)	57	0.477 (0.104)	44	0.410
	2	0.641 (0.085)		0.522 (0.104)		0.589
	Ho	0.410		0.363		0.386
	He	0.460		0.498		0.483
LAP-1	1	0.312 (0.085)	56	0.187 (0.074)	53	0.252
	2	0.232 (0.078)		0.390 (0.093)		0.307
	3	0.455 (0.092)		0.421 (0.076)		0.440
	Ho	0.535		0.531		0.531
	He	0.640		0.634		0.647
PGM-1	1	0.219 (0.075)	57	0.140 (0.070)	47	0.185
	2	0.464 (0.091)		0.484 (0.101)		0.471
	3	0.315 (0.085)		0.375 (0.097)		0.342
	Ho	0.561		0.531		0.552
	He	0.635		0.604		0.625

Tabla 5.2.4. Frecuencias alélicas, heterocigosis observada (Ho) y heterocigosis esperada (He) de los adultos de la población de P. Faxluensis en los Tuxtlas, Ver. El tamaño de muestra fue de 26 para cada sitio. El número entre paréntesis es un intervalo de confianza al 95%.

ENZIMA/ LOCUS	ALELO	SITIO I	SITIO II	TOTAL
MDH-2	1	0.3654 (0.130)	0.4827 (0.133)	0.3927
	2	0.6346 (0.130)	0.5972 (0.130)	0.5760
	Ho	0.500	0.4444	0.4591
	He	0.4637	0.4809	0.4453
6-PGD-1	1	0.500 (0.135)	0.4824 (0.135)	0.4965
	2	0.500 (0.135)	0.5173 (0.135)	0.5133
	Ho	0.5385	0.4767	0.4910
	He	0.5000	0.4990	0.4994
PGI-1	1	0.3599 (0.130)	0.3583 (0.130)	0.3592
	2	0.3132 (0.126)	0.300 (0.124)	0.3073
	3	0.3266 (0.127)	0.3416 (0.128)	0.3332
	Ho	0.5865	0.5666	0.5777
He	0.6649	0.6645	0.6647	
GDH-2	1	0.3666 (0.130)	0.4222 (0.134)	0.4017
	2	0.6333 (0.130)	0.5776 (0.134)	0.5980
	Ho	0.500	0.4368	0.4601
	He	0.4643	0.4877	0.4804
LAP-1	1	0.3054 (0.125)	0.1826 (0.105)	0.2431
	2	0.2456 (0.116)	0.4710 (0.135)	0.3467
	3	0.4490 (0.135)	0.3410 (0.129)	0.4098
	Ho	0.5252	0.4421	0.4773
He	0.6447	0.6242	0.6518	
PGM-1	1	0.2176 (0.112)	0.1195 (0.088)	0.1758
	2	0.4757 (0.135)	0.4962 (0.135)	0.4813
	3	0.3036 (0.125)	0.3912 (0.132)	0.3425
	Ho	0.5643	0.5650	0.5647
He	0.6317	0.6001	0.6192	

5. Indices de fijación y estadísticos F.

Los índices de fijación encontrados en la población estudiada de plántulas y adultos de *P. faxluensis*, se muestran en las Tablas 5.2.5 y 5.2.6. Hubo variación entre sitios y entre loci. Para las plántulas en el sitio I solo un locus de los ensayos presentó un valor negativo de F, este es Gdh-2, pero no fue significativamente diferente de 0 (Tabla 5.2.5). El índice de fijación multilocus fue positivo aunque no es significativamente diferente de 0. En cuanto a los valores de los índices de fijación del sitio II, todos fueron positivos. La enzima 6-Pgd mostró un valor positivo significativamente distinto de 0, lo cual indica exceso de homocigos de lo que se esperaría por apareamientos al azar para este locus. El índice de fijación multilocus no se distingue estadísticamente de cero.

En los adultos hubo poca variación en los índices de fijación y ninguno fue diferente de 0, incluyendo el multilocus. En el sitio I, tres enzimas mostraron valores negativos de F. Sin embargo, no fueron diferentes de 0. En el sitio dos, todos los índices fueron positivos.

Tabla 5.2.5. Índice de Fijación de Wright por locus para las plántulas de *P. faxluensis* en Los Tuxtlas, Ver. Fm es el índice de fijación multilocus. N es el número de plántulas ensayadas. El número entre paréntesis indica la desviación estándar.

ENZIMA	SITIO I	N	SITIO II	N
MDH-2	0.047 (0.025)	70	0.132 (0.028)	81
6-PGD-1	0.041 (0.019)	85	0.319* (0.030)	84
PGI-1	0.107 (0.023)	72	0.146 (0.031)	60
GDH-2	-0.107 (0.026)	61	0.271 (0.028)	44
LAP-1	0.163 (0.024)	58	0.265 (0.031)	54
PGM-1	0.116 (0.025)	57	0.038 (0.026)	49
Fm	0.027 (0.009)		0.206 (0.007)	

$$\chi^2 = F^2N$$

$$H_0: F = 0$$

$$* = P < 0.001$$

Tabla 5.2.6. Índice de fijación de Wright por locus para los adultos de *P. faxluceus* en Los Tuxtlas, Ver. El número de familias ensayadas por sitio fue de 26. El número entre paréntesis representa la desviación estándar.

ENZIMA	SITIO I	SITIO II
MDH-2	-0.078 (0.138)	0.075 (0.156)
6-PGD-1	-0.076 (0.111)	0.044 (0.153)
PGI-1	0.117 (0.273)	0.147 (0.178)
GDH-2	-0.076 (0.109)	0.104 (0.112)
LAP-1	0.185 (0.301)	0.291 (0.322)
PGM-1	0.106 (0.158)	0.058 (0.167)
Fm	0.046	0.126

Los estadísticos F de Wright para plántulas y adultos se presentan en las Tablas 5.2.7 y 5.2.8. En la población de plántulas se observa que los valores de F_{is} en todos los loci son positivos y solo los loci 6-Pgd-1 y Gdh-2 fueron significativamente diferentes de 0. Además, estos valores de F_{is} son mayores a los valores de F_{st} , lo que sugiere que el sistema reproductivo es un proceso importante involucrado en la determinación de la estructura genética de la población de plántulas.

Los estimados de F_{it} fueron positivos para todas las enzimas. Las enzimas 6-PGD y GDH mostraron valores positivos diferentes de 0. Sin embargo, la media de F_{it} para todas las enzimas no fue diferente de 0. Las F_{st} obtenidas en los dos sitios estudiados fueron positivas para todas las enzimas y la mayoría significativamente distintas de 0. Los valores de F_{st} variaron entre 0.001 a 0.069.

Un patrón similar se presentó en las F_{st} y F_{it} de los adultos, todos fueron positivos, solo la enzima LAP mostró un valor positivo de F_{it} significativamente diferente de 0. Los valores de F_{st} fueron positivos y únicamente dos distintos de 0. Los valores encontrados de F_{st} tuvieron un rango de variación de 0.001 a 0.070, similar a los encontrados en las plántulas. Sin embargo, en estas últimas fueron mayores los valores.

Tabla 5.2.7. Estadísticos-F para dos subpoblaciones de plántulas de P. faxlucens en Los Tuxtlas, Ver. N es el tamaño de la muestra.

ENZIMA	N	FIS	FIT	FST
MDH-2	153	0.093	0.112	0.020**
6-PGD-1	169	0.174*	0.182*	0.009
PGI-1	129	0.127	0.129	0.001
GDH-2	101	0.199*	0.235*	0.045***
LAP-1	109	0.079	0.119	0.042***
PGM-1	104	0.119	0.180	0.069****
MEDIA		0.133	0.160	0.031***

$X^2 = F^2N$ Ho: F = 0 * = P<0.025 *** = P<0.005
 $X^2 = 2NFst$ ** = P<0.01 **** = P<0.001

Tabla 5.2.8. Estadísticos-F para los adultos de P. faxlucens en los Tuxtlas, Ver. El tamaño de muestra total fue de 52.

ENZIMA	FIS	FIT	FST
MDH-2	0.134	0.160	0.030
6-PGD-1	0.017	0.018	0.0004
PGI-1	0.132	0.133	0.0018
GDH-2	0.043	0.080	0.038 *
LAP-1	0.268	0.283 *	0.021
PGM-1	0.089	0.153	0.072 **
MEDIA	0.115	0.138	0.026

$X^2 = F^2N$; $X^2 = 2NFst$; Ho = 0 * = P<0.025 ** = P<0.01

Por otro lado, se obtuvo la identidad genética (I) de Nei (1987), que es la probabilidad de que dos alelos tomados de dos subpoblaciones diferentes, sean idénticos. Este parámetro toma valores de 0 a 1. Si es de 0 quiere decir que las poblaciones no comparten ningún alelo. Si es de 1, las subpoblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas. A partir de I, se puede obtener la distancia genética (D) que es $D = -\ln(I)$.

Las dos subpoblaciones de plántulas de P. faxlucens mostraron una identidad genética de 0.977 y una distancia genética de 0.0223. La población de adultos presentó una identidad de 0.980 y una distancia de 0.019.

Para conocer una estimación del flujo génico, se utilizaron las fórmulas propuestas por Crow y Aoki (1984) a partir de la F_{st} :

$$F_{st} = 1 / (1 + 4 Nm a)$$

en donde N es una estimación del tamaño efectivo y m de la tasa de migración.

Así, la Nm es:

$$Nm = \frac{[1/F_{st}] - 1}{4 a}$$

en donde $a = [n/(n-1)]^2$ y $n = \#$ de sitios

De esta forma, la Nm de la población de plántulas de P. faxlucens tuvo su valor de 1.95 y para los adultos de 2.26. Como Nm tiene un valor mayor que 1 (Wright 1933), se sugiere entonces que no existe diferenciación entre sitios tanto en la población de adultos como en la de plántulas.

6. Tasa de entrecruzamiento.

Los análisis de tasas de entrecruzamiento (t) utilizando datos de aloenzimas se realizan con los datos de las frecuencias génicas de los individuos y de la heterocigosis presente en la población. Para estimar la t es necesario suponer que los marcadores genéticos son selectivamente neutros y no ligados, que las madres tienen la misma t y que las frecuencias génicas del

polen son homogéneas para todas las madres (Ritland 1983).

Las tasas de entrecruzamiento obtenidas con métodos electroforéticos, por morfo y por sitio se muestran en las Tablas 5.2.9 y 5.2.10. El tamaño de muestra para el análisis por morfo fue de 30 familias y 93 individuos en total, y el tamaño de muestra por sitio fue de 26 familias y 82 individuos.

El análisis para los morfos muestra, en general, que hay poca variación entre enzimas y entre morfos. El morfo pin presenta, en la mayoría de los loci, tasas más altas que el morfo thrum, con una variación entre 0.919 a 1.272. El morfo thrum, presentó valores de t de 0.914 a 1.074. La tasa multilocus del morfo pin, no obstante, fué menor a la tasa del morfo thrum, pero no fueron significativamente diferentes de 1 ($G = 0.001$, Sokal y Rohlf 1981).

Las tasas de entrecruzamiento de los sitios presentaron mayor variación entre enzimas dentro de cada sitio, pero fue menor entre sitios. En el sitio I el rango de variación encontrado fue de 0.729 a 1.185 y en el sitio II fue de 0.798 a 1.037. Las tasas de entrecruzamiento multilocus son similares en ambos sitios, no hubo diferencias significativas entre ellas ni fueron diferentes de 1 ($G = 0.0007$, Sokal y Rohlf 1981).

Si las poblaciones se encuentran en equilibrio de endogamia y los apareamientos no son al azar, el factor que afecta principalmente la distribución de genotipos para un locus dado es el índice de fijación (F) y está relacionado con la frecuencia de entrecruzamiento t . El índice de fijación y la tasa de entrecruzamiento están relacionados por la fórmula: $t = 1-F/1+F$ (Nei y Syakudo 1958; Layton y Ganders 1984). Este método supone que las poblaciones están en equilibrio y que el sistema reproductivo es el único factor que determina la estructura genética. Por este motivo, es una estimación poco precisa, ya que pueden estar actuando otras fuerzas evolutivas que no pueden medirse con este índice. Sin embargo, es un estimador relativo de los niveles de entrecruzamiento entre las poblaciones (Layton y Ganders 1984).

Las estimaciones de las tasas de entrecruzamiento a partir del índice de fijación F se realizaron con 6 enzimas, tanto para morfos como por sitio. Los valores de la tasa de equilibrio endogámico fueron de 0.950 para el morfo pin y de 0.919 para el morfo thrum. En el sitio I, la tasa en el equilibrio fue de 0.877 y en el sitio II de 0.853.

Tabla 5.2.9. Tasas de entrecruzamiento de individuos distílicos de dos subpoblaciones de *P. faxlucens* en Los Tuxtlas, Ver. El número entre paréntesis indica el error estándar. Mult. es la tasa de entrecruzamiento multilocus y Med. es la media de los estimadores por locus. El tamaño de muestra para el morfo pin fue de 30 familias y 90 plántulas (hijos) y para el morfo thrum fue de 30 familias y 93 plántulas.

ENZIMA	MORFO PIN	MORFO THRUM
MDH-2	0.964 (0.082)	0.934 (0.104)
6-PDG-1	1.053 (0.092)	0.940 (0.087)
PGI-1	1.272 (0.096)	1.074 (0.101)
GDH-2	1.066 (0.102)	0.929 (0.110)
LAP-1	1.047 (0.079)	0.914 (0.108)
PGM-1	1.067 (0.092)	1.030 (0.096)
MULT.	0.995 (0.086)	1.015 (0.061)
MED.	1.101 (0.098)	1.069 (0.065)
EQUILIBRIO*	0.950	0.919

* t en el equilibrio = $(1-F)/(1+F)$
 Datos para 6 enzimas.

Tabla 5.2.10. Tasa de entrecruzamiento de individuos de P. fax-lucens en los dos sitios de estudio en los Tuxtlas, Ver. El tamaño de muestra por sitio fue de 26 familias y 82 plántulas. Mult. es la tasa de entrecruzamiento multilocus y Med. es la media de los estimadores por locus. El número entre paréntesis es el error estándar.

ENZIMA	SITIO I	SITIO II
MDH-2	0.729 (0.109)	0.918 (0.112)
6-PGD-1	0.909 (0.098)	0.798 (0.101)
PGI-1	1.177 (0.110)	1.013 (0.112)
GDH-2	0.870 (0.145)	1.037 (0.089)
LAP-1	1.108 (0.119)	0.969 (0.103)
PGM-1	1.185 (0.142)	1.021 (0.130)
MULT.	1.008 (0.122)	1.025 (0.106)
MED.	0.996 (0.168)	0.959 (0.082)
EQUILIBRIO*	0.877	0.853

* t en el equilibrio = $(1-F)/(1+F)$. Datos para 6 enzimas.

VI. DISCUSION.

1. Biología Floral y Sistemas Reproductivos.

Proporciones de morfos 1:1 ya han sido reportadas para otras especies heterostilicas (Martin 1965; Bir Bahadur 1968; Ornduff 1975, 1979; Ganders 1979; Schou 1983; Sobrevila et al., 1983). En algunos trabajos se ha propuesto una relación entre el nivel de incompatibilidad y las proporciones de morfos florales: donde hay niveles fuertes de auto-incompatibilidad la estructura de la población es cercana al equilibrio (Sobrevila et al., 1983). Dado que se encontró una proporción de morfos 1:1 en la población de P. faxlucens, se esperaría encontrar una alta frecuencia de eventos de polinización cruzada entre los morfos. Sin embargo, los resultados de las polinizaciones experimentales demuestran que existe cierto grado de auto-compatibilidad homomórfica.

La morfología floral de P. faxlucens mostró muchas de las características típicas dimórficas de la distilia.

La longitud del tubo de la corola, así como su ancho, son ligeramente mas grandes en las flores thrum que en las flores pin, los granos de polen también son más grandes en flores thrum que en pin (Tabla V.1.3). Varias especies distilicas presentan éste dimorfismo (Ganders 1979), pero no se había reportado para especies de Psychotria, sólo se ha reportado dimorfismo en la longitud del estambre, estilo y tamaño del polen (Baker 1958; Vuilleumier 1967).

Las características morfológicas de la flor, la producción de néctar y los visitantes observados, nos sugieren que los polinizadores de P. faxlucens son pequeñas palomillas y esfingidos. Sin embargo, no se puede afirmar cuáles son los polinizadores mayores y cuáles los polinizadores menores para ello se necesitan estudios más detallados. Para otras especies heterostilicas, se ha reportado que son polinizadas por insectos, particularmente abejas, también mariposas, moscas, polillas, esfingidos y escarabajos (Richards 1986). Feinsinger y Busby 1987, reportan para una Rubiaceae heterostilica (Palicourea lasiorrachis), que es polinizada principalmente por colibríes.

Con base en las mediciones del volumen y concentración del néctar, se hace evidente que P. faxlucens cae dentro del rango de especies polinizadas por esfingidos, palomillas pequeñas y colibríes (Baker 1978; Cruden et al., 1983) (Tabla 6.1.). Dado que las flores abren al anochecer, se supone que durante la noche producen y acumulan néctar, el cual está disponible para los polinizadores nocturnos, que además son atraídos por la fragancia dulce que producen estas flores.

Tabla 6.1 . Volumen, concentración y contenido de azúcar del néctar (por flor) en diferentes especies de plantas.

Especie y Localidad	N	Néctar	Azúcar	Sacarosa
		— (µl)	— (%)	— (mg)
		X ± D.E.	X ± D.E.	X ± D.E.
POLINIZADAS POR MUR- CIELAGOS.				
<u>Ipomoea muricoides</u> Oaxaca, Méx. (Cruden <u>et al.</u> 1983)	13	161.2±16.8	27.3±0.7	48.9±4.9
<u>Pseudobombax ellipticum</u> Morelos, Méx. (Eguiarte <u>et al.</u> 1987)	6	60 ±10.5	15	----
<u>Manfreda brachystachya</u> Méx., D.F. (Eguiarte y Búrquez 1987)	133	280±60.0	16.9±3.4	----
POLINIZADAS POR PALO- MILLAS.				
<u>Castilleja mexicana</u> Durango, Méx. (Cruden 1983)	14	3.83±0.63	24.8±0.9	1.04±0.17
<u>Mirabilis jalapa</u> Jalisco, Méx. (Cruden 1983)	16	5.35	24.8	1.27
<u>Lindenia rivalis</u> * Guanacaste, Costa Rica (Haber & Frankie 1989)	34	142.7±26.4	12.2±1.2	----
<u>Ipomoea alba</u> Guanacaste, Costa Rica (Haber & Frankie 1989)	3	8.3±2.2	39.0±2.2	----
<u>Coutarea hexandra</u> * Guanacaste, Costa Rica (Haber & Frankie 1989)	7	11.1±4.9	20.0±4.4	----
POLINIZADAS POR PALO- MILLAS PEQUENAS.				

Continuación Tabla 6.1...

<u>Gaura coccinea</u> Durango, Méx. (Cruden 1983)	17	1.71±0.22	28.9±3.6	0.31±0.04
<u>Mirabilis nyctaginea</u> Iowa, EEUU (Cruden 1983)	18	0.57±0.02	23.5±0.9	0.13±0.01
<u>Randia spinosa*</u> Guanacaste, Costa Rica (Haber & Frankie 1989)	28	3.2±0.9	22.4±1.4	----
<u>Alibertia edulis*</u> Guanacaste, Costa Rica (Haber & Frankie 1989)	19	1.2±1.0	19.7±4.2	----
<u>Chomelia spinosa*</u> Guanacaste, Costa Rica (Haber & Frankie 1989)	35	0.2±0.1	20.7±4.7	----
POLINIZADAS POR COLIBRIES				
<u>Agastache</u> cf. <u>pringlei</u> Durango, Méx. (Cruden 1983)	9	2.37±0.36	24.7±0.7	0.60±0.10
<u>Ipomoea bracteata</u> Jalisco, Méx. (Arizmendi 1987)	10	21.96±3.78	25.82±1.1	-----
<u>Echeveria gibbiflora</u> D.F., Méx. (Parra 1988)	10	14.5±6.26	43.74±6.77	5.09±1.41
<hr/>				
<u>Psychotria faxlucens*</u>				
Flor Pin	8	4.18±2.21	16.6±1.4	0.58±0.39
Flor Thrum	10	3.25±0.79	15.8±2.8	0.49±0.21
Los Tuxtlas, Ver. Méx. (Este trabajo)				

* Rubiaceae

Entre otras características morfológicas, la proporción polen/óvulo es un buen indicador de los sistemas reproductivos. Este cociente refleja la probabilidad de que suficientes granos de polen alcancen el estigma y resulte la máxima producción de semillas (Cruden 1977; Cruden y Miller-Ward 1981). Al analizar conjuntamente las proporciones polen/óvulo de los morfos florales de *P. faxlucens*, y compararla con la tabla de Cruden (1977) (ver Tabla 6.2), vemos que su sistema reproductivo corresponde al de xenogamia facultativa, pero por otra parte se sabe que muchas especies polinizadas por esfíngidos producen granos de polen muy grandes y por consiguiente tienen proporciones polen/óvulo más pequeñas de las esperadas.

Tabla 6.2. Relaciones entre las proporciones polen/óvulo y sistemas reproductivos.

Especie y Familia	P/O $\bar{X} \pm D.E.$	Sistemas Reproductivos
<i>Hedeoma hispida</i> Labiatae	39.0 \pm 3.0	Autogamia obligada (Cruden 1977)
<i>Heliotropium</i> sp. Boraginaceae	134.5 \pm 3.51	Autogamia facultativa (Cruden 1977)
<i>Galium boreale</i> Rubiaceae	1902.4 \pm 45.0	Xenogamia facultativa (Cruden 1977)
<i>Primula incana</i> Primulaceae	245.0	Xenogamia facultativa (Cruden 1977)
<i>Stachys coccinea</i> Labiatae	5870 \pm 148	Xenogamia (Cruden 1977)
<i>Psychotria faxlucens</i> Rubiaceae		
Pin	477.3 \pm 79.9	Xenogamia facultativa (este trabajo)
Thrum	392.8 \pm 108.9	Xenogamia facultativa (este trabajo)

Al realizar las polinizaciones intramorfo se observó que las plantas thrum presentaron mayor producción de frutos que las pin. Estos resultados nos sugieren que existen diferencias en el grado

de auto-incompatibilidad entre los dos morfos. Diferencias en la fuerza de la auto-incompatibilidad entre los dos morfos ya ha sido demostrada en otras especies heterostilicas (Ornduff 1971; Barrett 1977). Además de la auto-incompatibilidad existen otros factores que pueden estar involucrados en la producción de frutos, por ejemplo, limitación y atracción de polinizadores (Willson y Price 1977; Schaffer y Schaffer 1979; Schemske 1980; Willson y Schemske 1980), aborción selectiva y donación de polen (Stephenson 1981; Bawa y Webb 1984; Sutherland y Delph 1984).

De acuerdo con las características de producción del néctar y los visitantes florales, se propone que las flores de P. faxluceus necesitan de un vector de polen para llevar a cabo la fertilización de los óvulos. Al parecer, no existen barreras fuertes de incompatibilidad entre morfos, sin embargo, la polinización legítima (entre morfos; 45%) fue más eficiente que la polinización ilegítima (intramorfos; 26%). La polinización legítima aumenta las probabilidades de producción de frutos en ambos morfos. De aquí se concluye que el sistema reproductivo es el de xenogamia. Esto coincide con las predicciones calculadas de las proporciones polen/óvulo.

En cuanto a los resultados del movimiento de polen entre morfos, en esencia se observa que los estigmas pin reciben más granos de polen de cualquier morfo que los estigmas thrum. Resultados similares se han encontrado en otras especies heterostilicas y se sugiere que es por el hecho de que los estigmas pin son más accesibles para los polinizadores (Ganders 1979; Ornduff 1980a, 1980b; Lewis 1982; Schou 1983).

De los estudios de flujo de polen que se han hecho con especies distilicas se desprenden varios patrones: en todos los casos hay una marcada asimetría en la cantidad y tipo de polen depositados en los estigmas de los morfos florales. Así, el morfo pin recibe generalmente más granos de polen que el morfo thrum, sin embargo es más frecuente la polinización legítima en el morfo thrum. En la mayoría de los estudios se han registrado grandes cantidades de polen ilegítimo en los estigmas de flores pin (Ornduff 1980; Weller 1980; Philip y Schou 1981; Lewis 1982; Schou 1983; Barrett 1985). Se han propuesto algunas hipótesis para explicar estas diferencias en las cargas de polen, por ejemplo, que sea efecto de las distintas posiciones del polinizador respecto a los órganos reproductivos de los morfos florales (Levin 1968; Schou 1983; Price y Barrett 1984). Otra hipótesis es que simplemente sea el resultado de la distancia que separa a un estigma del conjunto de estambres que producen un gran número de granos de polen (Barrett y Glover 1985). Por otro lado, Lloyd y Yates (1982) proponen que el polimorfismo de estilos y estambres que caracteriza a las plantas heterostilicas es un mecanismo floral para reducir la interferencia recíproca entre funciones reproductivas femeninas y masculinas. Además proponen que la separación espacial de anteras y estambres, incrementa

la adecuación materna de los morfos para dejar más espacio en el estigma para polen compatible o para reducir efectos adversos de polenes incompatibles.

Los granos de polen pin son más pequeños y se producen en mayor cantidad que los granos de polen thrum. Se supone que éstas características permiten mayor disponibilidad para transporte de polen entre flores y entre plantas (Ganders 1979; Schou 1983; Richards 1986).

Una observación interesante es el hecho de que cambien en el tiempo las cargas de distinto polen que recibe cada tipo de flor, esto es, las flores thrum reciben más polen thrum el primer día (flores recién abiertas), que el segundo (flores viejas), sin embargo, las cargas de polen pin son similares en los dos días. En las flores pin, la llegada de ambos tipos de polen, es mayor el primer día que en el segundo. Todo esto sugiere que las flores de ambos morfos se saturan rápidamente en cuanto a la cantidad de polen que reciben y/o que existe un transporte preferencial de granos de polen por los polinizadores.

Respecto a las estimaciones obtenidas en el campo de las tasas "t" y "s", se piensa que los valores tan altos de "s" que se encontraron, se deben a que existe una carencia en el transporte diferencial de granos de polen legítimos entre morfos y que ambas clases de estigmas son polinizadas ilegítimamente a un grado considerable. Este comportamiento es típico de especies distílicas, como ya ha sido mencionado en párrafos anteriores (Ganders 1979; Lewis 1982; Barrett y Glover 1985). No obstante, las tasas de entrecruzamiento estimadas por métodos genéticos dieron valores de 1 lo que sugiere que probablemente estén ocurriendo fenómenos como competencia entre granos de polen xenógamos y autógamos y entre granos de polen de morfo diferente.

Además de los datos de carga de polen, los datos de los polvos fluorescentes sugieren que el movimiento del polen no es grande pues las distancias de dispersión de polen fueron de 0 a 150 m con la mayoría entre 20 m, es decir dentro de la población y si la dispersión de semillas es pobre habría mayor probabilidad de cruzamiento entre parientes.

2. Variación genética enzimática.

Los niveles de variación encontrados en Psychotria faxluensis son similares a los encontrados en otros árboles tropicales (Hamrick et al. 1981; Hamrick 1983; Loveless y Hamrick 1987; Bawa y O'Malley 1987). Particularmente, Loveless y Hamrick (1987) reportan para Psychotria horizontalis una proporción de loci

polimórfico de 0.5, el cual es ligeramente superior que en P. faxlucens ($P= 0.400$), sin embargo, la heterocigosis en P. horizontalis fue menor ($H= 0.152$), en P. faxlucens fue de 0.198. Probablemente el valor alto de la heterocigosis se deba a que los alelos de las enzimas polimórficas presentaron frecuencias similares entre ellos. Otra causa de altos valores de heterocigosis promedio puede ser explicada por la predicción de que las plantas que tienen fecundación cruzada presentan mayor heterocigosis que aquellas que se autofecundan (Nevo 1978; Brown 1979; Schea 1987).

Los niveles relativamente altos de variación genética encontrados en árboles tropicales, incluyendo a P. faxlucens, podrían explicarse por varios mecanismos, esto es, por los sistemas reproductivos de los árboles tropicales, muchos de los cuales presentan sistemas de auto-incompatibilidad, lo que implica alto flujo de polen y mayor intercambio genético (Baker et al. 1983; Bawa y Beach 1983; Loveless y Hamrick 1987; Ledig 1986). Para el caso de P. faxlucens se sugiere que su sistema reproductivo, es decir, que es una planta heterostilica, con fuerte auto-incompatibilidad, explica en gran parte, la variación encontrada. Por otro lado, considerando que los árboles tropicales presentan ciclos de vida largos y alta longevidad, la acumulación de mutaciones somáticas pueden ser deletéreas y recesivas; si los árboles se autofertilizan se producirán homocigos con alelos mutantes que se expresarán, por lo cual se favorecen árboles con tasas bajas de autofertilización y aumentan las cruzas con individuos heterocigos. La progenie de estas cruzas heterocigas no expresarán estas mutaciones. Sin embargo, la fertilización cruzada mantiene una alta carga genética. Así la variación se mantiene por mutación, por los sistemas reproductivos y por el movimiento de polen y semillas (Ledig 1986).

Algunos estudios sobre variación genética con plantas heterostilicas han demostrado que existe una correlación entre las distancias que separan los estigmas y anteras y algunas medidas de variación genética (diversidad genética dentro y entre poblaciones, identidad genética). Es decir, a mayor distancia hay mayor variación en las poblaciones (Ganders 1975; Rick et al. 1979; Ganders et al. 1985).

Dada la alta variación genética encontrada en la población estudiada de P. faxlucens puede pensarse que esta especie no ha sufrido efectos importantes por deriva génica o por endogamia. No obstante, es necesario realizar otros estudios para poder confirmar esto.

Las frecuencias alélicas de los adultos y de las plántulas muestran poca variación. La mayoría de las enzimas no presentaron variaciones importantes entre los dos sitios. No obstante, sí hubo diferencias significativas en dos enzimas (LAP y PGM) de las ensayadas, tanto en adultos como en la progenie. Tampoco

hubo grandes variaciones en los niveles de heterocigosis observada, sin embargo, fueron consistentemente mayores en los adultos y en el sitio I. Esta diferencia puede ser explicada en parte, porque se trata de una estimación indirecta de los genotipos maternos, a partir de inferencias de los genotipos de la progenie, y el tamaño de muestra de familias es pequeño. Además, las diferencias también pueden deberse a que existen ciertas limitaciones del flujo génico en la población. Estas limitaciones del flujo génico probablemente se deben a las diferencias en las densidades de individuos reproductivos presentes en cada sitio de estudios, lo cual trae como consecuencia una visita diferencial de los polinizadores. Por otro lado, estos cambios en los niveles de variación sugieren que deben usarse más loci (por lo menos 10) para tener una estimación menos sesgada de la heterocigosis (Yeh 1981; Layton y Ganders 1984).

3. Índice de fijación y estadísticos F.

En relación a las plántulas, en la mayoría de los loci muestreados se encontraron índices de fijación positivos (no diferentes de 0), lo que sugiere que hay más homocigos de los que se producen por apareamientos al azar. Además, se observa variación en las estimaciones del índice de fijación entre loci dentro de una población, que puede deberse a errores de submuestreo, es decir, convendría aumentar el tamaño de muestra de individuos y de loci ensayados (Schaal 1975; Schaal y Levin 1976). La variación en los índices de fijación puede ser explicada por la existencia de una subestructuración espacial de las subpoblaciones.

Por otro lado, cabe la posibilidad de que exista endogamia en las subpoblaciones estudiadas, pues se sabe que el sistema de apareamiento y/o la deriva génica, pueden producir índices de fijación positivos en todos los loci del genoma (Hedrick 1983; Layton y Ganders 1984).

Los estadísticos F de la población de adultos, demuestran que existe poca diferenciación en las dos subpoblaciones, sin embargo, en las plántulas, los niveles de diferenciación son ligeramente mayores.

En la población de plántulas de P. faxluensis, los estadísticos F de Wright presentaron un patrón similar al del índice de fijación. Se observa que los valores de Fis en todos los loci son positivos, y solo dos enzimas (6-PGD y GDH) fueron significativamente diferentes de 0. Estos datos sugieren exceso de homocigos debido probablemente al efecto por cruza entre plantas emparentadas y/o selección a favor de los homocigos. Además se observa que los valores de Fis son, para todos los

loci, mayores a los valores de F_{st} , lo que sugiere que el sistema de apareamiento es el principal factor que está determinando la estructura genética de la población. Por otro lado, los valores diferentes de cero encontrados en F_{st} , sugieren que hay otras fuerzas que actúan en las subpoblaciones de plántulas de Psychotria faxlucens.

A pesar de la variación en los valores de F_{is} entre las enzimas la F_{is} promedio nos sugiere que la población de plántulas y la población de adultos estudiadas de P. faxlucens se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg. Probablemente, los diferentes valores de F_{is} encontrados en la población podrían deberse a que está operando muy débilmente la selección en diferentes direcciones entre los diferentes loci (Slatkin 1985; Hamrick 1987).

Los valores observados de F_{st} son pequeños y comparables con aquéllos que se han reportado en la literatura para algunos árboles tropicales (Loveless y Hamrick 1984; Heywood y Fleming 1986; Loveless y Hamrick 1987), particularmente, para Psychotria horizontalis que mostró un valor de F_{st} de 0.039 (Loveless y Hamrick 1987) y Psychotria nervosa de 0.038 para tres loci y 0.0078 para dos loci (Dewey y Heywood 1988). Se han encontrado valores pequeños de F_{st} para plantas de zonas templadas y algunas herbáceas (Tabla VI.3). Loveless y Hamrick (1987) analizaron valores de F_{st} (= G_{st}) de plantas y encontraron que están correlacionados con sus sistemas de cruzamiento, es decir, plantas con apareamiento mixto o con fecundación cruzada y, particularmente las polinizadas por viento, presentan valores bajos de F_{st} .

Los valores de F_{st} encontrados para P. faxlucens son muy pequeños, lo que reflejaría la existencia de niveles altos de flujo génico entre las subpoblaciones, disminuyendo los efectos de la deriva génica y de la selección natural (Slatkin 1985, Hamrick 1987).

Tabla 6.3. Estimaciones de estadísticos-F de algunas poblaciones de plantas tropicales y templadas tanto leñosas como herbáceas.

ESPECIE	# DE LOCI	Fis	Fst	Fit	REFERENCIA
<u>Liatrix cylindraceae</u>	15	0.407	0.068	0.425	Schaal (1975)
<u>Phlox cuspida</u>	5	0.67	0.41	0.80	Levin (1978)
<u>Phlox roemariana</u>	4	0.04	0.21	0.54	Levin (1978)
<u>Oenothera grandis</u>	6	0.04	0.09	0.19	Ellstrand y Levin (1980)
<u>Oenothera laciniata</u>	5	0.13	0.24	0.37	Ellstrand y Levin (1980)
<u>Cynosurus cristatus</u>	4	0.013	0.011	0.009	Ennos (1985)
<u>Pinus ponderosa</u>	7	-0.106	0.041	-0.096	Linhart <u>et al.</u> (1981)
<u>Piper amalago</u>	1	0.0063	0.011	0.011	Heywood y Fleming (1986)
<u>Acalipha diversifolia</u>	29	-----	0.094	-----	Loveless y Hamrick (1987)
<u>Alseis blackiana</u>	26	-----	0.043	-----	Loveless y Hamrick (1987)
<u>Quararibea asterolepis</u>	30	-----	0.021	-----	Loveless y Hamrick (1987)
<u>Psychotria horizontalis</u>	20	-----	0.039	-----	Loveless y Hamrick (1987)
<u>Delphinium nelsoni</u>	5	-0.096	0.069	-0.02	Waser (1987)
<u>Psychotria nervosa</u>	3	-----	0.038	----	Dewey y Heywood (1988)
<u>Psychotria faxlucens</u>	8	0.092	0.023	0.113	Este trabajo

4. Tasa de entrecruzamiento.

Con los datos de la biología floral y biología reproductiva se puede inferir que P. faxlucens es una especie con tasas de entrecruzamiento cercanas a uno. Las predicciones surgen por su morfología floral pues la posición recíproca de estigmas y anteras en diferentes individuos favorecen la polinización cruzada (Darwin 1877; Ornduff 1959; Crowe 1964; Vuilleumier 1967; Ganders 1979). Además, varios estudios han demostrado que hay una relación de distancias grandes de anteras y estigmas con tasas

altas de entrecruzamiento (Ganders 1975; Ganders et al. 1985). En segundo lugar los resultados de las polinizaciones controladas en el campo indican que la especie es auto-incompatible, pues el tratamiento de autopolinización no produjo ningún fruto en ninguno de los dos morfos y la polinización cruzada dió 40% de frutos en flores pin y 45% en flores thrum.

Cuando se estimó la tasa de entrecruzamiento a partir del número de granos de polen presentes en los diferentes estigmas ésta fue baja. Este valor de t está subestimado, debido probablemente a tres aspectos : a) se muestrearon pocas flores y durante pocos días, b) la dificultad de la estimación de los granos de polen presentes en los diferentes estigmas y c) no se utilizó la metodología adecuada para separar los granos de polen provenientes de otros individuos de igual morfo al estigma analizado.

Las estimaciones de las tasas de entrecruzamiento con métodos electroforéticos son muy cercanas a 1 en los dos morfos (Tabla V.5) y muestran cierta variación entre enzimas y entre sitios. El morfo pin presenta, en la mayoría de los loci, tasas más altas que el morfo thrum. La variación en la tasa de entrecruzamiento entre enzimas y entre poblaciones de una misma especie, ya ha sido reportada en muchos estudios (Mitton et al. 1981; Ennos y Clegg 1982; Smith y Hamrick 1984; O'Malley y Bawa 1987). Se ha discutido mucho acerca de las causas de esta variación. Lo más aceptado es que la tasa de entrecruzamiento se ve afectada no sólo por factores genéticos, sino también por factores ambientales (Clegg 1980; Mitton et al. 1981; Hamrick 1982; Layton y Ganders 1984; Shea 1987). Las variaciones también pueden deberse a errores de muestreo, a tamaños pequeños de la muestra, a un número bajo de loci ensayados y a que la selección natural esté operando sólo en algunos de los loci de la población (Brown y Allard 1971; Brown et al. 1981; Ritland 1983; O'Malley y Bawa 1987). En este estudio las variaciones en las tasas de entrecruzamiento entre enzimas, tanto para el análisis por morfo como por sitio, probablemente se deben a que el tamaño de la muestra fue pequeño y a que se ensayaron pocos loci lo cual produce estimaciones sesgadas.

Ya han sido reportadas altas tasas de entrecruzamiento para árboles en general. En coníferas se han registrado tasas de entre 0.89 y 0.98 (Schemske y Lande 1985). Moran y Bell (1983) encontraron tasas de entrecruzamiento de 0.69 a 0.86 en Eucaliptus spp. Para árboles tropicales, Bawa y O'Malley (1987), reportan una t de 0.951 en el árbol Pithecellobium pedicellare. Una t multiloci de 0.85 se encontró en Bertholletia excelsa (O'Malley et al. 1988). Al parecer, los árboles tropicales (incluyendo a P. faxluensis) se comportan de manera similar al resto de los árboles. Las altas tasas de entrecruzamiento en árboles explican en buena parte la gran variación y los bajos niveles de diferenciación genética que existen dentro y entre

poblaciones (Ledig 1986; Loveless y Hamrick 1987)

Los valores de t estimados a partir del índice de fijación fueron muy cercanos a uno y menores a los estimados multiloci. Las diferencias en estos valores pueden deberse, en parte, a efectos estadísticos o por variación en la densidad de individuos de las subpoblaciones (Sanders y Hamrick 1980). La tasa de entrecruzamiento multiloci es quizás el estimado más robusto y consistente de las tasas de entrecruzamiento, pues es menos sensible a las violaciones de los supuestos del modelo mixto y además no supone que la población se encuentre en equilibrio de endogamia como la tasa calculada a partir del índice de fijación (Ritland y Jain 1981).

Se encontraron valores de t mayores a 1 en varios loci de ambos morfos florales. El morfo pin presentó el 83% del total de loci muestreados, el morfo thrum sólo el 33% del total. Las posibles causas de t mayores a 1 que se han propuesto son: 1) por efectos del azar si la tasa de entrecruzamiento es muy alta; 2) por la alta frecuencia de apareamientos no azarosos (asortativos) negativos como sucede con las plantas heterostilicas y 3) por selección a favor de heterocigos (Brown et al. 1985). Probablemente en P. faxiucens, los valores mayores a 1 esten explicados por efectos del azar (1) y por apareamientos no azarosos negativos (2). Otra probable explicación es que exista cierto grado de endogamia debido a cruza entre individuos emparentados.

En especies heterostilicas no hay muchos estudios sobre estimación de tasas de entrecruzamiento a partir de isoenzimas. En Primula vulgaris se estimaron las tasas de entrecruzamiento a partir de 4 loci polimórficos para individuos de morfo pin e individuos tipo thrum. La mayoría de los valores de las tasas de entrecruzamiento fueron de más de 1. La media para los individuos del morfo pin fue ligeramente más grande que para los del morfo thrum; no obstante, esta diferencia no fue significativa (Cahalan y Gliddon 1985).

Los estudios efectuados con métodos electroforéticos en poblaciones de Eichhornia paniculata (Glover y Barrett 1986; Barrett 1989) demostraron que poblaciones tristilicas presentan tasas de entrecruzamiento altas sin diferencias significativas entre morfos. En poblaciones distilicas las tasas son más bajas y con diferencias significativas entre morfos, el morfo pin presentó tasas de entrecruzamiento mucho más altas que las del morfo thrum. En este estudio se concluye que la morfología floral tiene una importante influencia en las tasas de entrecruzamiento.

Poblaciones distilicas de Turnera ulmifolia presentaron altas tasas de entrecruzamiento; en el morfo pin la t fue de 1.00 y en el morfo thrum de 1.14. Se concluye que las tasas de entrecruzamiento altas se deben a la incompatibilidad dimórfica y que las variaciones genéticas significativas de las partes

florales tales como la separación de estigmas y anteras, influyen en el sistema reproductivo de la especie (Barrett y Shore 1987)

Al comparar los datos de este estudio con los de Primula vulgaris, Eichhornia paniculata y Turnera ulmifolia, vemos que P. faxluensis se comporta de manera similar, es decir, presenta tasas de entrecruzamiento cercanas a 1, no mostró diferencias significativas entre morfos, pero si hay una tendencia en los individuos del tipo pin en presentar valores más altos de tasas de entrecruzamiento.

VII. CONCLUSIONES.

1) Psychotria faxlucens es un árbol distílico con una proporción de morfos cercana 1:1.

2) Las características florales observadas: flores blancas, tubulares, con fuerte aroma dulce al anochecer, néctar diluido y polen de tamaño grande, concuerdan básicamente con el síndrome de polinización por mariposas nocturnas. Se supone que los principales polinizadores son polillas de la familia Sphingidae.

3) Con base en las proporciones polen/óvulo se determinó de manera general que su sistema reproductivo es el de xenogamia facultativa. Esto concuerda con los resultados obtenidos en las polinizaciones controladas.

4) El resultado de las polinizaciones experimentales indica que P. faxlucens presenta un sistema de auto-incompatibilidad entre morfos florales y cierto grado de compatibilidad dentro de cada morfo floral.

5) Los datos de carga de polen reflejan que el movimiento de polen entre los dos morfos no es muy grande pero si es diferente entre ellos, es decir, aparentemente las flores pin reciben mayor cantidad de polen.

6) Los niveles de variación genética encontrados en la población de estudio fueron altos y similares a los encontrados en otros árboles tropicales.

7) Los valores del índice de fijación y del estadístico Fis sugieren poca endogamia. No obstante, estos datos nos indican que la población se encuentra muy cercana al equilibrio.

8) La F_{st} indica poca diferenciación genética entre sitios, lo que sugiere elevado flujo génico o que la deriva génica no ha tenido efectos importantes en la población.

9) La tasa de entrecruzamiento no fue diferente de 1 y este valor es similar a los reportados para otros árboles tropicales. Además está de acuerdo con las observaciones de la biología floral y de las polinizaciones experimentales. El hecho de ser un árbol heterostílico ya supone reducir las posibilidades de autofertilización. Por otro lado, al comparar las estimaciones obtenidas por métodos ecológicos a partir de estimaciones indirectas y con estimaciones a partir del índice de fijación F , P. faxlucens parece presentar cierto grado de apareamientos entre parientes.

APENDICE I.

METODOS ELECTROFORETICOS.

Abreviaciones

DPN: Beta-nicotinamida adenina dinucleótido
 MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide
 NBT: Nitro blue tetrazolium
 PMS: Fenazine metosulfato
 TPN: Beta-nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
 Tris: Tris (hidroximetil)aminometano

Tabla A.1. Composición de los buffers del gel y del electrodo usados para electroforesis del gel de almidón y condiciones electroforéticas (Hakim-Elahi 1976).

Nombre	Gel	BUFFER	
		Electrodo	Corriente
Histidina	pH 7.0	pH 7.0	42 mA
	Dl-Histidina	Ac. Citrico	
	1.02 gr.	9.04 gr.	
	Aforar a 1 lt	Tris 16.35 gr	
	con agua des-tilada. Ajustar el pH con NaOH	Aforar a 1 lt con agua destilada	
Poulik	pH 8.1	pH 8.6	270 volts
	Tris 2 gr.	NaOH 4.0 gr	
	Ac. citrico	Ac. bórico	
	0.63 gr	18.55 gr	
	Aforar a 1 lt con agua des-tilada	Aforar a 1 lt con agua des-tilada	

Soluciones de Tinción.

- 1M Acetato de Sodio, pH 5.0:
 Acetato de sodio cristalino (trihidratado) 136.1 gr
 Agua destilada 1 lt
 Ajustar el pH con ácido acético
- Buffer de Fosfatos pH, 6.0:
 Fosfato de potasio dibásico 45.6 gr

Fosfato de potasio monobásico	109.0 gr
Aforar a 1000 ml con agua destilada.	
3. Buffer de LAP pH, 6.0:	
Tris	15.1 gr
Acido Maleico	9.4 gr
Aforar a 250 ml con agua destilada.	
4. 1M Tris-HCl, pH 8.0:	
Tris	121.1 gr
Aforar a 1000 ml con agua destilada.	
Ajustar el pH con ácido clorhídrico (HCl) concentrado.	
5. 1 % Acetato alfa-naftil	
Acetato alfa-naftil	1.0 gr
Acetona	100 ml
6. 1 % Fosfato ácido alfa-naftil	
Fosfato ácido alfa-naftil	1.0 gr
Acetona	50 ml
Agua destilada	50 ml

Recetas de Enzimas.

ACONITASA (ACO; E.C. 4.2.1.3)

0.075 gr	Ac. cis-aconítico
50 ml	0.1M Tris-HCl, pH 8.0
1 ml	1M MgCl ₂
10 ml	Isocitrato deshidrogenasa (1u/ml)
1 ml	1 % TPN
2 ml	1 % MTT
0.2 ml	1 % PMS
Incubar a la oscuridad a 30 °C.	

ALCOHOL DESHIDROGENASA (ADH; E.C. 1.1.1.1)

0.015 gr	DPN
0.010 gr	NBT
0.002 gr	PMS
10 ml	1M Tris-HCl, pH 8.0
5 ml	Alcohol etílico (95%)
Incubar a la oscuridad a 30 °C.	

ENZIMA MALICA (ME; E.C.1.1.1.40)

8 ml	1M Tris-HCl, pH 8.0
80 ml	Agua destilada

8 ml 1M DL-Malato, pH 7.8
2 ml 10 % MgCl₂
1.5 ml 1 % TPN
0.15 ml 1 % PMS
2.25 ml 1 % MTT
Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente.

ESTERASA (EST; E.C. 3.1.1.1.)

0.100 gr Fast blue RR salt
4.5 ml 1% acetato alfa-naftil
5 ml Buffer de fosfatos, pH 6.0 ,
80 ml Agua destilada

FOSFATASA ACIDA (ACPH; 3.1.3.2)

0.125 gr Fast Garnet GBC salt
80 ml Agua destilada
0.62 ml 10 % MgCl
6 ml NaAc, pH 5.0
2.5 ml 1 % Fosfato ácido alfa-naftil
Tenir en la oscuridad y a temperatura ambiente

6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA (6-PGD; E.C.1.1.1.44)

0.040 gr Acido 6-fosfogluconico (sal de bario)
0.010 gr TPN
0.010 gr MTT
0.002 gr PMS
10 ml 1M Tris-HCl, pH 8.0
80 ml Agua destilada
2 ml 1M MgCl₂
Incubar en la oscuridad a 37°C.

FOSFOGLUCOSA ISOMERASA (PGI; E.C.5.3.1.9):

0.030 gr D-Fructosa-6- fosfato
0.010 gr TPN
0.020 gr MTT
0.002 gr PMS
12 ml 1M Tris-HCl, pH 8.0
80 ml Agua destilada
1 ml 10 % MgCl₂
4 ml Glucosa-6- fosfato deshidrogenasa (40u)
Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente.

FOSFOGLUCOSA ISOMERASA (PGM; E.C. 2.7.5.1):

0.150 gr D-Glucosa-1-fosfato
0.002 gr D-glucosa-1,6-difosfato
0.010 gr TPN
0.020 gr MTT

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

0.002 gr PMS
10 ml 1M Tris-HCl pH 8.0
80 ml Agua destilada
2 ml 10 % MgCl₂
4 ml Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (40u)
Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente.

GLUCOSA-6-FOSFATO DESHIDROGENASA (G-6PD; E.C.1.1.1.49)

0.02 gr TPN
0.01 gr NBT
0.002 gr PMS
0.100 gr D-glucosa-6-fosfato disodium
12.5 ml 1M Tris-HCl, pH 8.0
80 ml Agua destilada
Incubar a la oscuridad a 37 o C.

GLUTAMATO DESHIDROGENASA (GDH; E.C. 1.4.1.3)

2.0 gr Ac. L-glutámico
0.020 gr DPN
0.010 gr MTT
0.002 gr PMS
10 ml 1M Tris-HCl, pH 8.0
80 ml Agua destilada
Teñir en la oscuridad y a 37 oC

GLUTAMATO OXALOACETATO TRANSAMINASA (GOT; E.C. 2.6.1.1.)

1)
0.12 gr Acido ketoglutarico
0.18 gr Acido aspártico
2)
0.06 gr Piridoxal-5'fosfato
0.10 gr Fast Blue BB salt
Añadir a 1):
12 ml 1M Tris-HCl, pH 8.0
80 ml Agua destilada
Mezclar 1) y 2) e incubar en la oscuridad a temperatura ambiente
de 2-4 horas. Leer rápido.

ISOCITRATO DESHIDROGENASA (IDH; E.C.1.1.1.42)

0.10 gr Ac. isocitrico
0.010 gr TPN
0.015 gr MTT
0.002 gr PMS
10 ml 1M Tris- HCl, pH 8.0
80 ml Agua destilada
5 ml 10 % MgCl₂
Teñir en la oscuridad a temperatura ambiente.

LEUCIL AMINO PEPTIDASA (LAP; E.C. 3.4.11.1)

1)
0.050 gr Fast Black -K- salt
80 ml Agua destilada
10 ml Buffer de fosfatos, pH 6.0
1 ml 10 % MgCl₂
2)
0.020 gr L-Leucil-beta-naftilamida HCl
5 ml N,N-Dimetilformamida
Mezclar 1) y 2), agitar vigorosamente e incubar a la oscuridad a 37o C.

MALATO DESHIDROGENASA (MDH; E.C. 1.1.1.37)

0.030 gr DPN
0.015 gr NBT
0.001 gr PMS
0.024 gr Cianuro de Sodio
80 ml Agua destilada
25 ml 1M Tris-HCl, pH 8.0
5 ml 1M DL-Malato, pH 7.8
Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente.

PEROXIDASA ANODICA (APX; 1.11.1.7)

100 gr 3-Amino-9-etil-carbazole
7 ml N,N-Dimetilformamida
Disolver bien y anadir:
80 ml Agua destilada
1 ml 3 % peróxido de hidrógeno
2 ml 1 % CaCl₂
5 ml NaAc, pH 5.0
80 ml Agua destilada
Teñir a la oscuridad y a temperatura ambiente.

RIBULOSA-5' DIFOSFATO CARBOXILASA (RUB):

1)
0.010 gr Naphtol blue black
2)
10 ml Acido acético
40 ml Metanol
40 ml Agua destilada
Mezclar 1) y 2) agregarlo a los geles e incubar durante 30 minutos. Quitar y agregar una mezcla nueva del contenido 2). Posteriormente hacer 3 cambios de 60 minutos cada uno.

SHIKIMATO DESHIDROGENASA (SDH; E.C.1.1.1.25):

0.100 gr Acido (-) Shikimico
0.010 gr TPN

0.010 gr	MTT
0.005 gr	PMS
20 ml	1M Tris-HCl, pH 8.0
80 ml	Agua destilada

Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente.

BIBLIOGRAFIA

- ALVAREZ-BUYLLA, R.M.E. 1986. Demografía y dinámica poblacional de Cecropia obtusifolia Bertol. (Moraceae) en la selva de Los Tuxtlas, México. Tesis (Maestro en Ciencias), Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- ARIZMENDI, A.C. 1987. Interacción entre los colibríes y su recurso vegetal en Chamela, Jal. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- BAKER, H.G. 1953a. Dimorphism and monomorphism in the Plumbaginaceae II. Pollen and stigmata in the genus Limonium. Ann. Bot. II 17: 433-445.
- 1953b. Dimorphism and monomorphism in the Plumbaginaceae III. Correlation of geographical distribution patterns with dimorphism and monomorphism in Limonium. Ann. Bot. II 17: 615-627.
- 1958. Studies in the reproductive biology of West African Rubiaceae. J. West African Sci. 4: 9-24.
- 1961. Heterostyly and homostyly in Lithospermum canescens (Boraginaceae). Rhodora 63: 229-235.
- 1962. Heterostyly in the Connaraceae with special reference to Byrsocarpus coccineus Bot. Gaz. 123: 206-211.
- 1966. The evolution, functioning, and breakdown of heteromorphic incompatibility systems I. The Plumbaginaceae. Evolution 20: 349-368.
- 1978. Chemical aspects of the pollination of woody plants in tropics. Pags. 57-82 in: P.B. Tomlinson y M.H. Zimmermann (eds). Tropical trees as living systems. Cambridge University Press, Cambridge.
- BAKER, H.G., K.S. BAWA, G.W. FRANKIE y P.A. OPLER. 1983. Reproductive biology of plants in tropical forest. Pags. 183-215 in: F.B. Golley, ed. Tropical Rain Forest Ecosystems, A Structure and Function. Elsevier Sci. Publ. Co., Amsterdam.
- BARRET, S.C.H. 1977a. Tristyly in Eichhornia crassipes (Mart.) Solms. (Water Hyacinth). Biotropica 9: 230-238.
- 1977b. The breeding system of Pontederia rotundifolia L., a tristylous species. New Phyt. 78: 209-220.

- 1979. The evolutionary breakdown of tristylly in Eichhornia crassipes (Mart.) Solms. (Water Hyacinth.) Evolution 33: 499-510.
- 1980. Sexual reproduction in Eichhornia crassipes (Water Hyacinth). II. Seed production in natural populations. J. Appl. Ecol. 17: 113-124.
- 1985. Floral trimorphism and monomorphism in continental and island populations of Eichhornia paniculata (Spreng.) Solms. (Pontederiaceae). Biol. J. Linn. Soc. 25: 41-60.
- 1988. Evolution of breeding systems in Eichhornia (Pontederiaceae): A review. Ann. Missouri Bot. Garden 75: 741-760.
- 1989. Mating system evolution and speciation in heterostylous plants. Pags. 257-283. in: D. Otte y J.A. Endler, eds. Speciation and its consequences. Sinauer Associates, Inc.
- BARRETT, S.C.H. y D.E. GLOVER. 1985. On the Darwinian hypothesis of the adaptative significance of tristylly. Evolution 39(4): 766-774.
- BARRETT, S.C. y J.S. SHORE. 1987. Variation and evolution of breeding systems in the Turnera ulmifolia complex (Turneraceae). Evolution 41(2): 340-354.
- BAWA, K.S. 1974. Breeding systems of tree species of a lowland tropical community. Evolution 28: 85-92
- 1979. Breeding systems of trees in a tropical lowland wet forest. N. Z. J. Bot., Spec. Iss. 17: 521-524.
- BAWA, K.S. y BEACH, J.H. 1983. Self-incompatibility systems in the Rubiaceae of a tropical lowland wet forest. Amer. J. Bot. 70(9): 1281-1288.
- BAWA, K.S. y C.J. WEBB. 1984. Flower, fruit and seed abortion in tropical forest trees: Implications for the evolution of paternal and maternal reproductive patterns. Amer. Jour. Bot. 71: 736-751.
- BAWA, K.S. y D.M. O'MALLEY. 1987. Estudios genéticos y de sistemas de cruzamiento en algunas especies arbóreas de bosques tropicales. Rev. Biol. Trop. (Supl.1): 177-188.
- BAWA, K.S., D.R. PERRY y J.H. BEACH. 1985. Reproductive biology of tropical lowland rain forest trees. I. sexual systems and self-incompatibility mechanisms. Amer. J. Bot. 72: 331-345.

- BEACH, J.H. y K.S. BAWA. 1980. Role of pollinators in the evolution of dioecy from distyly. Evolution 34(6): 1138-1142.
- BEACH, J.H y W.J. KRESS. 1980. Sporophyte versus gametophyte: A note on the origin of self-incompatibility in flowering plants. Syst. Bot. 5: 1-5
- BIR BAHADUR. 1963. Heterostyly in Oldenlandia umbellata L. J. of Genetics 58: 429-440.
- . 1968. Studies of natural populations in heterostylous Oldenlandia umbellata L. J. Genet. 60: 80-97.
- BONGERS, F., J. POPMA, J. MEAVE DEL CASTILLO y J. CARABIAS. 1988. Structure and floristic composition of the lowland rain forest of Los Tuxtlas, México. Vegetatio 74: 55-80.
- BROWN, A.H.D. 1978. Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. Theor. Appl. Genet. 52: 145-157.
- . 1979. Enzyme polymorphism in plant populations. Theor. Pop. Biol. 15: 1-42.
- BROWN, A.H.D. y R.W. ALLARD. 1971. Estimation of the mating system in open pollinated maize populations using enzyme polymorphisms. Genetics 66: 135-145.
- BROWN, A.H.D., A.C. MATHESON, K.G. ELDRIDGE. 1975. Estimation of the mating system of Eucalyptus obliqua. L'Herit by using allozyme polymorphism. Aust. J. Bot. 23: 931-949.
- BROWN, A.H.D. y G.F. MORAN. 1981. Isozymes and the genetic resources of forest trees. Pags. 1-10. in: M.T. Conkle, ed. Proceedings of the symposium on isozymes of North American forest trees and forest insects. Gen. Tech. Rep. PSW-48. Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, Forest Service, U.S. Department of Agriculture.
- BULLOCK, S.H. 1985. Breeding systems in the flora of a tropical deciduous forest in Mexico. Biotropica 17: 287-301.
- CAHALAN, C.M. y C. GLIDDON. 1985. Genetic neighbourhood sizes in Primula vulgaris. Heredity 54: 65-70
- CASPER, B.B. y E.L. CHARNOV. 1982. Sex allocation in heterostylous plants. J. Theoret. Biol. 96: 143-149.
- CHARLESWORTH, D. y B. CHARLESWORTH. 1979. A model for the evolution of distyly. Am. Natur. 114: 467-498.

- CHIZON, S.E. 1984. Relación suelo-vegetación en la Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas, Ver. (Un análisis de la distribución de los diferentes tipos de suelo en relación con la cubierta vegetal que soporta). Tesis. ENEP-Zaragoza, U.N.A.M., México.
- CLEGG, M.T. 1980. Measuring plant mating systems. Bio-Science 30(12): 814-818.
- CLEGG, M.T. y A.H.D. BROWN. 1983. The founding of plant populations. Pags. 216-228. in: Schonewald-Cox, S.M. Chambers, B. Macbryde y L. Thomas, eds. Genetic and Conservation. Benjamin/Cummings Pub. Co. Inc. USA.
- CLEGG, M.T. y B.K. EPPERSON. 1985. Recent developments in population genetics. Pags. 235-268. in: Advances in Genetics. Academic Press. USA
- CONKLE, M.T., P.D. HODGSKISS, L.B. NUNNALLY y S.C. HUNTER. 1982. Starch gel electrophoresis of conifer seeds: A laboratory manual. Gen. Tech. Rep. PSW-64. Berkeley, CA: Pacif. Southw. For. and Rang. Exp. Stat., For. Serv. U.S. Dept. of Agric: 18pp.
- CROW, J.F. y M. KIMURA. 1970. An introduction to population genetics theory. Harper & Row Pub. London.
- CROWE, L.K. 1964. The evolution of outbreeding in plants I. The Angiosperms. Heredity 19: 435-457.
- CRUDEN, R.W. 1977. Pollen-ovule ratios: a conservative indicator of breeding systems in flowering plants. Evolution 31: 32-46.
- CRUDEN, R.W. y S. MILLER-WARD. 1981. Pollen-ovule ratio, pollen size, and the ratio of stigmatic area to the pollen-bearing area of the pollinator: an hypothesis. Evolution 35(5): 964-974.
- CRUDEN, R.W., S.M. HERMANN y S. PETERSON. 1983. Patterns of nectar production and plant-pollinator coevolution. Pags. 80-122 in: B. Bentley and T. Elias, eds. The Biology of Nectaries. Columbia University Press, New York.
- DARWIN, C. 1877. The different forms of flowers on plant of the some species. John Murray, London.
- DEWEY, S.E. y J.S. HEYWOOD. 1988. Spatial genetic structure a population of Psychotria nervosa. I. Distribution on genotypes. Evolution 42(4): 834-838.

- DULBERGER, R. 1970. Floral dimorphism in Anchusa hybrida. Ten. Isr. J. Bot. 19: 37-41.
- , 1973. Distyly in Linum pubescens and Linum mucronatum. Bot. J. Linn. Soc. 66: 117-126.
- , 1974. Structural dimorphism of stigmatic papillae in distylous Linum species. Am. J. Bot. 61: 238-243.
- EGUIARTE, L. y A. BURQUEZ. 1987. Reproductive ecology of Manfreda brachystachya, an iteroparous species of Agavaceae. Southw. Nat. 32(2): 169-178.
- EGUIARTE, L., C. MARTINEZ DEL RIO y H. ARITA. 1987. El néctar y el polen como recursos: El papel ecológico de los visitantes a las flores de Pseudobombax ellipticum (H.B.K.) Dugand. Biotropica 19(1): 74-82.
- ELLSTRAND, N.C. y D.A. LEVIN. 1980. Recombination system and population structure in Oenothera. Evolution 34(5): 923-933.
- ENDLER, J.A. 1973. Gene flow and population differentiation. Science 179: 243-250.
- , 1977. Geographic Variation, Speciation, and Clines. Princeton Univ. Press., Princeton, NJ.
- , 1986. Natural selection in the wild. Princeton University Press, Princeton, N.J.
- ENNOS, R.A. 1985. The mating system and genetic structure in a perennial grass, Cynosurus cristatus L. Heredity 55: 121-126.
- ENNOS, R.A. y M.T. CLEGG. 1982. Effect of population substructuring on estimates of outcrossing rate in plant populations. Heredity 48(2): 283-292.
- ERNST, A. 1955. Self-fertility in monomorphic Primulas. Genetica 27: 91-148.
- ESTRADA, A., R. COATES-ESTRADA y M. MARTINEZ-RAMOS. 1985. La Estación de Biología Tropical "Los Tuxtlas": un recurso para la conservación y estudio del trópico húmedo en México. Pags. 379-394 in: A. Gómez-Pompa y S. del Amo, eds. Investigaciones sobre la Regeneración de Selvas Altas en Veracruz, México. Vol. II. Alhambra Mexicana, México.
- FALCONER, D.S. 1986. Introducción a la Genética Cuantitativa. 2da. ed. C.E.C.S.A., México.

- FEINSINGER, P. y W.H. BUSBY. 1987. Pollen carryover: experimental comparisons between morphs of Palicourea lasiorrachis (Rubiaceae), a distyly, bird-pollinated, tropical treelet. Oecologia 73: 231-237.
- FORD, E.B. 1971. Ecological genetics. 3a. ed. Chapman and Hall Ltd., London.
- FRANKEL, R y E. GALUN, 1977. Pollination mechanisms, reproduction and plant breeding. Springer-Verlag, N.Y.
- FRANKEL, O.H. y M.E. SOULE. 1981. Conservation and Evolution. Cambridge University Press. Cambridge. 327 pp.
- FRANKLIN, I.R. 1980. Evolutionary change in small populations. Pags. 135-150 in: M.E. Soulé y B.A. Wilcox, eds. Conservation biology. An evolutionary-ecological perspective. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- FUTUYMA, D.J. 1986. Evolutionary biology. 2nd edition. Sinauer Associates, Inc. Publishers, USA
- GANDERS, F.R. 1974. Disassortative pollination in the distylous plant Jepsonia heterandra. Can. J. Bot. 24: 2401-2406.
- . 1975a. Mating patterns in self-compatible distylous populations of Amsinckia (Boraginaceae). Canad. J. Bot. 53: 773-779.
- . 1975b. Fecundity in distylous and self-incompatible homostylous plants of Mitchella repens (Rubiaceae). Evolution 29: 186-188.
- . 1976. Pollen flow in distylous populations of Amsinckia (Boraginaceae). Can. J. Bot. 54: 2530-2535.
- . 1979a. Heterostyly in Erythroxyllum coca (Erythroxyllaceae). Bot. J. of Linn. Soc. 78: 11-20.
- . 1979b. The biology of heterostyly. New Zealand J. of Bot. 17(4): 607-636.
- GANDERS, F.R., S.K. DENNY y D. TSAI. 1985. Breeding systems and genetic variation in Amsinckia spectabilis (Boraginaceae). Can. J. Bot. 66: 533-538.
- GARCIA, E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). 3a. ed. México.

- GLOVER, D.E. y S.C.H. BARRETT. 1986. Variation in the mating of Eichhornia paniculata (Spreng.) Solms. (Pontederiaceae). Evolution 40(6): 1122-1131.
- GONZALEZ DE LEON, D.R. 1985. Horizontal starch gel electrophoresis of plant isozymes: a laboratory guide . (manuscrito).
- GOTTLIEB, L.D. 1977. Electrophoretic evidence and plant systematics. Ann. Mo. Bot. Gard. 64: 161-180.
- GRANT, V. 1975. Genetics of flowering Plantas. Columbia Univ. Press, N.Y.
- HABER, W.A. y G.W. FRANKIE. 1989. A tropical hawkmoth community: Costa Rican dry forest sphingidae. Biotropica 21(2): 155-172.
- HAMRICK, J.L. 1982. Plant population genetics and evolution. Amer. J. Bot. 69(10): 1685-1693.
- 1983. The distribution of genetic variation within and among plant populations. Pags. 335-348 in: C.M. Schonewald-Cox, S.M. Chamber, B. MacBryde y W.L. Thomas, eds. Genetics and Conservation. The Benjamin/Cummings, Menlo Park, New Jersey.
- 1987. Gene flow and distribution of genetic variation in plant population. Pags. 53-66 in: Differentiation Patterns in Higher Plants. Academic Press. USA.
- HAMRICK, J.L., Y.B. LINHART y J.B. MITTON. 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically-detectable genetic variation in plants. Ann. Rev. Ecol. Syst. 10: 173-200.
- HAMRICK, J.L., J.B. MITTON y Y.B. LINHART. 1981. Levels of genetic variation in trees: influence of life history characteristics. Pags. 35-41 in: M.T. Conkle, ed. Proceeding of the symposium on isozymes of North American forest trees and forest insects. Gen. Tech. Rep. PSW-48. Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, Forest Service, U.S. Department of Agriculture.
- HAMRICK, J.L. y M.D. LOVELESS. 1986. The influence of seed dispersal mechanisms on the genetics structure of plant populations. Pags. 211-233 in: A. Estrada y T.H. Fleming, eds. Fruigivores and Seed Dispersal. W. Junk. Dordrecht.
- HAMRICK, J.L. y M.D. LOVELESS. 1986. Isozyme variation in tropical trees: procedures and preliminary results. Biotropica 18(3): 201-207.

- HARTSHORN, G.S. 1980. Neotropical forest dynamics. Biotropica 12(Suppl.): 23-30
- HEDRICK, P.W. 1983. Genetics and Population. Science Books Int. USA.
- HEYWOOD, J.S. y T.H. FLEMING. 1986. Patterns of allozyme variation in three Costa Rican species of Piper. Biotropica 18(3): 208-213.
- HUBBELL, S.P. y R.B. FOSTER. 1986. Commonness and rarity in neotropical forest: implications for tropical tree conservation. Pags. 205-332 in: M.E. Soulé. Conservation biology. The science of scarcity and diversity. Sinauer. Junderland, Massachusetts.
- IBARRA-MANRIQUEZ, G. 1985. Estudios preliminares sobre la flora leñosa de la Estación de Biología Tropical de Los Tuxtlas, Veracruz, México. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, U.N.A.M., México.
- IBARRA-MANRIQUEZ, G. y S. SINACA-COLIN. 1987. Listados florísticos de México. VII. Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas, Veracruz. Instituto de Biología, U.N.A.M., México.
- JAIN, S.K. y A.D. BRADSHAW. 1966. Evolutionary divergence among adjacent plant population. I. The evidence and its theoretical analysis. Heredity 21: 407-441.
- LANDE, R. y D.W. SCHEMSKE. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding. Evolution 39(1): 24-40.
- LAYTON, CH.R., F.R. GANDERS. 1984. The genetic consequences of contrasting breeding systems in Plectritis (Valerianaceae). Evolution 38(6): 1308-1325.
- LEDIG, T.F. 1986. Heterozygosity, heterosis and fitness in outbreeding plants. In: M.E. Soulé, ed. Conservation Biology. Sinauer Associates Pub. USA.
- LEVIN. D.A. 1968. The breeding system of Lithospermum carolinense: adaptation and counter adaptation. Amer. Nar. 102: 427-441.
- , 1978. Genetic variation in annual Phlox: self-compatible versus self-incompatible species. Evolution 32: 245-263.
- LEVIN, D.A. y H.W. KERSTER. 1974. Gene flow in seed plants. Evol. Biol. 7: 139-220.

- LEWIS, D. 1949. Incompatibility in flowering plants. Biol. Rev. 24: 472-496.
- . 1954. Comparative incompatibility in angiosperms and fungi. Adv. Genet. 6: 235-285.
- . 1973. The origin of diploid neospecies in Clarkia. Am. Natur. 107: 161-170.
- . 1982. Incompatibility, stamen movement and pollen economy in a heterostyled tropical forest tree, Cratogeomys formosum (Guttiferae). Proc. Roy. Soc. London, 214: 273-283.
- LEWONTIN, R.C. 1974. The genetic basis of evolutionary change. Columbia University Press, USA.
- LINHART, Y.B. 1973. Ecological and behavioural determinants of pollen dispersal in hummingbird-pollinated Heliconia. Am Nat. 107: 511-523.
- LINHART, Y.B., J.B. MITTON, K.B. STURGEON y M.L. DAVIS. 1981. Genetic variation in space and time in population of ponderosa pine. Heredity 46: 407-426.
- LLOYD, D.G. 1979. Evolution towards dioecy in heterostylous populations. Plant. Syst. Evol. 131: 71-80.
- LLOYD, D.G. y J.M.A. YATES. 1982. Intrasexual selection and the segregation of pollen and stigmas in hermaphrodite plants, exemplified by Wahlenbergia albomarginata (Campanulaceae). Evolution 36: 903-913.
- LORENCE, D.H. y J.D. DWYER. 1987. New taxa in Mexican Psychotria (Rubiaceae, Psychotriaceae). Bol. Soc. Bot. México 47: 49-64.
- LOT-HELGUERAS, A. 1976. La Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas: pasado, presente y futuro. Pags. 31-69 in: A. Gómez-Pompa, C. Vázquez-Yanes, S. Del Amo y A. Butanda, eds. Investigaciones sobre la regeneración de selvas altas en Veracruz, México. C.E.C.S.A., México, D.F.
- LOVELESS, M.D. y J.L. HAMRICK. 1984. Ecological determinant of genetic structure in plant populations. Ann. Rev. Ecol. Syst. 15: 65-95.
- LOVELESS, M.D. y J.L. HAMRICK. 1987. Distribución de la variación en especies de árboles tropicales. Rev. Biol. Trop., (Supl.1): 165-175.
- MARTIN, F.W. 1965. Distyly and incompatibility in Turnera ulmifolia. Bull. Tor. Bot. Club, 92: 185-192.

- . 1967. Distyly, self-incompatibility, and Melochia. Evolution 21: 493-499.
- MARTINEZ-RAMOS, M. 1985. Claros, ciclos vitales de los árboles tropicales y la regeneración de las selvas altas perennifolias. Pags. 31-69 in: A. Gómez-Pompa y S. Del Amo, eds. Investigaciones sobre la regeneración de selvas altas en Veracruz, México. II. Alhambra Mexicana S.A. de C.V., México.
- MIRANDA, F. y E. HERNANDEZ-X. 1963. Los tipos de vegetación en México y su clasificación. Bol. Soc. Bot. Mex. 28: 29-279.
- MITTON, J.B., Y.B. LINHART, M.L. DAVIS y K.B. STURGEON. 1981. Estimation of outcrossing in ponderosa pine, Pinus ponderosa Laws., from patterns of segregation of protein polymorphisms and from frequencies of albino seedlings. Silvae Genetica 30: 117-121.
- MORAN, G.F. y J.C. BELL. 1983. Eucalyptus. Pags. 423-441. In: S.D. Tanksley y T.J. Orton (eds.). Isozymes in plant genetics and breeding. Part B Elsevier Science Publishers, B.V. Amsterdam.
- MORAN, G.F., O. MUONA y J.C. BELL. 1989. Breeding systems and genetic diversity in Acacia auriculiformis and A. cras-sicarpa. Biotropica 21(3): 250-256.
- MULCAHY, D. L. 1964. The reproductive biology Oxalis priceae. Am. J. Bot. 51: 1045-1050.
- . 1974. Correlation between speed of pollen tube growth and seedling height in Zea mays L. Nature 249: 491-493.
- NEI, M. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, USA.
- NEI, M. y m. SYAKUDO. 1958. The estimation of outcrossing in natural populations. Jpn. J. Genet. 33: 46-51.
- NETTANCOURT, D. 1977. Incompatibility in Angiosperms. Springer-Verlag, N.Y.
- NEVO, E. 1978. Genetic variation in natural populations: patterns and theory. Theor. Pop. Biol. 13: 121-177.
- NIC LUGHADHA, E.M. y J.A.N. PARNELL, F.L.S. 1989. Heterostyly and gene-flow in Menyanthes trifoliata L. (Menyanthaceae). L. Bot. J. Linn. Soc. 100: 337-354.

- NUÑEZ-FARFAN, J. 1985. Aspectos ecológicos de especies pioneras en una selva húmeda de México. Tesis Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- OLESEN, J.M. 1987. Heterostyly, homostyly, and long-distance dispersal of Menyanthes trifoliata to Greenland. Can. J. Bot. 65: 1509-1513.
- O'MALLEY, D.M. y K.S. BAWA. 1987. Mating system of a tropical rain forest tree species. Amer. J. Bot. 74(8): 1143-1149.
- OPLER, P.A., BAKER, H.G. y G.W. FRANKIE. 1975. Reproductive biology of some Costa Rican Cordia species (Boraginaceae). Biotropica 7: 234-247.
- ORNDUFF, R. 1966. The origin of dioecism from heterostyly in Nym- phoides (Menyanthaceae). Evolution 20: 309-314.
- , 1969. Reproductive biology in relation to systematics. Taxon 18: 121-133.
- , 1971. The reproductive system of Jepsonia heterandra. Evolution 25: 300-311.
- , 1972. The breakdown of trimorphic incompatibility in Oxalis section Corniculatae. Evolution 26: 52-65.
- , 1975. Heterostyly and pollen flow in Hypericum aegypticum (Guttiferae). Bot. J. Linn. Soc. 71: 51-57.
- , 1976. The reproductive system of Amsinckia grandiflora, a distylous species. Sys. Bot. 4: 57-66.
- , 1979. Pollen flow in a population of Primula vulgaris Huds. Bot. J. Linn. Soc. 78: 1-10.
- , 1980a. Pollen flow in Primula veris (Primulaceae). Plant. Sys. Evol. 135: 89-94.
- , 1980b. Heterostyly, population composition, and pollen flow in Hedyotis caerulea. Amer. J. Bot. 67(1) 95-103.
- , 1986. Comparative fecundity and population composition of heterostylous and non-heterostylous species of Villarsia (Menyanthaceae) in Western Australia. Amer. J. Bot. 73(2): 282-286.
- , 1988. Distyly and monomorphism in Villarsia (Menyanthaceae): some evolutionary considerations. Ann. Mo. Bot. Gard. 75: 761-767.

- PARRA, T.V. 1988. Ecología de la polinización en una población de Echeveria gibbiflora D.C. en el Pedregal de San Angel, C.U. México. Tesis de Licenciatura (Biología). Facultad de Ciencias, UNAM. México.
- PIÑERO, D. 1982. Correlation between enzyme phenotypes and physical environment in California populations of Avena barbata and Avena fatua. Ph.D. Thesis. University of California, Davis, USA.
- PIÑERO, D. y L. EGUIARTE. 1988. The origin and biosystematic status of Phaseolus coccineus ssp. polyanthus: electrophoretic evidence. Euphytica 37: 199-203.
- PHILIPP, M. y O. SCHOU. 1981. An unusual heteromorphic incompatibility system. Distyly, self-incompatibility, pollen load and fecundity in Anchusa officinalis (Boraginaceae). New Phytol. 89: 693-703.
- PRAKASH, S., R. LEWONTIN y J. HUBBY. 1969. A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. IV. Patterns of genic variation in central, marginal and isolated populations of Drosophila pseudoobscura. Genetics 61: 841-858.
- PRICE, S.D. y S.C.H. BARRET. 1984. The function and adaptive significance of tristily in Pontederia cordata L. (Pontederiaceae). Biol. J. of Linn. Soc. 21: 315-329.
- RICHARDS, A.J. 1986. Plant Breeding Systems. George Allen & Unwin (Publishers) Ltd. London.
- RICHARDSON, B.J. P.R. BAVERSTOCK y M. ADAMS. 1986. Allozyme electrophoresis. Academic Press, Australia.
- RICK, C.M., J.F. FOBES y S.D. TANSLEY. 1979. Evolution of mating systems in Lycopersicon hirsutum as deduced from genetics variation in electrophoretic and morphological characters. Plant Syst. Evol. 132: 279-298.
- RIOS-MACBETH, F. 1952. Estudio geológico de la región de Los Tuxtlas, Veracruz. Asoc. Mex. Geol. Petrol. Bol. 4: 325-376.
- RITLAND, K. 1983. Estimation of mating systems. Pags. 289-302 in: S.D. Tanksley y T.J. Orton, eds. Isozymes in plant genetics. Part A. Elsevier. Sci. Amsterdam.
- RITLAND, K. y S. JAIN. 1981. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using independent loci. Heredity 47(1): 35-52.

- RIVEROS, M., M.T. KALIN ARROYO y A.M. HUMAÑA. 1987. An unusual kind of distyly in Quinchamalium chilense (Santalaceae) on volcán Casablanca, Southern Chile. Amer. J. Bot. 74(3): 313-320.
- ROUGHGARDEN J. 1979. Theory of population genetics and evolutionary ecology: an introduction. Mc. Millan, USA.
- RZEDOWSKI, J. 1978. Vegetación de México. Ed. Limusa, México.
- SANDERS, T.B. y J.L. HAMRICK. 1980. Variation in the breeding system of Elymus canadensis. Evolution 34: 117-122.
- SCHAAL, B.A. 1974. Isolation by distance in Liatris cylindracea. Nature 252: 703.
- B.A. 1975. Population structure and local differentiation in Liatris cylindraceae. Amer. Nat. 109: 511-528.
- SCHAAL, B.A. y D.A. LEVIN. 1976. The demographic genetics of Liatris cylindracea Michx. (Compositae). Amer. Natur. 110: 191-206.
- SCHAFFER, W.S. y V. SCHAFFER 1979. The adaptative significance of variations in reproductive habit in Agavaceae. II. Pollinator foraging behaviour and selection for increased reproductive expenditure. Ecology 34: 489-493
- SCHEMSKE, D.W. 1980. Evolution of floral display in Brassalova nodosa. Evolution 34: 490-493.
- SCHEMSKE, D.W. y R. LANDE. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding. Evolution 39(1): 41-52.
- SCHONEWALD-COX, C.M., S.M. CHAMBERS, B. Mc.BRYDE y I. THOMAS (eds.). 1983. Genetics and Conservation: a reference for managing wild animal and plant populations. Bemjamin-Cummings, Menlo Park, California.
- SCHOU, O. 1983. The distyly in Primula elatior (L.) Hill (Primulaceae), with a study of flowering phenology and pollen flow. Bot. J. Linn. Soc. 86: 261-274.
- SHEA, K.L. 1987. Effects of population structure and cone production of outcrossing rate in Engelmann spruce and subalpine fir. Evolution 41(1): 124-136.
- SLATKIN, M. 1980. The distribution of mutant alleles in a subdivided population. Genetics 95: 503-523.
- 1985. Rare alleles as indicators of gene flow. Evolution 39(1): 53-65.

- . 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. Science 236: 787-792.
- SMYTH, C.A. y J.L. HAMRICK. 1984. Variation in estimates of out-crossing in musk thistle populations. J. Heredity 75: 303-307.
- SOBREVILA, C., N. RAMIREZ y N. XENA DE ENRECH. 1983. Reproductive biology of Palicourea fendleri and P. petiolaris (Rubiaceae), heterostylous shrubs of a tropical cloud forest in Venezuela. Biotropica 15(3): 161-169.
- SOHMER, S. 1977. Psychotria L. (Rubiaceae) in the Hawaiian Island. Lyonia 1: 103-186.
- SOKAL, R.R. y F.J. ROHLF. 1981. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. 2nd. Ed. W.H. Freeman, San Francisco.
- SOLTIS, D.E., C.H. HAUFLE, D.C. DARROW y G.J. GASTONY. 1983. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. Amer. Fern J. 73: 9-27.
- SOTO, E.M. 1976. Algunos aspectos climáticos de la región de Los Tuxtlas, Veracruz. Pags. 70-110 in: A. Gómez-Pompa, C. Vázquez-Yanes, S. Del Amo y A. Butanda, eds. Investigaciones sobre la regeneración de selvas altas en Veracruz, México. C.E.C.S.A., México, D.F.
- STEBBINS, G.L. 1970. Adaptive radiation in Angiosperms. I. Pollination mechanisms. Annu. Rev. Ecol. Syst. 1: 307-326.
- STOCKHOUSE, R.E. 1976. A new method for studying pollen dispersal using micronized fluorescent dusts. Am. Midl. Nat. 96: 241-245.
- SYTSMA, K.J. y B.A. SCHAAL. 1985. Genetic variation, differentiation, and evolution in a species complex of tropical shrubs based on isozymic data. Evolution 39(3): 582-593.
- TANKSLEY, S.D. y T. J. ORTON. 1983. Isozymes in plant genetics and breeding, Part A. Elsevier, Science Publishers. Amsterdam.
- TANKSLEY, S.D. y T.J. ORTON. 1983. Isozymes in plant genetics and breeding, Part B. Elsevier, Science Publishers. Amsterdam.
- VALLEJOS, C.E. 1983. Enzyme activity staining. Pags. 469-516 in: S.D. Tanksley and T. J. Orton (Eds.). Isozyme in plants genetics and breeding. Part. A. Elsevier, Science Publishers. Amsterdam.

- VUILLEUMIER, B.S. 1967. The origin and evolutionary development of heterostyly in the angiosperms. Evolution 21: 210-226.
- WASER, N.M. 1987. Spatial genetic heterogeneity in a population of the montane perennial plant Delphinium nelsonii. Heredity 58: 249-256.
- WELLER, S.G. 1980. Pollen flow and fecundity in populations of Lithospermum carolinense. Am. J. Bot. 67: 1334-1341.
- 1981. Pollination biology of heteromorphic population of Oxalis alpina (Rose) Knuth (Oxalidaceae) in south-eastern Arizona. Bot. J. Linn. Soc. 83: 189-198.
- WELLER, S.G. y M.F. DENTON. 1976. Cytogeographic evidence for the evolution of distyly from tristyly in North American species of Oxalis section Ionoxalis. Am. J. Bot. 63: 120-125.
- WELLER, S.G. y R. ORNDUFF. 1977. Cryptic self-incompatibility in Amsinckia grandiflora. Evolution 31: 47-51.
- WILLSON, M.F. 1979. Sexual selection in plants. Am. Nat. 113: 777-790.
- WYATT, R. 1983. Pollinator-plant interactions and the evolution of breeding systems. Pags. in: L. Real, ed. Pollination Biology. Academic Press, N. York.
- WYATT, R. y R.L. HELLWIG. 1979. Factors determining fruit set in heterostylous bluets, Houstonia caerulea (Rubiaceae). Systematic Botany 4(2): 103-114.
- YEH, F.F. 1981. Analysis of gene diversity in some species of conifers. Pags. 48-52. M.T. Conkle, ed. Proceedings of the symposium on isozymes of North American forest tress and forest insects. Gen. Tech. Rep. PSW-48. Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, Forest Service, U.S. Department of Agriculture.
- YEO, P.F. 1975. Some aspects of heterostyly. New Phytol. 75: 147-153.
- ZAR, J.H. 1984. Biostatistical Analysis. 2da. Ed. Prentice-Hall, Inc. N.J.