



65
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

MONTAJE DE UN SISTEMA DE LOCI POLIMORFICOS PARA
UNA ESPECIE ARBOREA NEOTROPICAL *Cecropia obtusifolia*



T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G A

P R E S E N T A:

ADRIANA GARAY ARROYO

MEXICO. D. F.

MAYO DE 1991

FALLA DE ORIGEN



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

CAPITULO 1	Introducción general	Página 1
CAPITULO 2	Compuestos secundarios	Página 4
CAPITULO 3	Montaje de loci polimórficos	Página 21
CAPITULO 4	Variación aloenzimática en una población de <i>Cecropia obtusifolia</i> en la selva de Los Tuxtlas, Veracruz	Página 37
APENDICE 1	Técnica de electroforesis	Página 51
APENDICE 2	Herencia mendeliana	Página 58
APENDICE 3	Probabilidades de exclusión de paternidad	Página 59
REFERENCIAS		Página 62

CAPITULO I

INTRODUCCION GENERAL

PRESENTACION Y OBJETIVOS

La genética juega un papel fundamental en entender la estructura de las poblaciones y su dinámica a largo plazo. El objetivo primordial de la genética de poblaciones es evaluar el efecto de diferentes mecanismos de transmisión genética, condiciones ecológicas y fuerzas evolutivas (sistemas reproductivos, deriva génica, flujo génico, selección natural y mutación) sobre la composición y estructura (espacial y temporal) genética de las poblaciones.

La composición y estructura genética de poblaciones naturales debe caracterizarse con base en marcadores hereditarios. En particular, los loci enzimáticos, que son en su mayoría selectivamente neutros (Lewontin 1974; sin embargo revisar Gottlieb 1981; Gottlieb 1982; Johnson 1974; Johnson 1979; Koehn, Diehl et al. 1988; Zouros 1979), son marcadores útiles para estudiar los factores evolutivos que actúan sobre el genoma completo de los individuos (por ejemplo sistemas de entrecruzamiento). Este tipo de marcadores han sido ampliamente utilizados en estudios de poblaciones vegetales (Brown, Matheson et al. 1975; Brown y Clegg 1983; Crawford 1985; Hamrick y Loveless 1986b; Kesseli y Michelmore 1986; Shoen 1982; Systsma y Schaal 1985).

Este estudio es parte de un proyecto general sobre la biología de poblaciones del árbol pionero neotropical Cecropia obtusifolia. El trabajo que aquí se presenta tuvo tres objetivos particulares:

- 1) Montar un sistema de loci polimórficos enzimáticos para todos los estadios del ciclo de vida de Cecropia obtusifolia y proporcionar una interpretación genética de los loci.
- 2) Obtener estimaciones preliminares de la variación genética de la especie dentro de la selva de Los Tuxtlas, Veracruz.
- 3) Evaluar la utilidad del sistema de loci polimórficos montado, para abordar preguntas acerca de la estructura genética y reproductiva de poblaciones de Cecropia obtusifolia.

Esta tesis se centra en los aspectos técnicos del montaje del sistema de loci polimórficos para Cecropia obtusifolia y en la evaluación del mismo para estudiar diversos aspectos de la biología de poblaciones de la especie. El trabajo estará estructurado en dos partes. En la primera parte se analiza el montaje del sistema de loci polimórficos que comprende dos capítulos: en un primer capítulo se discuten los experimentos que se utilizaron para establecer el buffer de extracción que permitiera la mejor expresión proteica de macerados de tejido foliar de todos los estadios del ciclo de vida de Cecropia obtusifolia. En el segundo capítulo se describe el montaje de los loci en diferentes sistemas de buffer, su interpretación genética y un análisis de progenie para interpretar los patrones de herencia. Por último, en la segunda parte, se proporcionan datos preliminares de la variación genética de una población de Cecropia obtusifolia en Los Tuxtlas, Veracruz. Con base en estos datos se evalúa, en esta misma parte, el sistema de loci montados para estudiar la estructura genética y reproductiva de la población.

Cecropia obtusifolia es una especie arbórea, dioica y neotropical. En selvas altas perennifolias llega a la madurez en claros del dosel mayores de 100 m² formados por la caída de árboles por lo que se le considera como una especie pionera. Por lo tanto, en estas comunidades, los individuos coetáneos de Cecropia obtusifolia se encuentran segregados espacialmente en parches de vegetación con diferentes edades de perturbación. Para esta especie, se cuenta con estudios demográficos previos (Alvarez-Buylla 1986; Alvarez-Buylla y García-Barrios 1991; Alvarez-Buylla y Martínez-Ramos 1990) en la selva de Los Tuxtlas, Veracruz dentro de una parcela de 5 hectáreas.

Hay pocos estudios que integran información genética y demográfica para el ciclo de vida completo de especies vegetales (Burdon, Marshall et al. 1983; Clegg, Kahler et al. 1978a; Clegg, Kahler et al. 1978b; Schaal y Levin 1976). Un estudio de esta naturaleza en Cecropia obtusifolia puede servir de sistema modelo para entender el conjunto de factores genéticos y demográficos que determinan la regeneración de especies de larga vida en ambientes de mosaico naturales o en ambientes fragmentados por perturbación humana. Un análisis integrado de la información demográfica y genética permitirá explorar hipótesis acerca de las fuerzas microevolutivas que afectan la composición genética de la

población, y del papel relativo de factores demográficos y genéticos en la conservación y manejo de especies perennes en ambientes fragmentados (Lande 1988). Este estudio permitirá además, avanzar en el entendimiento de los procesos evolutivos que afectan la estructura y dinámica a largo plazo de especies perennes en sistemas poco conocidos e importantes como son las selvas tropicales (ver también Eguiarte 1990; Hamrick y Loveless 1986b; O'Malley y Bawa 1987).

ANTECEDENTES

Los estudios de la estructura genética de las poblaciones de plantas están sesgados, principalmente, hacia especies templadas, usualmente anuales, perennes de vida corta o coníferas. Las especies perennes herbáceas de vida larga, angiospermas arbóreas y monocotiledóneas (excepto pastos) no se han estudiado extensivamente, y la genética de poblaciones de especies alpinas y tropicales prácticamente no se conoce (Loveless y Hamrick 1984). Carecer de información acerca de la estructura genética de las poblaciones de plantas es un problema serio ya que cualquier conocimiento de la especiación, adaptación o cambio genético debe tomar en cuenta los patrones genéticos y los procesos por los cuales éstos se modifican.

En plantas, los marcadores enzimáticos han sido utilizados para: 1) estudiar los componentes de la Selección Natural (Allard, Kahler et al. 1972; Clegg, Kahler et al. 1978a), 2) analizar los sistemas reproductivos (Brown 1990; Brown, Matheson et al. 1975; Shoen 1982), 3) realizar estudios taxonómicos y filogenéticos (Buth 1984; Kesseli y Michelmore 1986; Sytsma y Schaal 1985), 4) describir los parámetros genéticos poblacionales y correlacionarlos con las características de historia de vida de las especies (Hamrick y Loveless 1986a), 5) identificar y conservar variedades cultivadas (Brown 1978; Ellstrand y Lee 1987), y 6) estudiar los patrones de especiación en plantas (ver revisión en Crawford 1985).

Los primeros estudios de variación genética en poblaciones naturales se hicieron con base en variación morfológica (Ford 1975), cromosómica (Dobzhansky 1941), y de grupos sanguíneos (Landsteiner y Weiner 1940) en animales, y de caracteres de autoincompatibilidad en plantas (Crosby 1940; Emerson 1939). Los patrones de variación a estos niveles han sido utilizados ocasionalmente para inferir el efecto de diversas

fuerzas evolutivas. Sin embargo, como este tipo de variación generalmente tiene efectos claros en la adecuación de los individuos, se ha estudiado principalmente para estudiar el papel de la selección natural en diversas especies en condiciones naturales (polimorfismo de color en *Cepaea nemoralis*, Cain y Sheppard 1950; Cain y Sheppard 1954; Fisher y Diver 1934; y *Biston betularia*, Kettlewell 1958; Kettlewell 1973; Lees y Creed 1973; y polimorfismo en resistencia a la malaria en el hombre, Cavalli-Sforza 1973).

El advenimiento de las técnicas moleculares en la década de 1950, permitió por un lado, contar con un mayor número de marcadores genéticos, y por otro, estudiar el efecto de otras fuerzas evolutivas sobre la composición genética de las poblaciones en un gran número de especies. La técnica de electroforesis para separar variantes iso- y aloenzimáticas se utilizó en estudios evolutivos a partir de 1966 (e.g., Lewontin y Hubby 1966). El desarrollo de la teoría evolutiva y la acumulación de datos empíricos mostró que gran parte de la variación detectada a nivel proteico es neutra (Haldane 1957; Kimura 1968; Kimura 1983; Kimura y Ohta 1971; Nei 1987; Powell y Lichtenfels 1979). El análisis empírico del efecto de otras fuerzas evolutivas (derivación génica, tasas de mutación, migración y sistemas de entrecruzamiento) ha consistido principalmente en inferir su posible acción, a partir de los estimadores de la estructura genética de las poblaciones, obtenidos con base en loci enzimáticos neutros (Brown, Matheson et al. 1975; Marshall y Allard 1969; O'Malley y Bawa 1987; Ritland 1989; Shoen 1982).

El reciente auge de la biología molecular del ADN ha estimulado también el uso de marcadores a este nivel para abordar preguntas de carácter evolutivo. Estos marcadores tienen la ventaja de proporcionar una gran cantidad de información y de ser el reflejo más directo de la memoria evolutiva de los organismos. Hasta ahora las técnicas moleculares a nivel del ADN se han utilizado básicamente para reconstruir árboles filogenéticos e inferir la historia evolutiva de niveles por arriba de la especie (e.g., Avise, Shapira et al. 1979; Sytsma y Schaal 1985). Existen pocos estudios empíricos de genética de poblaciones con base en marcadores a nivel de ADN (Aquadro, Desse et al. 1986; Kreitman 1983); y, recientemente, se han comenzado a desarrollar métodos teóricos para inferir procesos evolutivos intrapoblacionales a partir de datos de secuencias de ADN o de patrones

de bandedo de fragmentos de restricción (Slatkin y Maddison 1989).

Para entender la dinámica de los cambios evolutivos en poblaciones naturales es necesario entender e integrar el efecto de los factores ecológicos y las fuerzas evolutivas sobre la variación a diferentes niveles del fenotipo y del genotipo de los individuos. Existen muy pocos estudios evolutivos de esta naturaleza. Para especies vegetales, el estudio de Clegg y colaboradores (Clegg y Epperson 1988) con *Ipomoea purpurea* puede considerarse un ejemplo ideal. Estos autores han logrado disectar las bases genéticas, bioquímicas y moleculares de las diferencias fenotípicas (color de la corola en este caso). Con base en esta información han podido relacionar los patrones de transmisión genética con los factores ecológicos que afectan la variación en el color de la corola.

Generalmente resulta difícil detectar variación fenotípica discreta y con una relevancia evolutiva clara que guíe un estudio de evolución como en el caso de *Ipomoea purpurea*. De tal suerte que para avanzar en esta información en la biología de poblaciones de todo tipo de especies es necesario hacer descripciones exhaustivas de la variación genética con base en marcadores hereditarios, y relacionarla con aquella detectada a otro nivel del fenotipo (e.g., variación demográfica). Dichas relaciones pueden sustentar el descubrimiento de patrones. Estos, a su vez, pueden servir de base para el planteamiento de hipótesis particulares sobre el efecto de diferentes condiciones ambientales, y de su relación con los mecanismos de transmisión genética.

Como parte de un estudio más general sobre la biología de poblaciones de *Cecropia obtusifolia* se decidió caracterizar la composición genética de las poblaciones de esta especie a nivel enzimático utilizando la técnica de electroforesis en geles de almidón. Los marcadores isoenzimáticos serán útiles para obtener los patrones de variación genética dentro y entre poblaciones, y a lo largo del ciclo de vida de la especie. Además, mediante un mapeo de la distribución espacial de los individuos se podrá utilizar estos marcadores para analizar la estructuración genética en el espacio a pequeña escala, y hacer un análisis de paternidad parcial que permita reconstruir el patrón reproductivo de la especie y sus curvas de movimiento de polen y semillas.

En cualquier estudio biológico la estanda-

rización de las técnicas de investigación, que permite la comparación de los resultados de diferentes organismos y laboratorios, es fundamental para dar validez a las generalizaciones teóricas que surgen de la comparación de diferentes estudios empíricos. En particular, en los trabajos de biología de poblaciones, en que se trata con sistemas abiertos, es difícil delimitar las escalas espacial y temporal de estudio, y esto dificulta la comparación de resultados. Los estudios de la variación genética con base en electroforesis de enzimas no escapan a este problema. La falta de detalle y discusión sobre los diseños de obtención de las muestras, sobre el número y tipo de enzimas a ensayar, así como de los obstáculos enfrentados en el montaje y desarrollo de la técnica de electroforesis limitan la validez de las comparaciones de los datos de variación genética a este nivel. Este aspecto ha sido discutido detalladamente, para el caso particular de la electroforesis en plantas, por Kephart (1990). Durante el montaje del sistema de loci polimórficos para *Cecropia obtusifolia* se decidió hacer un análisis crítico y minucioso de la electroforesis de proteínas como técnica para caracterizar la variación genética de las poblaciones vegetales.

CAPITULO II

COMPUESTOS SECUNDARIOS

PRESENTACION Y OBJETIVOS

Las plantas vivas, mantienen cierta compartimentalización interna que evita que los compuestos (por ejemplo los fenoles y las enzimas) interactúen entre sí. Cuando se macera el tejido vegetal se rompe dicha compartimentalización y se mezclan los componentes intracelulares. Es precisamente la interacción de los compuestos secundarios (fenoles, alcaloides y terpenos de función inespecífica y bajo peso molecular; Langenheim 1985) con las proteínas lo que consti tuye uno de los principales obstáculos para la extracción de enzimas y organelos subcelulares de tejidos vegetales (Anderson 1968; Kelley y Adams 1977; Loomis 1974a; Loomis 1974b; Loomis y Battaile 1966). Para poder llevar a cabo dicha extracción es necesario utilizar un homogeneizador que evite el daño enzimático y celular. Este homogeneizador se conoce como buffer de extracción.

Los resultados obtenidos con la técnica de electroforesis pueden depender del buffer que se utilice para extraer las proteínas. Existe evidencia de que el buffer de extracción puede afectar la medición de las tres variables más importantes en estudios de genética de poblaciones con base en la electroforesis de enzimas: el número de loci detectables, el número de éstos que aparecen como polimórficos, y el número de bandas por loci (Gottlieb 1982; Kephart 1990). La experimentación para determinar el buffer adecuado debe ser específica para cada estudio y que la presencia y concentración de fenoles depende de las condiciones de crecimiento, así como de la especie y variedad de la planta (Loomis 1974a; Loomis 1974b). Este tipo de experimentación puede aumentar la confiabilidad y repetitividad de los resultados electroforéticos, y resulta prácticamente imprescindible cuando se trabaja con especies que tienen altas concentraciones de compuestos secundarios.

Debido a que *Cecropia obtusifolia* presenta una gran cantidad de fenoles en hojas y semillas (Alvarez-Buylla 1988) se requirió del desarrollo de una técnica particular para encontrar un buffer de extracción que permitiera la expresión de las proteínas polimórficas. En este capítulo se describe la experimentación realizada para obtener el buffer

que permitió la mejor resolución de las bandas de actividad enzimática a partir de macerados de tejido foliar de todos los estadios del ciclo de vida de la especie. Dicha experimentación se sustentó en una revisión de los buffer utilizados en trabajos previos, de su composición química, y de la función de cada uno de sus componentes. Con base en esta información y en la experiencia adquirida con *Cecropia* se discute cual es la mejor estrategia experimental para establecer un buffer de extracción adecuado para una especie particular.

ANTECEDENTES

En la mayoría de los estudios electroforéticos de especies vegetales el buffer de extracción utilizado se elige de publicaciones anteriores. De acuerdo a encuestas recientes elaboradas por Kephart (1990) el 44% de los estudios con especies vegetales utilizaron el buffer de extracción elaborado por Mitton, Linhart et al. (1979). El 22% utilizaron combinaciones propias de los químicos de este mismo buffer, pero sin reportar las causas de su elección. Hay muy pocos trabajos que hayan realizado y reportado experimentos para establecer el mejor buffer para la especie particular con la que desean trabajar (Kelley y Adams 1977; Soltis, Hauffer et al. 1980). Kelley y Adams comenzaron con un buffer de 9 componentes que probaron para tres enzimas: peroxidasa, esterasa y terpenol deshidrogenasa. Lo fueron simplificando quitándole uno a uno todos los compuestos y observando la resolución de las diferentes enzimas en cada caso. En la tabla II.1 se resumen los resultados del experimento.

Como se puede ver en la tabla II.1 la peroxidasa es la enzima menos afectada al quitarle los diversos componentes químicos. De éstos últimos el DMSO parece no ser necesario para aumentar la resolución de las enzimas aunque se sabe que sí es útil para poder almacenar las muestras por periodos prolongados de tiempo (Kelley y Adams 1977). El n-BuOH y diE₂O tienen efectos sinérgicos ya que aumentan la resolución de las enzimas únicamente cuando actúan juntos y, se puede observar, que existen 3 compuestos indispensables (Borax, DIECA, metabisulfito) para obtener una buena resolución de las enzimas ensayadas. Estos compuestos cumplen, junto con el PVP, casi todas las funciones químicas (ver tabla II.2) necesarias para prevenir la modificación enzimática por los fenoles.

de bandedo de fragmentos de restricción (Slatkin y Maddison 1989).

Para entender la dinámica de los cambios evolutivos en poblaciones naturales es necesario entender e integrar el efecto de los factores ecológicos y las fuerzas evolutivas sobre la variación a diferentes niveles del fenotipo y del genotipo de los individuos. Existen muy pocos estudios evolutivos de esta naturaleza. Para especies vegetales, el estudio de Clegg y colaboradores (Clegg y Epperson 1988) con *Ipomoea purpurea* puede considerarse un ejemplo ideal. Estos autores han logrado disectar las bases genéticas, bioquímicas y moleculares de las diferencias fenotípicas (color de la corola en este caso). Con base en esta información han podido relacionar los patrones de transmisión genética con los factores ecológicos que afectan la variación en el color de la corola.

Generalmente resulta difícil detectar variación fenotípica discreta y con una relevancia evolutiva clara que guíe un estudio de evolución como en el caso de *Ipomoea purpurea*. De tal suerte que para avanzar en el estudio de la biología de poblaciones de todo tipo de especies es necesario hacer descripciones exhaustivas de la variación genética con base en marcadores hereditarios, y relacionarla con aquella detectada a otro nivel del fenotipo (e.g., variación demográfica). Dichas relaciones pueden sustentar el descubrimiento de patrones. Estos, a su vez, pueden servir de base para el planteamiento de hipótesis particulares sobre el efecto de diferentes condiciones ambientales, y de su relación con los mecanismos de transmisión genética.

Como parte de un estudio más general sobre la biología de poblaciones de *Cecropia obtusifolia* se decidió caracterizar la composición genética de las poblaciones de esta especie a nivel enzimático utilizando la técnica de electroforesis en geles de almidón. Los marcadores isoenzimáticos serán útiles para obtener los patrones de variación genética dentro y entre poblaciones, y a lo largo del ciclo de vida de la especie. Además, mediante un mapeo de la distribución espacial de los individuos se podrán utilizar estos marcadores para analizar la estructuración genética en el espacio a pequeña escala, y hacer un análisis de paternidad parcial que permita reconstruir el patrón reproductivo de la especie y sus curvas de movimiento de polen y semillas.

En cualquier estudio biológico la estanda-

rización de las técnicas de investigación, que permite la comparación de los resultados de diferentes organismos y laboratorios, es fundamental para dar validez a las generalizaciones teóricas que surgen de la comparación de diferentes estudios empíricos. En particular, en los trabajos de biología de poblaciones, en que se trata con sistemas abiertos, es difícil delimitar las escalas espacial y temporal de estudio, y esto dificulta la comparación de resultados. Los estudios de la variación genética con base en electroforesis de enzimas no escapan a este problema. La falta de detalle y discusión sobre los diseños de obtención de las muestras, sobre el número y tipo de enzimas a ensayar, así como de los obstáculos enfrentados en el montaje y desarrollo de la técnica de electroforesis limitan la validez de las comparaciones de los datos de variación genética a este nivel. Este aspecto ha sido discutido detalladamente, para el caso particular de la electroforesis en plantas, por Kephart (1990). Durante el montaje del sistema de loci polimórficos para *Cecropia obtusifolia* se decidió hacer un análisis crítico y minucioso de la electroforesis de proteínas como técnica para caracterizar la variación genética de las poblaciones vegetales.

TABLA II.2 Composición química de los buffer de extracción ensayados y función de cada uno de sus componentes

FUNCION	Agente reductor					Forma puentes de H ₂ con los fenoles			Inhibidores competitivos de la o-difenoloxidas					Forma enlaces con quinonas		Forma enlaces con taninos		Activa en el sistema de la enzima (Cofactor)										
	DTT	Mercurio-etanol	DIECA	Acido ascorbico	Metasulfitos de Na	Acido citrico	Sacarosa	DMSO	PVP 40	PEG	Metasulfitos de Na	Borax	Albumina	Borax	Mercurio-etanol	Metasulfitos de Na	Acido ascorbico		PVP 40	GAO2	Tributilato	Cisteina	DIECA	Albumina	Cisteina	PEG	PVP 40	DIECA
Buffer de extracción																												
ELLS.MOD (a)	X	X					X	X						X				X									X	
MITTON (b)	X	X	X	X	X		X	X		X	X		X	X	X	X		X				X					X	X
ARULSEKAR & PARFITT (c)		X		X		X		X	X					X			X				X			X	X	X		
CHELIAK & PITEL 1 (d)		X		X			X	X	X			X		X			X						X				X	
CHELIAK & PITEL 2 (d)		X		X			X		X	X		X		X			X						X	X	X	X	X	
SOLTIS HEPES (e)		X			X						X			X	X													
SOLTIS FOSFATOS (e)		X	X	X	X			X		X	X	X	X	X	X	X							X	X			X	X
SOLTIS TRIS (e)		X	X	X	X			X		X	X			X	X	X	X						X				X	X
CHELIAK & PITEL(SEM.) (d)		X		X								X		X			X						X					
WYATT (f)	X	X	X	X			X							X		X	X					X					X	X
WERTH simple (g)					X						X				X													
CONCKLE (h)		X						X				X		X				X					X				X	

TABLA II.2 Continuación

COMPUESTO	TRIS-HCL	EDTA	Na-Buffer de fosfatos	MgCl2	2-mercaptoetanol	Piridoxal	NAD	NADP	Buffer de tris-cloruro	Acido málico	Tris	Hepes	Buffer de gel
Buffer de extracción													
ELLS.MOD (a)	X												
MITTON (b)			X	X									
ARULSEKAR & PARFITT (c)											X		
CHELIAK & PITEL 1 (d)		X				X	X	X					
CHELIAK & PITEL 2 (d)						X	X						
SOLTIS HEPES (e)												X	
SOLTIS FOSFATOS (e)			X										
SOLTIS TRIS (e)										X	X		
CHELIAK & PITELISEM.(d)	X	X					X	X	X				
WYATT (f)		X	X										
WERTH simple (g)	X	X		X									
CONCKLE (h)		X											X

a:Este trabajo

b:Mitton, et al., 1979

c:Arulsekhar & Parfitt, 1986

d:Cheliak & Pitel, 1984

e:Soltis, et al., 1983

f:Wyatt,1989

g:Werth, 1985

h:Conkle, et al.,1982

TABLA II.2 Continuación

FUNCION	Agente reductor						Forma puentes de H ₂ con los fenoles			Inhibidores competitivos de la o-difenoloxidas						Formas enlaces con quinonas		Formas enlaces con taninos		Acido en el sitio activo de la enzima									
	COMPUESTO	DTT	Mercurio-etanol	DIECA	Acido ascorbico	Metabinitrito de Na	Acido citrico	Sacarosa	DMSO	PVP 40	PEG	Metabinitrito de Na	Borax	Albúmina	Borax	Mercurio-etanol	Metabinitrito de Na	Acido ascorbico	PVP 40	GeO2	Tropolactona	Cisteina	DIECA	Albúmina	Cisteina	PEG	PVP 40	DIECA	
Especie																													
Echium (a)	X																												
Pinus (b)		X	X	X	X			X	X		X	X		X	X	X	X	X	X	X			X				X	X	
Bertholletia (c)		X	X	X	X			X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X			X	X	
Pithecellobium (d)		X	X	X	X			X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X			X	X			X	X	
29 spp. leñosas (e)		X	X	X	X			X	X		X	X		X	X	X	X	X	X	X			X			X	X		
Phoenix (f)		X							X				X		X				X				X			X			
Prunus (g)					X					X	X		X			X								X					
Raphanus (h)	X																												
Annona (i)	X								X										X								X		
Lisianthus (j)		X		X		X	X		X				X		X		X	X					X				X		
Carduus (k)									X										X								X		
Clarkia (l)		X														X													
Shorea sp (m)		X	X						X						X				X				X				X	X	
Xeropermum (n)		X	X						X						X				X				X				X	X	
Juniperus (o)			X	X	X			X	X		X	X		X		X	X	X	X	X		X					X	X	
Musa (p)		X					X		X										X								X		
Gilia (q)		X													X														

TABLA II.2 Continuación

COMPUESTO	Buffer de fosfatos	2-fenoxietanol	Buffer de tris-citratos	EDTA	Sorbitol	MgCl ₂	MES	Buffer de Tris-HCl	NAD	NADP	n-BuOH	diEt ₂ O	Trilon X-100
Especie													
Echium (a)	X												
Pinus (b)		X											
Bertholletia (c)		X											
Pithecolobium (d)		X											
29 spp. leñosas (e)		X											
Phoenix (f)			X	X									
Prunus (g)				X	X	X	X						
Raphanus (h)								X					
Annona (i)								X					
Lisianthus (j)				X		X			X	X			
Carduus (k)													
Clarkia (l)								X					
Shorea sp (m)													
Xerospermum (m)													
Juniperus (n)											X	X	
Musa (o)								X					X
Gilia (p)	X												

a:Burdon, et al., 1983

b:Mitton, et al., 1979

c:Buckley, et al., 1988

d:O'Malley & Bawa, 1987

e:Hamrick & Loveless, 1986

f:Torres & Tisserat, 1980

g: Arulsekhar, et al., 1986

h:Ellstrand & Devlin, 1989

i:Lee & Ellstrand, 1987

j:Sytsma & Shaal, 1985

k:Smyth-Hamrick, 1984

l:Smith-Huerta, 1986

m:Gan, et al., 1981

n:Keely & Adams, 1977

o:Janet & Liz, 1986

p:Shoen, 1982

Tabla II.1. Resultados de la experimentación para obtener el buffer de extracción adecuado para *Juniperus* spp. en el trabajo de (Kelley y Adams 1977).

Compuesto	Peroxid	Ester	Terpenol
Borax	+	-	+
Ascorbato de Na	+	++	++
Metabisulfito de Na	++	-	+
DIECA	++	-	-
GeO ₂	+++	++	-
DMSO	++	+++	+++
n-BuOH	++	++	-
diEt ₂ O	+++	-	++
n-BuOH y DiEt ₂ O	+	+	-
PVP	+	+	-

nota: la resolución de las enzimas se incrementa conforme se presentan más signos + y es nula cuando aparece un -, estas resoluciones resultaron al quitar cada uno de los compuestos indicados.

Gain y Robertson en 1981 también establecieron experimentalmente un buffer de extracción para *Shorea* sp y *Xenosporum* sp. Probaron diferentes combinaciones de los siguientes compuestos: PVP, DIECA, Cisteína, Metabisulfito, Urea, Policlar A, Tioglicolato, Glutacion, Ascorbato, EDTA y Carcol y llegaron a establecer un buffer de extracción bastante sencillo: PVP, DIECA, Mercaptoetanol y varias centrifugaciones. Este buffer permitió la resolución de 17 sistemas enzimáticos de los cuáles los autores utilizaron 9 por su repetitividad y por sus patrones claros de bandeó. De los ejemplos anteriores y de la tabla II.2 resulta evidente que el PVP es un compuesto indispensable en los buffer de extracción.

Los compuestos secundarios que más interfieren en la expresión proteica son los fenoles. Estos interactúan con las enzimas reversiblemente por medio de puentes de hidrógeno que se establecen entre el protón del grupo OH fenólico y el oxígeno del enlace peptídico que actúa como aceptor de protones (Loomis 1974a). Además, los fenoles forman quinonas en presencia de oxígeno y éstos interactúan irreversiblemente con los sitios activos de las enzimas por medio de una condensación covalente (Loomis 1974b; Loomis y Battaile 1966).

Hay tres maneras de prevenir la modificación

enzimática debido a la actividad química de los fenoles: 1) Removiendo fenoles; 2) Inhibiendo la actividad de la o-difenoloxidasas (O-difenol-O₂-oxidoreductasa, conocida comúnmente como o-difenoloxidasas. Es la enzima más activa que cataliza la conversión de o-difenol a los correspondientes quinonas (Anderson 1968)) y 3) Removiendo quinones; esto último se puede lograr reduciendo estos compuestos a o-difenol o combinándolos con algún otro compuesto químico (Loomis 1974a).

Un análisis riguroso que permitiera encontrar el buffer de extracción más adecuado para cada tejido particular requeriría conocer: 1) la actividad y el sustrato de la o-difenoloxidasas en el tejido, 2) la naturaleza y cantidad de fenoles y taninos en éste, 3) la localización subcelular de la enzima (o-difenoloxidasas), 4) el mecanismo de acción de los compuestos que previenen la acumulación de los quinones y 5) la susceptibilidad de las enzimas que se van a extraer (Anderson 1968). Estas evaluaciones implicarían un trabajo experimental demasiado largo y complicado para cada especie pues estos 5 factores varían entre especies y condiciones de crecimiento. Por lo tanto, cuando sólo se busca un buffer de extracción para lograr expresión enzimática, se debe seguir un método de carácter empírico y sistemático que permita ir evaluando la acción de un conjunto de compuestos lo más eficientemente posible. Un procedimiento de este tipo es el que se utilizó en este trabajo.

Existe cierta evidencia de que el habitat (localidades tropicales vs. templadas y húmedas vs. secas; Langenheim 1985), la naturaleza de silvestre o cultivada de las especies vegetales (Marshall y Allard 1969; Stuber y Goodman 1983) y la unidad taxonómica (Zouros 1979) pueden servir como indicadores de la presencia o no de compuestos secundarios. Para analizar estas sugerencias con base en la frecuencia de uso de buffer de extracción en distintos tipos de especies se recopiló información para 57 especies estudiadas previamente.

De estas 57 especies, en 8 no se utilizó buffer de extracción, para 4 no se reporta este dato y para las 45 restantes sí se utilizó compuesto químico alguno para extraer las enzimas. Estas últimas 45 especies están reportadas en la tabla II.2. Con base en éstos datos se observó que las especies del trópico húmedo presentan problemas de extracción más frecuentemente que las especies de habitats secos y templados; y las especies silvestres

presentan problemas de extracción más frecuentemente que las cultivadas. No se encontró relación entre la presencia de compuestos secundarios y la familia taxonómica a la cual pertenecen las especies (no se hicieron análisis con otra unidad taxonómica). Finalmente, resultó difícil hacer inferencias acerca de los problemas de extracción de cada especie con base en la composición química de los buffer utilizados en cada caso porque la mayoría de estos no se establecieron con base en experimentación específica.

MATERIALES Y METODOS

Como primera etapa de la experimentación para establecer el buffer de extracción para Cecropia obtusifolia se investigaron las funciones de la mayor parte de los componentes químicos de los buffer de extracción reportados en la literatura (tabla II.2). Así mismo, se investigó sobre la posible acción negativa de ciertos compuestos químicos en la actividad de algunas enzimas. Se encontró que el bisulfito inhibe la acción de las dihidrogenasas (MDH, ADH, GDH, etc.), el DIECA inhibe aquellas enzimas que requieran Cu para funcionar como el ácido ascórbico oxidasa, citocromo oxidasa y superoxidodismutasa, el PVP inhibe a la Glutamato sintetasa, y el EDTA se une reversiblemente al Mg^{2+} y a otros cationes divalentes inhibiendo de modo no competitivo a algunas enzimas que precisan de tales iones para su actividad (Kephart 1990; Lehninger 1983).

La acción del buffer de extracción depende de condiciones químicas como el pH. Sin embargo, las condiciones óptimas de extracción no son siempre las condiciones óptimas para la actividad enzimática. Por ejemplo, el PVP tiene mayor afinidad por los fenoles en pH's ácidos, pero las enzimas tienen mejor actividad en un rango de pH que va de 6.7 a 7.2. La mayor parte de los buffer que proba más tuvieron pH's en este rango.

La técnica de electroforesis, la nomenclatura para loci y alelos, así como los detalles que se fueron introduciendo en la técnica a lo largo del trabajo, se describen en el Apéndice 1. Esta metodología se adaptó de los protocolos de: Conckle, Cheliak & Pitel, Hamrick, Hodgskiss, Piñero y Eguiarte, Richardson et al, Soltis et al, Werth y Wyatt (Cheliak y Pitel 1984; Conckle et al 1982; Hamrick y Loveless 1989; Hodgskiss 1988; Piñero y Eguiarte 1988; Richardson, Baverstock et

al. 1986; Soltis, Haufler et al. 1983; Werth 1985; Wyatt 1989).

Para las pruebas de expresión enzimática y del efecto de diferentes buffer de extracción se colectaron 84 muestras de hojas con diferentes edades de desarrollo de 12 árboles adultos (8 machos y 4 hembras), hojas de 7 juveniles y de 74 plántulas. Estas hojas se transportaron al laboratorio en Nitrógeno líquido (que se encuentra a una temperatura de $-196^{\circ}C$) y se cambiaron a un ultracongelador de $-70^{\circ}C$ (REVCO) una vez que llegaron al laboratorio.

El método experimental que se utilizó para determinar el mejor buffer de extracción consistió en hacer pruebas cruzadas de buffer de extracción con diferentes combinaciones de compuestos químicos de cada función (con base en la información de la Tabla II.2) contra: 1) diferentes estadios de desarrollo de las hojas de un sólo individuo (yemas, hojas nuevas, y hojas viejas), 2) diferentes estadios del ciclo de vida y 3) condiciones de crecimiento de los individuos (plántulas crecidas en cámaras de crecimiento y colectadas del campo, juveniles y adultos).

En cada gel, se probó la actividad de varias enzimas buscando, de esta manera, la mejor combinación de buffer de extracción y de corrimiento para la expresión de los loci polimórficos.

Se utilizaron 3 diferentes sistemas de buffer: Histidina, sistema 8 y sistema 7 (ver Apéndice 1 para más detalle). Para cada uno de estos sistemas se usaron las siguientes enzimas:

Histidina: PGM, 6PGD, HK, ACO, SDH, PGI, MDH, G6PD, AK, ADH, MPI, ALD, MNR, F16DP, AcPH, GPT, SUDH, G2DH y GLUDH.

Sistema 7: PGM, AcPH, PGI, CAT, LAP, GOT, G6PD, DIA, Per, ALD, Me, 6PGD, GAL, IDH, NADHHDH, MNR, GDH, MPI, TPI, ADH y Rubisco.

Sistema 8: GOT, DIA, CAT, PGM, AcPH, Me, PGI, MNR, PC y GLYDH.

En total se utilizaron 30 geles; 7 se corrieron en Histidina, 11 en el sistema 7 y los 12 restantes en el sistema 8. Para los protocolos de tinción de cada una de las enzimas ver apéndice 1.

RESULTADOS

Los resultados de las pruebas de buffer de extracción se resumen en las tablas II.3 a, b y c. En éstas se muestran las enzimas ensayadas y su resolución para las diferentes combinaciones de buffer de extracción y sistemas de corrimiento (buffer de charola y de gel).

De 37 enzimas probadas 26 tuvieron expresión tanto para adultos como para juveniles y plántulas en alguna de las combinaciones de buffer utilizadas, y 11 no se expresaron.

En una prueba electroforética inicial de macerados de adultos y plántulas del campo se corroboró que en ausencia de compuestos de extracción no se obtenía actividad enzimática de las siguientes enzimas 6PGDH, HK, PGM, ACO, SDH, MDH, DIA, G6PDH, AcPH aunque sí se observó una actividad muy tenue para LAP, GOT y PGI.

Las pruebas para los diferentes estadios de desarrollo de las hojas mostró que la mejor expresión enzimática se obtiene a partir de hojas jóvenes completamente desarrolladas (segunda o tercer hoja totalmente extendida). No se obtuvo buena expresión a partir de macerados de yemas, hojas jóvenes parcialmente dobladas y hojas demasiado maduras o parcialmente dañadas.

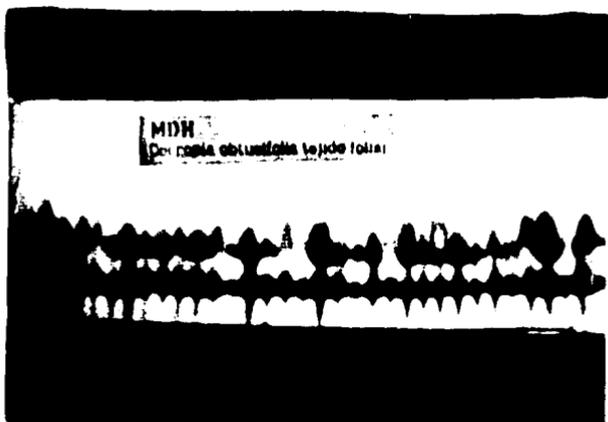
Una prueba para comparar la inhibición de la actividad enzimática por compuestos secundarios en plántulas, juveniles y adultos mostró que los compuestos secundarios representan un problema mayor para la extracción de enzimas en las plántulas y juveniles colectados del campo que en los adultos o plántulas crecidas en el laboratorio. El buffer más sencillo que se desarrolló combina un compuesto de cada función importante (denominado buffer de extracción de "Ells .mod." - Ellstrand modificado-, ver tabla II.2). Este buffer resolvió muy bien el problema de expresión de los adultos colectados en el campo y plántulas germinadas en el laboratorio para todas las enzimas de la tabla III.2 (ver siguiente capítulo); sin embargo, no logró extraer eficientemente las enzimas de las plántulas y juveniles colectados del campo.

La experimentación para establecer el mejor buffer de extracción para *Cecropia obtusifolia* nos brindó cierta evidencia del efecto del método de

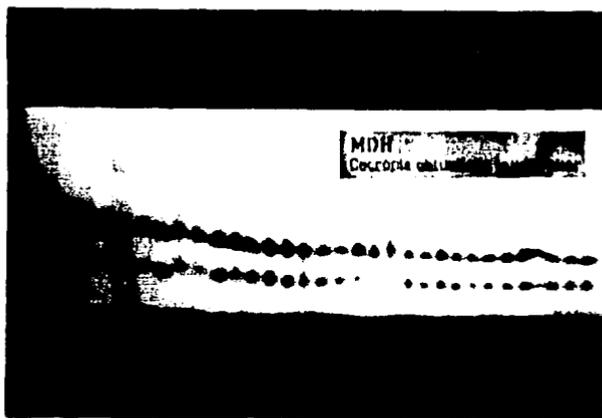
extracción y de la combinación de buffer de charola y gel en el número de loci expresados, el número de loci polimórficos y el número de bandas por loci. Para el caso del buffer de Histidina se encontró que el buffer de semilla y la ausencia de cualquiera de éstos no pueden extraer la PGI1. Para el caso del sistema 8 se encontró que solamente el buffer de "Ells.mod." (ver tabla II.2) y el de "Mitton modificado (Mit.mod)" (ver tabla II.4) pueden extraer la GOT1 para todos los estadios del ciclo de vida de *Cecropia obtusifolia*. Para el caso del sistema 7 el buffer de "Ells.mod." y el de "Mit.mod" extrajeron la LAP1 que no se había observado con ningún otro buffer. El buffer de PO4 + Albúmina no extrae bien las enzimas PGI y GOT en el sistema 8 pero sí en el 7. Lo mismo pasa para el buffer de PO4 + DMSO con la enzima GOT. En cambio, con el buffer de semilla, los resultados se invierten para la enzima GOT y con el buffer de Tris-mal para el locus PGI1. Estos resultados indican que efectivamente factores químicos tales como el pH, la concentración y presencia de ciertos compuestos afectan la expresión de las proteínas en el gel. Estas diferencias pueden deberse a que enzimas localizadas en diferentes partes de la célula (citoplasma, mitocondrias, cloro plastos y peroxisomas) tienen diferentes requerimientos de extracción, o diferente sensibilidad a la presencia y concentración de ciertos compuestos secundarios o químicos.

En cuanto al efecto del método de extracción sobre el número de loci polimórficos también se recabaron algunas evidencias. Se observó que mientras el patrón de bandeado de la MDH2 se mostraba como polimórfico (Fotografía II.1a) al extraer con el buffer de "Ells.mod.", éste aparecía claramente como no polimórfico al extraer con buffer de "Mit.mod" (ver fotografía II.1b), observándose bandas claras y definidas que mostraban ausencia de variación. Para el caso de ACO sucedió algo similar; con el buffer de "Ells.mod." se encontraron individuos aparentemente heterocígos, pero con el buffer de "Mit.mod" se observó una sola banda para los mismos individuos.

En lo que se refiere al número de bandas por loci también se recabaron algunas observaciones. En la GOT2 la expresión de una segunda banda en los individuos homocígos se manifestó claramente algunas veces y otras no para el mismo individuo tanto en el buffer de extracción de "Ells.mod." como en el de "Mit.mod". Se hizo un experimento donde se utilizaron macerados foliares de 6 individuos con



Fotografía II.1a. Patrón de bandeo de la Malato Deshidrogenasa al macerar el tejido vegetal con el buffer de extracción de Ells.Mod. Debido al barrido de las bandas, el locus de arriba parece variable.



Fotografía II.1b. Patrón de bandeo de la Malato Deshidrogenasa al macerar el tejido vegetal con el buffer de extracción de Mit.Mod. Los individuos que aparecen en ésta fotografía son los mismos de la fotografía anterior y se puede ver que el locus de arriba no presenta variación.

Tabla II.3a. Prueba de buffer de extracción en diferentes sistemas de buffer de corrimiento para todos los estadios del ciclo de vida de *Cecropia obtusifolia*. (Los números entre paréntesis indican la resolución de las enzimas: 1 - excelente; 2 - buena; 3 - regular; 4 - malo; 6 barrido).

SISTEMA DE BUFFER DE CORRIMIENTO:		HISTIDINA			
BUFFER EXTRACCION	SIN BUFFER	SEMILLA	PO4+ALBUMINA	ELLSTR. MOD.	MITTON MOD
PLANTULAS DEL CAMPO	PGI2 (2)	PGI2(2)	SDH1(1,2,4) SDH2(2,3,4) MDH1,2(2,3)	MDH1(1,2,4) MDH2(2,3,4,6) 6PGDH(6) ACPH1(1)	MDH1,2(1) PGM1,2,3(1)
PLANTULAS DE LABORATORIO				MDH1(1) PGM1,2(1) MDH2(1,6) PGM3(1,6) SDH1,2(2) ACPH1(1) GPT1(1) 6PGDH(1) GPT2(5) MNR(1)	MDH1,2(1) PGM1,2(1) PGM3(1,6)
JUVENILES			SDH1(2,3) SDH2(2) MDH1(3)	MDH1(4) MDH2(4,6) ACPH1(1,2,6)	MDH1,2(1) PGM1,2,3(1)
ADULTOS: YEMAS			SDH1,2(4) MDH1(3) MDH2(2)	MDH1(1) MDH2(1,6) 6PGDH(6)	
HOJA NUEVA	PGI2 (2)		SDH1(1,2) SDH2(2,3) SDH1(1,2,3,4) MDH2(2,3)	MDH1(1) PGM1,2(1) MDH2(1,6) PGM3(1,6) SDH1,2(2) ACPH1(1) GPT1(1) 6PGDH(1) GPT2(5) MNR(1)	MDH1,2(1) PGM1,2,3(1)
HOJA VIEJA			SDH1(1,2,4) SDH2(2,3,4) MDH1,2(1,2,3)	MDH1(1) MDH2(6) 6PGDH(6) AK(1)	

Tabla 11.3 b. Continuación

SISTEMA DE BUFFER DE CORRIMIENTO:			SISTEMA 7		
BUFFER EXTRACCION	SIN BUFFER	SIMPLE	CONKLE	TRIS MAL	SEMILLA
PLANTULAS DEL CAMPO	GOT2(2,3,6) PGI1 (2,3,4) PGI2(3,4) LAP2(4)	PGI2(3)		GOT2(4) PGI1(6)	GOT2(2,3) PGI1(4) PGI2(2)
PLANTULAS DE LABORATORIO	GOT2(2,3) PGI1 (3,4) PGI2(2,3) LAP2(4)				GOT2(4) PGI2(1) MNR(1)
JUVENILES			PGI1(2) PGI2(2) GOT2(2) DIA(2)		PGI1(1,4) PGI2(1,4) MNR(1)
ADULTOS: YEMAS				GOT2(4,6) PGI1(6) PGI2(6)	LAP2(6)
HOJA NUEVA	LAP2(6) GOT2(6)	PGI2(3)		GOT2(4) PGI1(6) PGI2(6)	LAP2(6)
HOJA VIEJA					

Tabla II.3 b Continuación

SISTEMA DE BUFFER DE CORRIMIENTO:			SISTEMA 7		
BUFFER EXTRACCION	PO4	PO4+ALBUM+DMSO	PO4+ALBUM	PO4+SEMILLA	PO4+DMSO
PLANTULAS DEL CAMPO	PGI1 (1,3,4,6) PGI2(1,4,6) LAP2(2,3) GOT2(2,3) DIA(2,3,6)			PGI1(2,3,4) PGI2(2,3,4) GOT2(2,5)	PGI1(1) PGI2(1) GOT1(1) GOT2(1)
PLANTULAS DE LABORATORIO	PGI1 (1) PGI2(1) GOT1(1) GOT2(1) DIA(1,2,3,4,6)	PGI1(1) PGI2(1) GOT1(1) GOT2(1)			PGI1(1) PGI2(1) GOT1(1) GOT2(1)
JUVENILES	PGI1 (1,2,4) PGI2(1,2) GOT2(1,2) DIA(1,2)				PGI1(1,2) PGI2(1,2) GOT1(1,3) GOT2(1) DIA(2)
ADULTOS: YEMAS	PGI1 (2,4) PGI2(2) GOT1(2) GOT2(2,4)	PGI1(1) PGI2(1) GOT1(1) GOT2(1)	PGI1(1) PGI2(1) GOT1(1) GOT2(1)	PGI1(2,6) PGI2(2,6) GOT1(2,6) GOT2(2,6)	PGI1(1) PGI2(1) GOT1(1) GOT2(1)
HOJA NUEVA	PGI1 (1,2,4) PGI2(1,2) DIA(1,5) GOT2(1)	PGI1(1) PGI2(1) GOT1(1) GOT2(1)	PGI1(1) PGI2(1) GOT1(1) GOT2(1)	PGI1(2) PGI2(2) GOT2(2)	PGI1(1) PGI2(1) GOT1(1) GOT2(1)
HOJA VIEJA	PGI1 (1,3) PGI2(1,2) GOT2(2)	PGI1(1) PGI2(1) GOT1(1) GOT2(1)			

Tabla 11.3b. Continuación

SISTEMA DE BUFFER DE CORRIMIENTO:			SISTEMA 7		
BUFFER EXTRACCION	WYATT	ELLSTRAND	ELLSTRAND+DMSO	ELLSTR. MOD.	MITT. MOD.
PLANTULAS DEL CAMPO	GOT2(6) PGI1 (6) PGI2(6)	DIA(1,3,6) PGI1(1) PGI2(1)	DIA(3,6) PGI1(1,4) PGI2(1)	PGI1(1,2,4) PGI2(1) GOT(1) GOT2(1) LAP1(1) LAP2(1) MNR(1)	PGI1(1) PGI2(1) GOT1(1) GOT2(1) LAP1(1) LAP2(1) MNR(1)
PLANTULAS DE LABORATORIO		DIA(1,6) PGI1(1) PGI2(1)	DIA(2,6) PGI1(1,2) PGI2(1)	PGI1(1) NADHDH(1) PGI2(1) RUBISCO(1) GOT1(1) G6PD(1) GOT2(1) GDH(1) LAP1(1) bGAL(1) LAP2(1) TPI1(1) MNR(1) TPI2(1) TPI4(5) ME(1,5)	PGI1(2) ACPH(6) PGI2(2) LAP1(1) LAP2(1) GOT2(1) MNR (1) GOT1(1)
JUVENILES	GOT2(3) PGI1 (3) PGI2(2)	DIA(2,3) GOT1(1) PGI1(1,2) GOT2(1) PGI2(1,2,3)	DIA(1,2) PGI1(1,2) PGI2(1,2,3)	PGI1(2,6) PGI2(2,6) GOT2(3,4) ACPH(6) MNR(1,6)	PGI1(1,3,4) LAP1(1) PGI2(1,3) GOT2(1) LAP2(1) GOT1(1) MNR (1)
ADULTOS: YEMAS	GOT2(6) PGI1 (6) PGI2(6)		DIA(1,2)	PGI1(1) PGI2(1)	
HOJA NUEVA	GOT2(3,6) PGI1 (2) PGI2(2)	DIA(1) PGI1(1) PGI2(1)	DIA(1) PGI1(1) PGI2(1)	PGI1(1) NADHDH(1) EST1(2) PGI2(1) RUBISCO(1) EST2(4) GOT1(1) G6PD(1) MNR(1) GOT2(1) GDH(1) TPI2(1) TPI4(5) ME(1,5) LAP2(1) LAP1(1) bGAL(1) TPI1(1)	PGI1(1) MNR(1) PGI2(1) LAP2(1) GOT1(1) LAP1(1) GOT2(1) ACPH(6)
HOJA VIEJA		DIA(2) PGI1(1) PGI2(1)	DIA(2) PGI1(1) PGI2(1)	PGI1(1) PGI2(1)	

Tabla II.3c. Continuación

SISTEMA DE BUFFER DE CORRIMIENTO:			SISTEMA 8		
BUFFER EXTRACCION	TRIS MALATO	HEPES	CONKLE	SEMILLA	ARULSEKAR
PLANTULAS DEL CAMPO	PGI1 (1) PGI2(1) ACPH(6)	DIA(2) ACPH(3) GOT2(2)	DIA(2) ACPH(4) GOT1(1) GOT2(1)		DIA(2)
PLANTULAS DE LABORATORIO	PGI1,2(1) ACPH(6)			PGI1,2(1,2) GOT2(1)	
JUVENILES					
ADULTOS: YEMAS					
HOJA NUEVA		ACPH(2) DIA(2)	ACPH(2) DIA(2) GOT2(6)		ACPH(2) DIA(2)
HOJA VIEJA					

SISTEMA DE BUFFER DE CORRIMIENTO:		SISTEMA 8	
BUFFER EXTRACCION	VEG. BUFFER 1	VEG. BUFFER 2	VEG. BUFF.2+BISULF Na + DMSO; sin Tergitol
PLANTULAS DEL CAMPO	PGI1 (4) PGI2(2,4)	ACPH(3)	PGI1(6) GOT2(1,4) DIA(2)
PLANTULAS DE LABORATORIO			
JUVENILES			
ADULTOS: YEMAS		GOT2(6) PGI1(3) PGI2(1)	
HOJA NUEVA		GOT2(6) PGI1(1,3) PGI2(1)	PGI2(6) DIA(2) ACPH(2)
HOJA VIEJA			

Tabla II.3.C. Continuación

SISTEMA DE BUFFER DE CORRIMIENTO:		SISTEMA 8		
BUFFER EXTRACCION	ELLSTRAND+MERCAPTO	ELLSTR. MOD.	ELLSTR. MOD.+METABISULF	MITT. MOD.
PLANTULAS DEL CAMPO	ACPH(3,4) DIA(2) GOT1(1) GOT2(1)	PGI1(1) ACPH(1) PGI2(1) MNR(1,6) GOT1(1) GOT2(1)	PGI1(1) GOT2(4)	GOT1(1) GOT2(1) MNR(1,6)
PLANTULAS DE LABORATORIO		PGI1(1) ACPH(1) PGI2(1) GOT1(1) GOT2(1)	PGI1(1) GOT2(4)	GOT1(1) GOT2(1)
JUVENILES		PGI1(1) ACPH(2) PGI2(1) MNR(1,6) GOT1(1) GOT2(1)	PGI1(1) PGI2(1) GOT2(1)	ACPH(1,4) GOT1(1) GOT2(1) MNR(1,6)
ADULTOS: YEMAS		GOT2(1,2) ACPH(1,6)		ACPH1(6) ACPH2(2,6) MNR(1,6)
HOJA NUEVA	GOT2(6) ACPH(2) DIA(2)	PGI1(1) ACPH(1,2) PGI2(1) MNR(1,6) GOT1(1) GOT2(1)	PGI1(1) PGI2(1) GOT1(1) GOT2(1)	GOT1(1) GOT2(1)
HOJA VIEJA		GOT2(1)	ACPH(2)	

cuatro buffer de extracción diferentes: "Mit.mod", "Ells.mod." normal y "Ells.mod." en concentraciones de 1.5X y 2X. Tres individuos presentaron el mismo genotipo con los cuatro buffer; 2 aparecieron con dos bandas con "Mit.mod" y una con "Ells.mod." y 1 individuo presentó dos bandas con el buffer de "Ells.mod." y una con el buffer de "Mit. mod".

El único buffer de extracción que funcionó para todos los estadios ontogenéticos de *Cecropia obtusifolia*, para todos los loci polimórficos montados, y con el cual se obtuvieron patrones de bandedo consistentes fué uno similar al utilizado por (Mitton, Linhart et al. 1979) con algunas modificaciones (Tabla II.4):

TABLA II.4 Composición del buffer de extracción de (Mitton, Linhart et al. 1979) y del modificado para *Cecropia obtusifolia*.

Compuesto	Mitton	"Mit. mod"
Geo 2	0.38 g	0.38 g
DIECA	0.137 g	0.137 g
Borato de Na	0.55 g	-----
Tetaborato de Na	-----	0.55 g
Bisulfito de Na	0.15 g	-----
Bisulfito de Na y Metabisulfito de Na	-----	0.15 gr.
PVP 40	2.00 g	6.00 gr.
L-Acido ascórbico	2.00 g	2.00 gr.
KH ₂ PO ₄ pH 7.0	4.0 ml.	4.0 ml.
DMSO	4.0 ml	4.0 ml.
2-fenoxietanol	25 ml.	25 ml.
Mercaptoetanol	.08 ml.	0.3 ml
DTT	-----	0.075 g

No se hizo ninguna experimentación previa para decidir si utilizar Borax o borato de Na, ni para cambiar de Bisulfito de Na al reactivo que tiene una mezcla de bisulfito con metabisulfito de Na. Sin embargo, sí se observó que con añadir más PVP y utilizar DTT se mejoraba la expresión de tres loci polimórficos: Fe1, AK3 y PGM3. Además sólo con este buffer se obtenían patrones de bandedo consistentes para la GOT2.

DISCUSION

Los resultados de la experimentación con los buffer de extracción para *Cecropia obtusifolia* corroboran la observación de que las condiciones químicas de extracción pueden afectar de manera importante los patrones de bandedo de electroforesis en geles de almidón. Se encontró que el número de loci totales, el número de loci polimórficos y el número de bandas por loci pueden variar para diferentes enzimas según las condiciones de extracción.

Los resultados de este capítulo también muestran que el estadio de ciclo de vida y el grado de desarrollo foliar pueden afectar la expresión enzimática de tejido de una misma especie. El buffer de extracción de "Ells.mod." resolvió el problema de extracción de los adultos colectados del campo y de las plántulas crecidas en el laboratorio (excepto la MDH2 como vimos anteriormente). Este buffer presenta pocos compuestos químicos pero con casi todos los tipos de funciones posibles: el PVP forma puentes de H₂ con los fenoles, inhibe competitivamente a la o-difenoloxidasas y forma enlaces con taninos; el DTT es un agente reductor; el DMSO forma puentes de H₂ con fenoles y el Mercapto-etanol es un agente reductor, forma puentes de H₂ con los fenoles y es inhibidor competitivo de la o-difenoloxidasas. Sin embargo, con este mismo buffer no fue posible extraer las enzimas de tejido foliar de plántulas y juveniles colectados del campo. Para éstos fue necesario utilizar el buffer de "Mit mod." que tiene muchos más compuestos que el de "Ells.mod.". Este resultado nos indica que en las plántulas y juveniles crecidas en condiciones naturales existe una mayor dificultad para extraer las enzimas del tejido, probablemente debido a la presencia de una mayor concentración o variedad de fenoles, que en plántulas crecidas en el laboratorio y en adultos.

Como conclusión de lo aprendido en esta parte del trabajo se sugiere que al buscar un buffer de extracción para la expresión de enzimas en una especie particular se comience con un buffer muy simple que combine compuestos químicos con varias funciones (ver tabla II.2). Por ejemplo el de "Ells.mod.", que contiene PVP, mercaptoetanol, DTT y DMSO (este compuesto químico se debe usar con precaución porque existen reportes en la literatura (Kelley y Adams 1977) de que permeabiliza las membranas permitiendo la entrada de

sustancias tóxicas). Estos compuestos realizan casi todas las funciones de los componentes químicos mostrados en la tabla II.3. En caso necesario, sería recomendable ir añadiendo 4 compuestos más: DIECA, metabisulfito de Na, Borax y ácido ascórbico. Dicha experimentación, en contraste al uso de un buffer complicado reportado en la literatura, puede desenmascarar posibles problemas de expresión de algunas enzimas y de interpretación de los patrones de bandeó, así como evitar el uso de compuestos innecesarios.

CAPITULO III

MONTAJE DE LOCI ENZIMATICOS

PRESENTACION Y OBJETIVOS

Existe una extensa lista de trabajos que han utilizado marcadores enzimáticos para estudiar la biología de poblaciones de especies vegetales (Gottlieb 1981). El número de loci polimórficos montados depende de la especie y del número de poblaciones con que se trabaja, pero también de los objetivos de cada estudio particular. Sin embargo, en la mayoría de los estudios se montan relativamente pocos loci y casi nunca se evalúa la representatividad de la muestra de isoenzimas o si ésta es sesgada con respecto a la variabilidad de las enzimas (Gillespie y Kojima 1968; Gillespie y Langley 1974; Johnson 1974). En este trabajo se intentó montar el mayor número de loci polimórficos posible para Cecropia obtusifolia porque uno de los objetivos del proyecto general era hacer un análisis de paternidad (Chakraborty, Meagher et al. 1988), pero también porque se pretendía evaluar la representatividad de la muestra de isoenzimas en cuanto a la variabilidad genética.

En este capítulo se describe el montaje de 48 loci, se presentan sus zimogramas y la interpretación genética de los loci polimórficos. Además, se discute la validez de dichas interpretaciones con base en lecturas repetidas de los genotipos de cada individuo, de arreglos genotípicos de progenie de plantas madres cuyo genotipo se conoce, y se presentan análisis preliminares para corroborar la herencia mendeliana de los loci. Finalmente, se discute la variabilidad isoenzimática encontrada para Cecropia obtusifolia en términos de la función, la estructura molecular de las enzimas estudiadas y la ruta metabólica en la que participan.

ANTECEDENTES

Las enzimas pueden presentar varias formas moleculares detectables electroforéticamente (isoenzimas). Dichas formas están codificadas por diferentes loci genéticos y para las isoenzimas polimórficas es posible detectar varios electromorfos que se interpretan como diferencias alélicas (aloenzimas). Por lo tanto, los patrones de bandeado aloenzimático pueden ser utilizados para cuantificar las frecuencias génicas y genotípicas, que constitu-

yen los estimadores básicos de la composición genética de una población. La variación a este nivel ha sido ampliamente documentada en organismos biológicos en condiciones naturales (ver revisión en Hart y Clark 1989.)

A pesar de que las isoenzimas son útiles para obtener estimaciones de la variación genética de las poblaciones biológicas, existen tres tipos de factores que pueden sesgar o limitar el uso de dichas estimaciones. El primer grupo de factores está relacionado con la representatividad del genoma y la capacidad técnica de detección de la variación existente a nivel enzimático. En primer término, la variación a nivel enzimático solo representa loci que codifican para proteínas, y una proporción importante del genotipo no queda representada en estudios a este nivel (Gottlieb 1981; Lewontin 1974). En segundo término, parte de la variación a nivel aloenzimático mismo puede no ser detectada por los métodos convencionales de electroforesis (Ramshaw, Coyne et al. 1979). En tercer lugar, el muestreo de las enzimas incorporadas en un estudio particular puede ser sesgado hacia las proteínas con mayor o menor susceptibilidad de variación alélica. Lewontin (1974) ha puntualizado que la variación genética puede estar subestimada en estudios de Drosophila y Mus en los cuales se han sobrerrepresentado las enzimas de la glucólisis, con sus menos variables que el resto (ver también Gillespie y Kojima 1968; Johnson 1974).

Un segundo grupo de factores que puede sesgar los resultados obtenidos, con base en estudios de isoenzimas, involucra a los procesos bioquímicos que producen artefactos en las bandas electroforéticas. Varios factores bioquímicos pueden producir patrones de bandeado como producto de efectos ambientales más que de variaciones genéticas, o como efecto de las condiciones de extracción como se discutió en el capítulo anterior. Por ejemplo, se pueden encontrar diferencias electroforéticas en la misma isoenzima cuando ésta se presenta en diferentes estadios del ciclo de vida de un organismo (Powell y Lichtenfels 1979). Las diferencias se dan con respecto a carga, habilidad catalítica y/o respuesta a las modificaciones ambientales. Estas diferencias pueden ocurrir debido a las modificaciones que ocurren después de la síntesis. Generalmente se les llama modificaciones postranscripcionales y se pueden encontrar varios tipos: 1) Fosforilación (en la cual un fosfato se esterifica al grupo Hidroxilo), 2) Glucosilación (en la cual uno o más azúcares se pegan a la molécula) y 3) Metilación o acetilación (en el cual se añaden uno o más grupos

metil o acetil). Las modificaciones postranscripcionales repercuten de tres maneras sobre el polimorfismo encontrado: 1) aparecen como variación heredable, 2) aparecen como variación no heredable y 3) si los loci que modifican son dominantes, los heterocigotos de la enzima no se observan (Finnerty y Johnson 1979).

Finalmente, existe un tercer tipo de factores que tienen importancia porque pueden afectar el patrón de segregación alélica y distribución de loci enzimáticos, que generalmente se asumen como mendelianos. La segregación no mendeliana de un locus puede deberse a la existencia de deriva meiótica (e.g. Lewontin y Dunn 1960; White 1978), selección gamética (Mulcahy y Kaplan 1979), selección zigótica (Mulcahy y Kaplan 1979) o selección en los estadios previos a la fase del ciclo de vida estudiado (e.g., en el paso de semillas a plántulas). La distribución no mendeliana de los loci ocurre cuando éstos se encuentran en el mismo cromosoma y suficientemente cercanos entre sí como para tener tasas de recombinación menores que 0.5 (Hartl y Clark 1989). La herencia de los marcadores enzimáticos deberá tomarse en cuenta al utilizarlos para estimar los parámetros de la estructura genética de las poblaciones, o para hacer otro tipo de análisis (e.g., análisis de paternidad, ver Ellstrand y Levin 1990, y capítulo IV).

La variación a nivel enzimático ha sido ampliamente documentada en especies vegetales (Gottlieb 1981). En plantas, el número de isoenzimas génicas es bastante constante entre especies y refleja, por un lado, el número de compartimentos subcelulares (mitocondrias, plástidos, peroxisomas y citoplasma) en que se requiere la misma reacción catalítica (o una reacción catalizada por esa enzima), y, por otro, la presencia de más de una isoenzima en el mismo compartimento. Esto último indica un proceso de duplicación génica o, en el caso de especies poliploides, de adición de genomas (Gottlieb 1982).

Con base en la información del número de loci que se prueban y montan en diferentes especies y en información bioquímica, fisiológica y celular se han postulado hipótesis acerca del potencial de variación genética de las enzimas, en relación a su localización celular, su estructura química y su papel funcional en las vías metabólicas (Gottlieb 1974; Johnson 1974; Johnson 1979; Kephart 1970; Zouros 1979). Esta información es de gran relevancia ya que, por un lado, sirve para obtener patrones

de variación que sustenten el planteamiento de hipótesis acerca de los factores bioquímicos y fisiológicos que favorecen o no la variabilidad aloenzimática y, por otro lado, permiten evaluar la validez de estimaciones de variación genética de una población con base en una muestra particular de enzimas (Lewontin 1974).

Hay evidencia de que las isoenzimas tienen diferente grado de variabilidad dependiendo de su localización subcelular (esto puede deberse a la función biológica específica que realice la isoenzima). Por ejemplo, las PGI de plástidos de varias especies de plantas son menos variables que las del citoplasma tanto en la cantidad de alelos, como en las movilizaciones electroforéticas de éstos (Gottlieb 1982).

Existe también cierta evidencia sobre la relación entre el grado de variabilidad electroforética y la función catalítica de las enzimas. Se sabe que las enzimas que utilizan muchos sustratos, usualmente artificiales (peroxidasas, fosfatasas, esterases y peptidasas), son más polimórficas y variables en su estructura cuaternaria que aquellas que actúan sobre un único sustrato dentro de la célula (Gottlieb 1981; Zouros 1979). En general, las enzimas que funcionan con un solo sustrato están involucradas en el metabolismo intermedio, mientras que las de múltiples sustratos catalizan reacciones más generales (Gottlieb 1981). También se ha propuesto (Johnson 1979) que las enzimas reguladoras son más variables que el resto y que este hecho puede tener carácter adaptativo. Finalmente, se ha observado que aque las enzimas directamente relacionadas con la glucólisis (e.g., HK, PGM, TPI y PGI) son menos variables que el resto de las enzimas (Kojima, Gillespie y Tobar, 1970, citado en Lewontin 1974).

Ya que resulta difícil evaluar qué enzimas y qué isoenzimas de éstas las reguladoras, Gottlieb (1981) sugiere relacionar la variabilidad isoenzimática con las características estructurales como peso molecular y número de subunidades, más que con su función. Se espera que las enzimas más grandes sean más variables que las pequeñas por estar codificadas por un número mayor de genes (Gottlieb 1981). También se sugiere que las enzimas monoméricas sean más variables que las oligoméricas, porque en las últimas hay un mayor número relativo de aminoácidos en el sitio activo que en las primeras, y esto restringe el número de lugares donde se puede mantener la variación (Gottlieb

1981).

MATERIALES Y METODOS

En este trabajo se utilizaron macerados de todo el tejido foliar sin hacer extracciones subcelulares parciales ya que se sabe que no hay formación de enzimas híbridas entre las subunidades de proteínas oligoméricas localizadas en diferentes compartimentos subcelulares (Gottlieb 1982). La metodología de colecta, conservación, extracción, electroforesis y tinción de las muestras se detalla en el Apéndice 1.

Para esta parte del trabajo se incluyeron todos los individuos adultos de *Cecropia obtusifolia* encontrados en una parcela de 5 hectáreas y una franja de 30 metros alrededor de ésta en la selva de Los Tuxtlas, Veracruz (área total 8.96 ha). Se colectó material foliar de la segunda a la cuarta hoja de 45 árboles macho y 54 árboles hembra.

Se corrieron 30 geles en 4 sistemas de buffer (sistema 7, 8; Histidina y Morfolin). Se probaron 33 enzimas para 18 a 300 individuos cada una (ver tabla III.2). Los sistemas de buffer utilizados y las recetas de tinción específicas para cada enzima se describen en el Apéndice 1. Para cada uno de los loci se midió la migración de cada alelo (ver figuras 3.1 a-f).

Cada individuo fué determinado genéticamente para cada uno de estos 9 loci polimórficos un promedio de 4 veces para corroborar las lecturas y evaluar la repetitividad de las mismas. Para comprobar la herencia e interpretación genética de los pares de bandeos de los 9 loci polimórficos con clara resolución se corrieron 30 individuos (progenie) de 3 madres con genotipo conocido, y 10 individuos de otras 3 madres. Con estos datos se llevaron a cabo análisis preliminares para corroborar la herencia mendeliana de los loci montados. El primer análisis se realizó para probar la segregación aleatoria de los alelos y el segundo para probar la distribución independiente de los loci. En ambos casos se utilizó una prueba de G (si los grados de libertad son iguales a 1 se hizo una corrección de Yates [Sokal y Rohlf 1969; pág. 591] para comparar las frecuencias genotípicas observadas y las esperadas en la progenie asumiendo apareamiento aleatorio (ver Apéndice 2.a).

Para probar si el grado de variabilidad de las enzimas es independiente de sus características estructurales y funcionales se utilizó un modelo log-

linear y una prueba con base en el estadístico G. Se probó la hipótesis nula de que la proporción de enzimas polimórficas y monomórficas es independiente de la característica proteica considerada en cada caso. En todos los casos el número de grados de libertad fue igual al número de clases consideradas (de la característica estructural o funcional) menos uno (Zar 1974, pg. 67). En los casos en que la G resultó significativa, se aplicó una prueba de comparación múltiple a posteriori por STP (Sokal y Rohlf 1969, pg. 582-584) para probar entre cuales de las clases había diferencias significativas en la proporción de enzimas polimórficas.

RESULTADOS

De 37 enzimas probadas, 26 tuvieron actividad y 48 loci mostraron buena resolución

De éstos, 13 resultaron polimórficos, pero para cuatro (para las enzimas: AK, GPT, β GAL, TPI) aún no tenemos una interpretación genética confiable por lo que no se consideraron en los análisis posteriores.

En las Figuras 3.1a, b, c, d, e y f se muestran los zimogramas para 26 enzimas y 48 loci. A continuación se presenta la interpretación genética de los 13 loci polimórficos con buena resolución. En el resto se observó solo una banda para todos los individuos analizados en cada una de las zonas de actividad enzimática interpretada como un locus diferente.

GOT. Presentó dos zonas de actividad enzimática una a 0.9 cm y otra a 4.0 cm. Esta segunda isoenzima, GOT2, tiñe más intensa y rápidamente que la otra por lo que aparece antes en el gel. Tanto la GOT1 como la GOT2 presentan 2 alelos y los tres genotipos esperados; sin embargo, para esta última isoenzima la frecuencia del genotipo 22 es baja y varios individuos con genotipo 11 presentan algunas veces una segunda banda.

AcPH. Para esta enzima se observaron dos zonas con actividad enzimática. La AcPH1 se encuentra a 0.8cm del origen y es un locus monomórfico, la segunda isoenzima está a 2.5cm del origen y presenta tres alelos con los seis genotipos esperados. Sin embargo, en este caso es muy difícil distinguir a los genotipos 11, 12 y 22 porque los dos primeros alelos se encuentran muy cerca en tres.

Fe. Presenta tres zonas de actividad; las dos

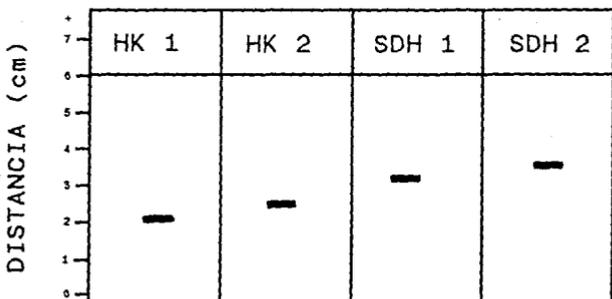
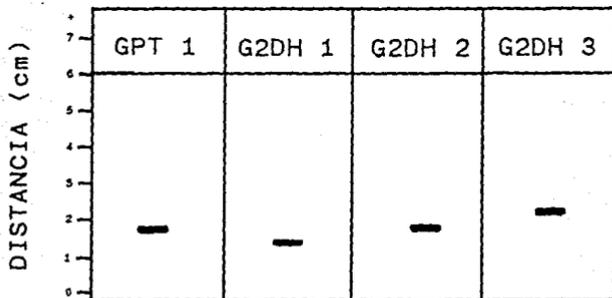
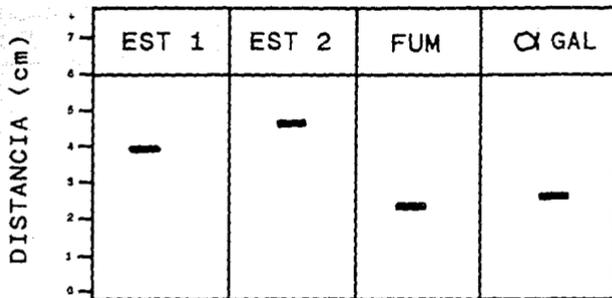


Figura III.1a. Patrones de bandeo que presentaron las enzimas monomórficas

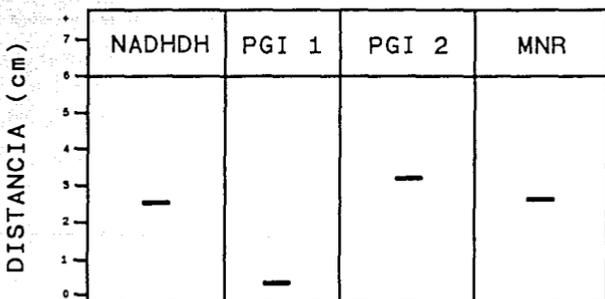
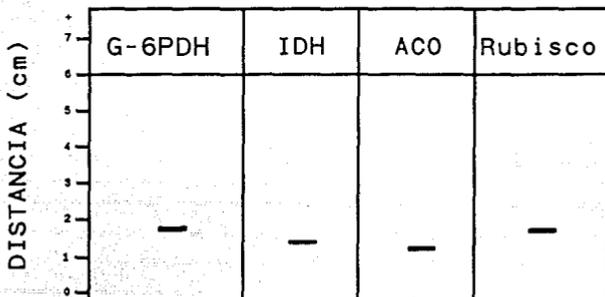
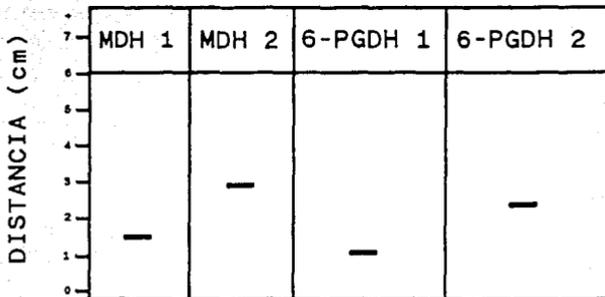


Figura III.1b. Patrones de bandeado que presentaron las enzimas monomórficas

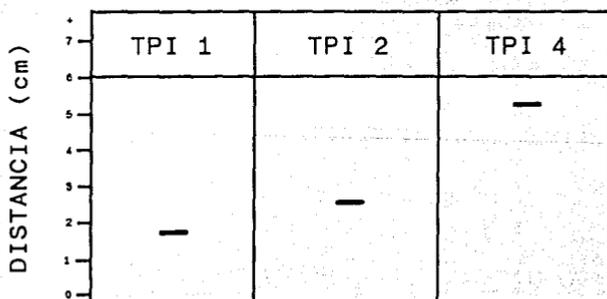
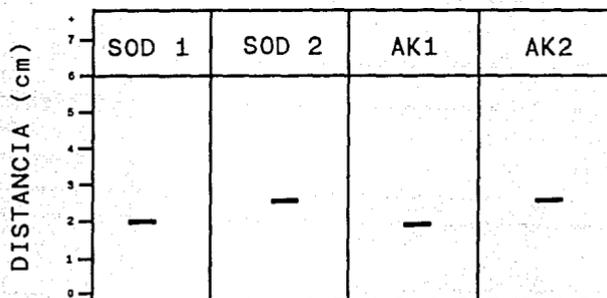
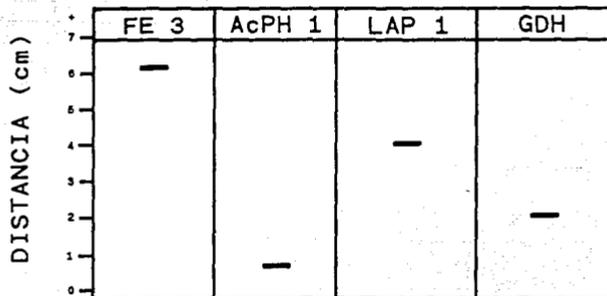


Figura III.1c. Patrones de bandeo que presentaron las enzimas monomórficas

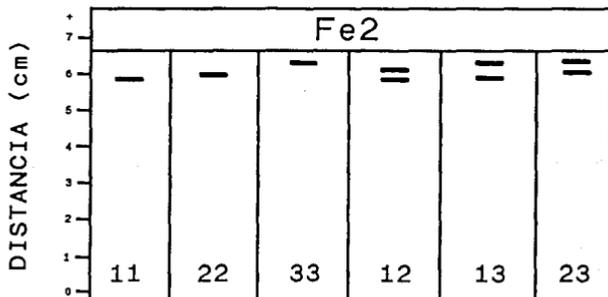
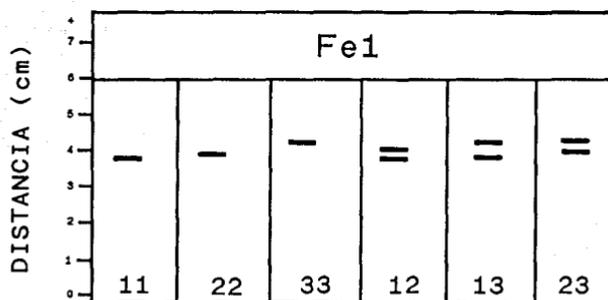
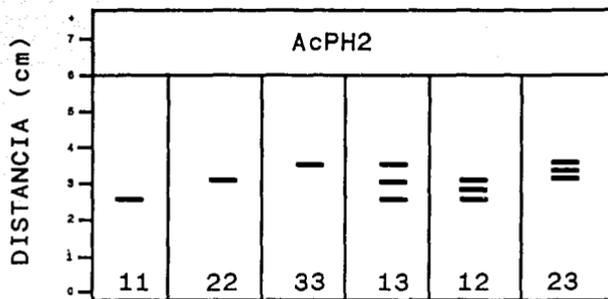


Figura III.1d. Patrones de bandeado que presentaron las enzimas polimórficas

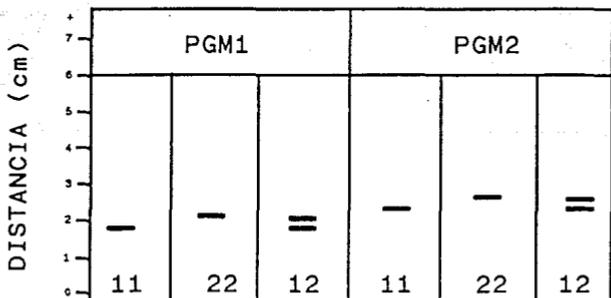
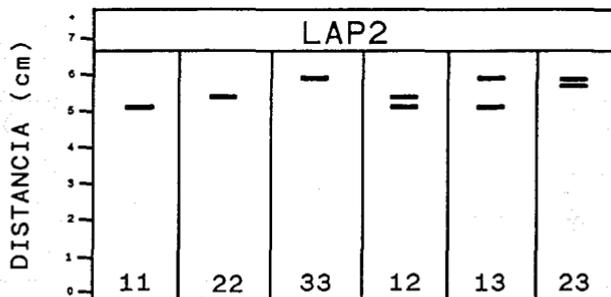
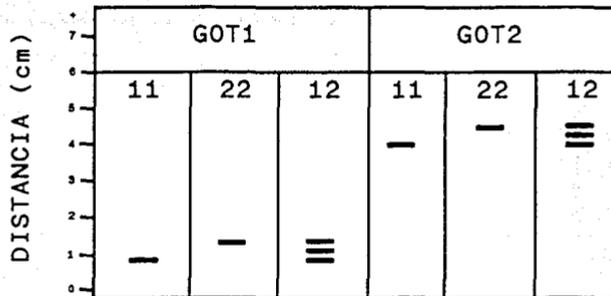


Figura III.1e. Patrones de bandeo que presentaron las enzimas polimórficas

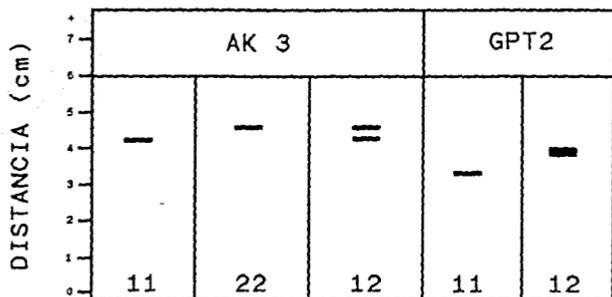
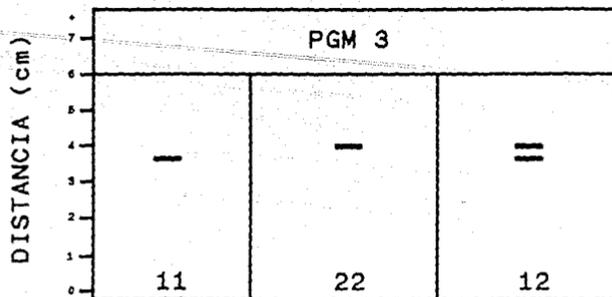


Figura III.1f. Patrones de bandeado que presentaron las enzimas polimórficas

primeras se han interpretado como dos loci polimórficos con 3 alelos cada una y la última representa un locus monomórfico. La Fe1 se encuentra a 3.8cm, la Fe2 a 5.8cm y la Fe3 a 6.1cm del origen. Para la Fe1 no se han encontrado individuos homocígos 11 ni 33 y casi no se observan individuos heterocígos 12 o 13. El alelo 1 de la Fe2 tiene una frecuencia muy baja; no se han encontrado individuos con genotipos 11 y 22 y muy pocos 12.

LAP. En esta enzima se presentan 2 zonas de actividad, una a 4cm y la otra a 5.1cm. La LAP1 es un locus monomórfico mientras que la LAP2 es polimórfico con tres alelos, encontrándose los seis genotipos esperados. Los homocígos 11 y 22, y heterocígos 12 se presentan en muy bajas frecuencias. En este locus el alelo 1 tiñe muy tenuemente y es importante dejar teñir a la enzima durante un tiempo suficiente para cerciorarse de que este alelo aparezca en el gel.

PGM. Presenta 3 zonas de actividad a 1.8, 2.1 y 3.6 cm del origen. Las tres isoenzimas son polimórficas con dos alelos cada una pero las dos primeras presentan frecuencias muy bajas para alguno de los dos alelos y presentan poca actividad en algunos individuos. Para la PGM3 hemos encontrado los tres genotipos bien representados.

Para las siguientes cuatro enzimas aún no se tiene una interpretación genética clara, pero se describen de manera preliminar.

AK. Presenta 3 zonas de actividad a 2.0, 2.6 y 4.6 cm del origen. Los dos primeros loci son monomórficos y el último es polimórfico con 2 alelos y los tres genotipos esperados.

GPT. Presenta dos zonas de actividad a 1.9 y 4.0 cm del origen. El primer locus es monomórfico y el segundo polimórfico aunque sólo se han observado los genotipos 11 y 12.

β GAL. Presenta 1 zona de actividad a 4.1 cm del origen. Este locus es polimórfico con 2 alelos aunque sólo se han visto los genotipos 12 y 22.

TPI. Presenta 4 zonas de actividad a 1.8, 2.5, 3.1 y 5.2 cm del origen. Los loci 1, 2 y 4 son monomórficos y el tercer locus es polimórfico con 2 alelos. Sólo se han logrado observar los genotipos 12 y 22.

En la tabla III.2 se muestran todas las

enzimas montadas para *Cecropia obtusifolia* a partir de macerados de tejido foliar, el número de loci montados, y algunas características estructurales y funcionales de las enzimas.

Los genotipos de 6 arreglos de progenie de plantas madre con genotipo conocido para todos los loci polimórficos son coherentes con los genotipos de la planta madre. Sin embargo, aún se tienen problemas para distinguir entre algunos de los genotipos de tres de los loci polimórficos montados. Las cuatro lecturas repetidas para cada individuo coincidieron para los loci GOT1 y 2, FE1 y 2, LAP2, y PGM3. Pero en la AcPH2 hubo incongruencias entre lecturas para los genotipos 11, 22 y 12, y en la PGM1 y 2 hubo incongruencias entre lecturas de los genotipos 12 y 22.

Como pruebas preliminares de la herencia de los loci polimórficos montados se presentan datos de la distribución genotípica de la progenie de plantas madre con genotipos conocidos. Estos se utilizaron para probar las hipótesis de segregación alélica y de distribución independiente de los loci. Para probar la primera hipótesis se comparó la distribución genotípica observada en 15 arreglos de progenie de plantas madre con genotipos conocidos, con la distribución esperada suponiendo apareamientos al azar con la población de machos muestreada y segregación mendeliana (Tabla III.3, y Apéndice 2.a). Las frecuencias observadas y esperadas difirieron significativamente en 7 de los 15 arreglos. De éstos, 3 corresponden a los tres arreglos probados para AcPH2, y los otros cuatro a arreglos de GOT1 y 2, de PGM1 y de FE1 cada uno.

Como un primer acercamiento para corroborar la distribución independiente de los loci se hizo un análisis de ligamiento entre todas las parejas posibles de loci con base en los datos de uno de los arreglos de progenie de plantas madre con genotipo conocido. En este análisis se comparó la distribución de frecuencias de los genotipos bi-loci observada en la progenie, con la distribución esperada suponiendo que los loci de la pareja en cuestión se distribuyen independientemente y el apareamiento es al azar (Tabla III.4 y Apéndice 2.a). Diecinueve de las 36 parejas de distribuciones comparadas resultaron significativamente distintas entre sí. De éstas, 8 corresponden a genotipos bi-loci de AcPH2 y algún otro locus, y el resto de las isoenzimas presentaron de 2 a 5 parejas con distribuciones estadísticamente distintas a las esperadas.

Tabla III.2 Enzimas extraídas de macerados de tejido foliar de *Cecropia obtusifolia*

L: No participan en una ruta metabólica específica.

Enzima	E.C	Sus	N.	R.M.# de isoen.	F	<i>Cecropia</i>	#loci	#loci pol.
ACO	M	(US)	205	A.T.	1-3	L	1	0
AcPH	D	NR (MS)	300	L.	2-4	H	2	1
AK	M	R (MS)	100	L.	1-2	T	3	1
ESt	M	NR (MS)	23	L.	Var.	H	2	0
Fe	M	NR (MS)	300	L.	Var.	H	3	2
FUM	T	NR (US)	21	A.T	1	L	1	0
Gal	M	NR (US)	31	L	?	H	1	0
Gal	M	NR (US)	29	L.	?	H	1	1
G2DH	M?	(US)	21	?	?	O	3	0
G6PD	D	R (US)	32	P.C.C	2	O	1	0
GDH	T	(US)	23	M.A.A	2	O	1	0
GOT	D	NR (US)	300	M.A.A	2-4T	2	2	2
GPT	M	R (US)	71	M.A.A	?	T	2	1
HK	M	R (US)	40	G	2-3T	2	0	0
IDH**	D	NR	74	?	2	O	1	0
IDH*	D	R		A.T.				
LAP	M	NR (MS)	300	L.	2-3H	2	1	1
MDH**	D	NR	224	A.T.	3	O	2	0
MDH*	D	NR						
MNR	D	?	72	L.	1-4O	1	0	0
NADHHDH	?	?	71	?	2	O	1	0
6PGDH	D	NR (US)	92	P	2	O	2	0
PGI	D	R (US)	73	G	2	I	2	0
PGM	M	R	300	GLU	2	T	3	3
Rubisco	M	?	23	C.	?	?	1	0
SDH	M	?	118	L.	1-2O	2	0	0
SOD	D	NR (US)	43	L	1-2O	2	0	0
TPI	D	NR (US)	18	C.C.G	2	I	4	1

*Mitocondrial; **Citoplasmática.

E.C. Estructura cuaternaria Sus. Sustrato

M: Monómero NR: No reguladora

D: Dímero R: Reguladora

T: Tetramero US: Único sustrato

MS: Múltiples sustratos

N. número de individuos corridos

R.M. Ruta metabólica en F. Función:

la que participan: O: Oxido-reductasas

C.C: Ciclo de Cal vin T: Transferasas

A.T: Ácidos tricarbóxicos H: Hidrolasas

P: Metabolismo de las pentosas L: Liasas

específica I: Isomerasas

G: Glucólisis

M.A.A: Metabolismo de aminoácidos

GLU: Gluconeogénesis

De las 26 enzimas montadas para *Cecropia obtusifolia*, 3 (TPI, PGM y AK) presentan más isoenzimas de las que se reportan en la literatura, probablemente debido a un proceso de duplicación génica en nuestra especie. Cuatro de las enzimas (G6PDH, GDH, MDH y NADHHDH) presentan menos isoenzimas de las reportadas para otras especies, y esto puede deberse a una inadecuada extracción de estas enzimas del tejido de *Cecropia* (Tabla III.2).

Con base en los resultados de la tabla III.2 se analiza la relación entre la variabilidad proteica encontrada en *Cecropia obtusifolia* y algunas de las características estructurales de las enzimas ensayadas. En primera instancia, se encontró que aunque la relación entre la estructura cuaternaria y la variabilidad de las enzimas está en la tendencia esperada, la proporción de enzimas polimórficas y monomórficas es estadísticamente independiente de la estructura cuaternaria de las proteínas ($G = 1.7304$; $g.l. = 2$; $p > 0.05$). De todas las isoenzimas probadas sólo hay 2 que son tetraméricas y ambas son monomórficas; 24 son monoméricas y de éstas 8 son polimórficas; y 20 son díméricas y de éstas 5 son polimórficas.

La tendencia de la relación entre la proporción de enzimas polimórficas y el número de sustratos que utilizan también está en el sentido esperado. Sin embargo, dicha tendencia tampoco es estadísticamente significativa ($G = 0.9582$; $g.l. = 1$; $p > 0.05$). De todas las isoenzimas montadas 12 tienen sustrato variable y 5 de éstas son polimórficas, mientras que 25 tienen un solo sustrato y 5 son polimórficas.

En cuanto al papel regulador de las enzimas encontramos que de las 13 isoenzimas reguladoras que se montaron, 5 son polimórficas para nuestra especie; y de las 24 no reguladoras, 8 son polimórficas (para este análisis no se consideró a la IDH por no saber de qué isoenzima se trata). En este caso la tendencia esperada también se cumple (las reguladoras son ligeramente más variables que las no reguladoras). Sin embargo esta tendencia tampoco es estadísticamente significativa ($G = 0.0021$; $g.l. = 1$; $p > 0.05$).

La proporción de isoenzimas polimórficas sí es significativamente dependiente ($G = 25.8484$; $g.l. = 6$; $p > 0.001$) de la ruta metabólica en la que

Tabla 111.3 Análisis de progenie de madres con genotipo conocido de *Cecropia obtusifolia*

			Genotipos						Estadístico	Nivel de significancia
ENZIMA	♀	N	11	22	33	12	13	23	G	P
LAP	33	80	---	---	69	---	7	4	1.2518	NS
	13	30	0	---	12	0	17	1	1.2363	NS
GOT1	22	50	---	40	---	10	---	---	6.5091	.01<P<.005
	12	28	5	6	---	17	---	---	1.5166	NS
GOT2	11	108	65	---	---	43	---	---	43.029	P<.001
Acp2	13	20	15	---	0	0	5	0	26.943	P<.001
	12	30	25	3	---	0	2	0	53.669	P<.001
	11	29	27	---	---	0	2	---	25.481	P<.001
Fe1	22	78	---	76	---	0	---	2	6.3956	.05<P<.025
Fe2	33	64	---	---	51	---	1	12	1.519	NS
	23	26	---	2	13	0	0	11	2.3762	NS
PGM1	22	89	---	88	---	1	---	---	4.6244	.05<P<.025
PGM2	11	80	79	---	---	1	---	---	0	NS
PGM3	22	76	---	71	---	5	---	---	3.5591	NS
	12	29	4	12	---	13	---	---	1.5301	NS

Se utilizó el estadístico G para comparar las frecuencias genotípicas observadas con las esperadas. Ver texto para detalles de análisis.

Tabla III.4 Análisis de ligamiento de 9 loci con base en la distribución genotípica de la progenie de una hembra de genotipo conocido para *Cecropia obtusifolia*

	GOT1	GOT2	Fe1	Fe2	PGM1	PGM2	PGM3	AcPH
LAP	9.3942 NS	23.1026 P<0.001	7.1296 NS	33.1617 P<0.001	6.8137 NS	4.7529 NS	15.9691 .005>P>.001	31.561 P<0.001
	GOT1	22.3726 .005>P>.001	4.6997 NS	10.2429 NS	2.9483 NS	0.407 NS	7.1657 NS	31.971 P<0.001
		GOT2	8.6203 NS	14.5936 0.01>P>0.005	8.3619 .05>P>.025	6.7719 .01>P>.005	14.4833 .005>P>.001	46.745 P<0.001
			Fe1	8.9436 NS	2.9242 NS	8.0348 .025>P>.01	3.1241 NS	26.828 P<0.001
				Fe2	13.2861 .025>P>.01	10.8257 .005>P>.001	12.3135 NS	32.175 P<0.001
					PGM1	.2318 NS	3.2639 NS	23.021 P<0.001
						PGM2	.4938 NS	19.85 P<0.001
							PGM3	28.972 P<0.001

Nota: Se utilizó el estadístico G para comparar las frecuencias genotípicas esperadas con las observadas. Ver texto para detalles de análisis.

participan (ácidos tricarbóxicos, glucólisis, libre-no están en alguna ruta metabólica específica, metabolismo de pentosas, gluconeogénesis, metabolismo de amino ácidos, y ciclo de Calvin). Una prueba de comparación múltiple mostró que las isoenzimas de la gluconeogénesis son significativamente más variables que el resto excepto de aquellas que participan en metabolismo de aminoácidos. Pero, estas últimas no difieren significativamente ($p < 0.05$) en cuanto a porcentaje de isoenzimas polimórficas de las isoenzimas del resto de las vías metabólicas. También se probó que, para el caso de *Cecropia obtusifolia*, las enzimas que participan en la glucólisis (HK, PGI, y TPI) no son significativamente menos variables que las que participan en las demás vías metabólicas ($G = 0.4840$; $g.l. = 1$; $p > 0.05$).

Finalmente se encontró que la función enzimática de las proteínas montadas, también parece estar relacionada con la variabilidad de las mismas. Se encontró que la proporción de isoenzimas polimórficas y monomórficas es significativamente dependiente ($G = 18.5671$; $g.l. = 4$; $P < 0.001$) de la función que desempeñan (hidrolasas, transferasas, liasas, oxidoreductasas e isomerasas). Una prueba de comparación múltiple para estos datos mostró que las hidrolasas, isomerasas y transferasas no difieren entre sí en cuanto a la proporción de isoenzimas polimórficas, pero las hidrolasas y transferasas sí son significativamente ($p < 0.05$) más variables que las liasas y oxidoreductasas.

DISCUSION

El montaje de 48 loci para *Cecropia obtusifolia* confirmó que el buffer de extracción utilizado funcionó satisfactoriamente en la extracción de un gran número de isoenzimas. Además el hecho de que el número de loci para la mayoría de las enzimas sea igual en *Cecropia obtusifolia* que en el resto de las especies vegetales estudiadas, corrobora que se logró una extracción enzimática satisfactoria (ver tabla III.2).

En este trabajo se ensayaron y montaron un número de loci mayor del que generalmente se ensaya en estudios de poblaciones de plantas (promedio = 26 loci; Hamrick, Linhart et al. 1979; Hamrick y Loveless 1986b). El ensayar un gran número de loci para una especie tiene la ventaja de mejorar la representatividad de la muestra del genoma al estimar la variación genotípica de las poblaciones. Además, solamente cuando se tiene un número suficientemente grande de loci se pueden

probar las hipótesis acerca de la relación entre la variabilidad de las enzimas y sus características estructurales y funcionales.

Las lecturas repetidas de los individuos y los genotipos observados en arreglos de progenies pro venientes de plantas madre con genotipo conocido mostraron que las interpretaciones genéticas de la mayoría de los loci son consistentes. Aún se tienen problemas en tres de los loci (AcPH2, PGM1 y PGM2) en que resulta difícil discernir entre algunos de los genotipos. Para solucionar este problema, se van a obtener, a partir de la progenie de los dos padres con genotipo conocido, individuos controles que tengan los genotipos problema (11, 12 y 22 para la AcPH2; y 22 y 12 para la PGM1 y 2). Estos controles se utilizarán al correr muestras de todos los individuos que pueden tener estos genotipos problema de acuerdo a las determinaciones que ya se han hecho para estos mismos individuos.

La herencia mendeliana de los loci polimórficos montados sólo se ha probado de manera preliminar. Al no tener arreglos genotípicos de progenie de ambos padres con genotipos conocidos no se puede discernir entre las hipótesis de apareamiento al azar, y de segregación y distribución independientes. Para el caso de las pruebas de segregación alélica independiente, se encontró que todos los arreglos probados para la AcPH2 presentaron frecuencias observadas significativamente diferentes de las esperadas. Debido a que en esta enzima es difícil discernir entre algunos genotipos, se piensa que dichas desviaciones podrían atribuirse a errores de lectura más que a segregación no mendeliana o a apareamientos no aleatorios. Lo mismo se puede decir de la PGM1. También se encontró diferencia significativa para una de las combinaciones madre-progenie de GOT1. En este caso, el que se haya encontrado diferencia significativa en una de las parejas y en otra no, sugiere que la diferencia se debe a apareamiento no azaroso más que a segregación no mendeliana. Esta interpretación se apoya también en que las hembras de los arreglos probados para esta isoenzima fueron diferentes (ver tabla III.3). Finalmente, el hecho de que se haya encontrado diferencia para la Fe1 se puede atribuir o a apareamiento no aleatorio o a segregación no mendeliana, o simplemente a error tipo I.

Para explorar la hipótesis de apareamiento aleatorio se realizó otro análisis de progenie en donde se calcularon las frecuencias esperadas supo-

participan (ácidos tricarbóxicos, glucólisis, libre-no están en alguna ruta metabólica específica, metabolismo de pentosas, gluconeogénesis, metabolismo de amino ácidos, y ciclo de Calvin). Una prueba de comparación múltiple mostró que las isoenzimas de la gluconeogénesis son significativamente más variables que el resto excepto de aquellas que participan en metabolismo de aminoácidos. Pero, estas últimas no difieren significativamente ($p < 0.05$) en cuanto a porcentaje de isoenzimas polimórficas de las isoenzimas del resto de las vías metabólicas. También se probó que, para el caso de *Cecropia obtusifolia*, las enzimas que participan en la glucólisis (HK, PGI, y TPI) no son significativamente menos variables que las que participan en las demás vías metabólicas ($G = 0.4840$; g.l. = 1; $p > 0.05$).

Finalmente se encontró que la función enzimática de las proteínas montadas, también parece estar relacionada con la variabilidad de las mismas. Se encontró que la proporción de isoenzimas polimórficas y monomórficas es significativamente dependiente ($G = 18.5671$; g.l. = 4; $P < 0.001$) de la función que desempeñan (hidrolasas, transferasas, liasas, oxidoreductasas e isomerazas). Una prueba de comparación múltiple para estos datos mostró que las hidrolasas, isomerazas y transferasas no difieren entre sí en cuanto a la proporción de isoenzimas polimórficas, pero las hidrolasas y transferasas sí son significativamente ($p < 0.05$) más variables que las liasas y oxidoreductasas.

DISCUSION

El montaje de 48 loci para *Cecropia obtusifolia* confirmó que el buffer de extracción utilizado funcionó satisfactoriamente en la extracción de un gran número de isoenzimas. Además el hecho de que el número de loci para la mayoría de las enzimas sea igual en *Cecropia obtusifolia* que en el resto de las especies vegetales estudiadas, corrobora que se logró una extracción enzimática satisfactoria (ver tabla III.2).

En este trabajo se ensayaron y montaron un número de loci mayor del que generalmente se ensaya en estudios de poblaciones de plantas (promedio = 26 loci; Hamrick, Linhart et al. 1979; Hamrick y Loveless 1986b). El ensayar un gran número de loci para una especie tiene la ventaja de mejorar la representatividad de la muestra del genoma al estimar la variación genotípica de las poblaciones. Además, solamente cuando se tiene un número suficientemente grande de loci se pueden

probar las hipótesis acerca de la relación entre la variabilidad de las enzimas y sus características estructurales y funcionales.

Las lecturas repetidas de los individuos y los genotipos observados en arreglos de progenies por venientes de plantas madre con genotipo conocido mostraron que las interpretaciones genéticas de la mayoría de los loci son consistentes. Aún se tienen problemas en tres de los loci (AcPH2, PGM1 y PGM2) en que resulta difícil discernir entre algunos de los genotipos. Para solucionar este problema, se van a obtener, a partir de la progenie de los dos padres con genotipo conocido, individuos controles que tengan los genotipos problema (11, 12 y 22 para la AcPH2; y 22 y 12 para la PGM1 y 2). Estos controles se utilizarán al correr muestras de todos los individuos que pueden tener estos genotipos problema de acuerdo a las determinaciones que ya se han hecho para estos mismos individuos.

La herencia mendeliana de los loci polimórficos montados sólo se ha probado de manera preliminar. Al no tener arreglos genotípicos de progenie de ambos padres con genotipos conocidos no se puede discernir entre las hipótesis de apareamiento al azar, y de segregación y distribución independientes. Para el caso de las pruebas de segregación alélica independiente, se encontró que todos los arreglos probados para la AcPH2 presentaron frecuencias observadas significativamente diferentes de las esperadas. Debido a que en esta enzima es difícil discernir entre algunos genotipos, se piensa que dichas desviaciones podrían atribuirse a errores de lectura más que a segregación no mendeliana o a apareamientos no aleatorios. Lo mismo se puede decir de la PGM1. También se encontró diferencia significativa para una de las combinaciones madre-progenie de GOT1. En este caso, el que se haya encontrado diferencia significativa en una de las parejas y en otra no, sugiere que la diferencia se debe a apareamiento no azaroso más que a segregación no mendeliana. Esta interpretación se apoya también en que las hembras de los arreglos probados para esta isoenzima fueron diferentes (ver tabla III.3). Finalmente, el hecho de que se haya encontrado diferencia para la Fe1 se puede atribuir o a apareamiento no aleatorio o a segregación no mendeliana, o simplemente a error tipo I.

Para explorar la hipótesis de apareamiento aleatorio se realizó otro análisis de progenie en donde se calcularon las frecuencias esperadas supo-

niendo que las hembras en cuestión se aparearon aleatoriamente únicamente con los 5 machos más cercanos (Apéndice 2.a). En ninguno de los casos se anuló la diferencia entre las distribuciones esperadas y observadas, indicando que dichas diferencias se deben probablemente a una segregación no mendeliana, a lecturas equivocadas, o a que el vecindario de apareamiento es distinto al que se definió en estos ensayos. Estas posibles explicaciones se descartarán más adelante con base en arreglos de progenie de cruzas controladas, y con un análisis más detallado de la distribución espacial de los posibles padres a diferentes distancias de los árboles madre.

En el caso de la distribución de los loci se detectaron diferencias significativas para todas las parejas bi-loci con AcPH2, y para todas menos una con GOT2. En este análisis, los arreglos genotípicos con todas las demás isoenzimas difirieron significativamente de los datos esperados cuando menos en dos casos (para parejas con la AcPH2 y alguna otra). La discusión de estos resultados es equivalente a la planteada arriba para el análisis de segregación alélica. En este caso también se tendrán que analizar arreglos genotípicos de cruzas controladas para discernir entre la hipótesis de cruzamiento aleatorio y distribución independiente de los loci. Un análisis de un número grande de progenie combinadas también proporcionarán estimaciones de ligamiento más definitivas.

El hecho de que al agrupar a las enzimas en diferentes grupos funcionales o estructurales se encuentren diferentes grados de variación sugiere que el problema de estimar la variación de los genes que codifican para enzimas, se convierte en una pregunta más de índole fisiológico. Es decir, en tratar de discernir la proporción de isoenzimas cuya variación se encuentra restringida (Gillespie y Kojima 1968).

Los datos de los 48 loci montados para *Cecropia obtusifolia* mostraron que la tendencia en la relación de la proporción de isoenzimas polimórficas y su papel regulador, estructura cuaternaria y número de sustratos que utilizan, está en la dirección esperada por algunos autores (Gillespie y Kojima 1968; Gillespie y Langley 1974; Gottlieb 1981; Johnson 1974). Sin embargo, en ninguno de estos casos la relación fue significativa. Quizás un muestreo aún más exhaustivo de enzimas proporcione diferencias significativas para estos análisis.

Se encontró una asociación significativa

entre la proporción de enzimas polimórficas y el tipo de función que desempeñan las enzimas y la ruta metabólica en la que participan. La asociación que se encontró entre la variabilidad y el tipo de función desempeñada no se había propuesto antes. Se encontró que las isoenzimas hidrolasas y transferasas son significativamente más variables que las liasas y oxido-reductasas. En cuanto a la ruta metabólica en la que participan se encontró que aquellas que participan en la gluconeogénesis son significativamente más variables que aquellas que participan en el ciclo de Calvin, en la glucólisis, en el metabolismo de pentosas, en el ciclo de Krebs, o aquellas que no pertenecen a ninguna ruta metabólica específica (libres). Aunque las enzimas de la glucólisis también fueron ligeramente menos variables que lo esperado al azar, y el resto lo fueron más, tal como se encontró para *Drosophila* (Gillespie y Kojima 1968) y *Mus* (Lewontin 1974), esta tendencia no fue estadísticamente significativa.

El hecho de que para la mayoría de las clasificaciones isoenzimáticas consideradas no se haya encontrado más o menos heterocigotos de los esperados al azar, sugiere que la estimación de variación genética a partir de cualquier muestra aleatoria de enzimas puede ser representativa de la variación del genoma completo de *Cecropia obtusifolia*. Sin embargo, para poder realmente evaluar la representatividad de la muestra isoenzimática en cuanto a variación alélica, sería necesario conocer la proporción de enzimas de los diferentes tipos estructurales y funcionales que son codificadas por todo el genoma.

La comparación de estos análisis con datos para otras especies vegetales resultó difícil por la escasez de este tipo de información en otros estudios. En la mayoría de los casos no se ensayan y montan un número suficientemente grande de enzimas. Además en muchas publicaciones no se reportan todas las enzimas ensayadas y de éstas cuáles resultaron monomórficas o polimórficas. De 25 trabajos revisados para especies vegetales, solamente 8 reportan todos estos datos.

Los resultados de este capítulo sugieren que la mayoría de los loci polimórficos montados para *Cecropia obtusifolia* han sido interpretados adecuadamente, presentan patrones consistentes y en la mayoría de los casos se heredan mendelianamente. A reserva de corroborar estos resultados con base en análisis de arreglos genotípicos de progenie de cruzas controladas, en el siguiente capítulo utilizamos estos loci para obtener datos preliminares de la

variación genética de una población de Cecropia obtusifolia en la selva de Los Tuxtlas. Con base en esta información se evalúa la utilidad del sistema de loci montado para obtener estimadores de la estructura genética de las poblaciones de esta especie, y para realizar análisis de paternidad.

CAPITULO IV

VARIACION ALOENZIMATICA EN UNA POBLACION DE CECROPIA OBTUSIFOLIA EN LA SELVA DE LOS TUXTLAS, VERACRUZ

PRESENTACION Y OBJETIVOS

EL objetivo de la genética de poblaciones es entender y predecir el efecto de los procesos que generan variabilidad genética (segregación, recombinación, transposición y mutación), y ponderar el papel que juegan los factores ecológicos y evolutivos como modificadores de la composición y estructura genética de las poblaciones. Uno de los enfoques de los estudios de genética de poblaciones para cubrir dicho objetivo general ha sido el de describir la variación genética y su estructura dentro y entre poblaciones en condiciones naturales (ver revisiones en Hartl y Clark 1989; Hedrick 1983). Los marcadores moleculares, en particular los isoenzimáticos, han sido muy útiles para caracterizar la estructura de la variación genética en poblaciones naturales. La técnica de electroforesis se ha utilizado con este fin desde hace casi 25 años a partir de los trabajos pioneros de Lewontin y Hubby (1966).

Uno de los mayores éxitos empíricos de la genética de poblaciones ha sido precisamente la descripción de la variación genética de las poblaciones y su estructura con base en marcadores enzimáticos (Hartl y Clark 1989; Hedrick 1983). Sin embargo, existen muy pocos estudios de biología de poblaciones que combinen información genética y demográfica para una misma especie (Burdon, Marshall et al. 1983; Clegg, Kahler et al. 1978a; Clegg, Kahler et al. 1978b; Eguiarte 1990; Schaal y Levin 1976). Para la misma población de Cecropia obtusifolia considerada en este trabajo se cuenta con un estudio demográfico previo (Alvarez-Buylla 1986), y los resultados del trabajo que aquí se presenta servirán de base para plantear un análisis integrado de la ecología y genética de poblaciones de esta especie en la selva de Los Tuxtlas.

En este capítulo se presentan datos de la variación genética a nivel isoenzimático para una población del árbol pionero neotropical Cecropia obtusifolia en la selva de Los Tuxtlas, Veracruz, México. Con base en estos datos se presenta un

primer acercamiento a la discusión del tipo de fuerzas evolutivas que pueden haber moldeado la composición genética de la población estudiada. Esta discusión se basa en la comparación de las frecuencias alélicas y genotípicas para cada locus montado con las frecuencias esperadas por Hardy-Weinberg, y en la estimación del índice de fijación "F".

Con base en los datos de éste y del capítulo anterior se discute, además, la utilidad de la variación detectada con base en marcadores enzimáticos para estudiar procesos poblacionales a escalas relativamente pequeñas. En particular, se discute la utilidad del sistema de loci polimórficos montado, y de los niveles de variación detectados, para una población de Cecropia obtusifolia encontrada en 5 ha de la selva, para abordar preguntas acerca de la estructura genética de la especie en Los Tuxtlas y del movimiento de polen y semillas.

ANTECEDENTES

Con excepción de algunas especies, que han sufrido reducciones poblacionales drásticas (e.g., Waller, O'Malley et al. 1987), la mayoría de las especies vegetales presentan niveles de variación moderados o altos. Los niveles de variación se han correlacionado con características de la biología de las especies; principalmente con el tipo de ciclo de vida, polinización, y distribución geográfica. Se ha encontrado mayor variabilidad en las poblaciones de especies con: ciclos de vida largos en comparación a aquellas de vida corta; con polinización cruzada en comparación a aquellas que se autopolinizan; y con distribuciones amplias o altas densidades locales en comparación a las de distribuciones restringidas o de densidades bajas (Hamrick, Linhart et al. 1979).

La estructura genética de las poblaciones se ha estudiado para muchas especies vegetales (ver revisión en Loveless y Hamrick (1984). En los estudios que reporta esta revisión se utilizan entre 1 y 37 loci polimórficos para estimar los estadísticos de la estructura genética de las poblaciones. Hay otros estudios (e.g., Eguiarte 1990; Linhart, Mitton et al. 1981) en donde se encuentran diferencias en los estimadores de la estructura genética obtenidos con base en diferentes loci para un mismo conjunto de poblaciones; estas diferencias raramente se explican.

Existen muy pocos trabajos que hayan recaudado la información necesaria para realizar análisis

de paternidad con base en marcadores isoenzimáticos en plantas (Ellstrand 1984; Meagher 1986). El análisis de paternidad se puede hacer con base en procedimientos inferenciales asignando al padre más posible por máxima verosimilitud (Meagher y Thompson 1986). Un procedimiento alternativo consiste en asignar paternidad por exclusión genética (Chakraborty, Meagher et al. 1988). Sin embargo, como se ha demostrado para una batería de 8 loci montados para Chamaelirium luteum (L.) (Meagher 1986), la variación isoenzimática es generalmente insuficiente para asignar paternidad unicamente con base en exclusión genética (Chakraborty, Meagher et al. 1988). Pero, si se tiene una probabilidad de exclusión suficientemente alta y se cuenta con la información de la localización espacial de los individuos es posible hacer análisis de paternidad parciales con base en el criterio de exclusión genética.

MATERIALES Y METODOS

Estimadores Utilizados para el Análisis de los datos

Índices de variación genética poblacional: Existen tres diferentes índices que son frecuentemente utilizados para describir la variación genética a nivel de las poblaciones:

1. El índice o proporción de loci polimórficos (P): Se calcula dividiendo el número de loci polimórficos encontrados (la frecuencia del alelo más común no excede 95 o 99%) entre el número de loci montados. Las limitaciones de éste índice son: es sensible al número y tipo de enzimas y loci ensayados (Lewontin 1974; Nevo 1978), depende del criterio de polimorfismo establecido lo cual dificulta las comparaciones entre estudios (Hedrick 1983), y no considera las frecuencias alélicas dentro de cada locus.

2. La heterocigosis promedio esperada o la proporción estimada de loci (o genes) que se esperan heterocígonos (de acuerdo a la relación de Hardy-Weinberg) en un individuo promedio (H): Para un locus dado con i alelos la heterocigosis esperada es igual a $1 - \sum (P_i^2)$; donde P_i es la frecuencia de cada alelo. Cuando no se registra variación en todos los loci, éste índice es igual a cero; y cuando todos los loci son polimórficos, con un número infinito de alelos, con frecuencias alélicas iguales dentro de cada locus (e.g., 0.5 para un locus con dos alelos),

la H es igual a 1. La varianza muestral de este índice es sensible al tamaño muestral (Brown y Weir 1983), pero es más robusto al tipo y número de enzimas consideradas para su estimación. Al reportar este índice es importante indicar si se estimó utilizando todos los loci montados o solamente aquellos que resultaron polimórficos. Al considerar todos los loci (los monomórficos y polimórficos) se da una idea más real de la variación aloenzimática promedio de una población.

3. El número de alelos por locus (A ó n), y el número de alelos efectivos (Ap ó Ne) por locus. Un promedio de estos dos valores para todos los loci montados también es un buen estimador de la variación genética en una población. A se calcula promediando el número de alelos por locus. El número de alelos efectivos es el número de alelos igualmente frecuentes que se necesitarían en una población ideal para producir el mismo nivel de homocigosis que en la población real, y para i alelos en un locus se calcula como:

$$1 / \sum (P_i)^2;$$

donde P_i es la frecuencia del alelo i en un locus.

Este es un número de alelos por loci que pesa la frecuencia de cada alelo (Hartl y Clark 1989).

Frecuencias génicas y genotípicas: la ley de Hardy-Weinberg y el índice de fijación: Para cada isoenzima o locus las frecuencias genotípicas se calculan dividiendo el número de individuos de cada uno de los genotipos entre el total de individuos en la población. A partir de estos datos se calculan las frecuencias alélicas. Para el caso de un locus con dos alelos:

$$p = D + 1/2(H)$$

$$q = R + 1/2(H)$$

donde p y q corresponden a las frecuencias alélicas, D y R a las frecuencias de los homocígonos, y H a la de los heterocígonos.

Un primer acercamiento al estudio de las posibles fuerzas que moldean la composición genética de una población es mediante la comparación de las frecuencias génicas y genotípicas de una población natural con aquellas esperadas en el equilibrio de Hardy-Weinberg.

La ley de Hardy-Weinberg (H-W) plantea que en ausencia de la acción de fuerzas evolutivas, las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes en una relación $D = p^2$; $H = 2pq$ y $R = q^2$ para el caso de un locus con dos alelos. Para evaluar si las frecuencias alélicas y genotípicas observadas corresponden a los valores esperados por H-W aplicamos una prueba de G (ver tabla IV.1). Decidimos usar esta prueba en lugar de una chi cuadrada porque en varios casos las frecuencias observadas eran menores que uno (ver también Sokal y Rohlf 1969; pg. 550- 601). El número de grados de libertad para esta prueba fue igual al número de clases comparadas menos uno.

Para estimar el grado de endogamia se utilizó el índice de fijación de "F":

$$F = 1 - \frac{\text{Heterocigosis Observada}}{\text{Heterocigosis Esperada}}$$

$$F = \frac{\text{Proporción de Het. obs.}}{1 - \sum_i p_i^2}$$

donde p_i es la frecuencia de los alelos i de cada locus. Para probar si el índice "F" difiere significativamente de 0 se utilizó el estadístico de χ^2 (chi cuadrada = $F^2 N(K-1)$, donde F es el índice de fijación, N es el número de individuos y K es el número de alelos; con $(k(k-1)/2)$ grados de libertad tomado de Li y Horvitz 1953).

En todos los análisis, con excepción del cálculo de la probabilidad de exclusión, que se explica a continuación, se consideraron las frecuencias genotípicas y alélicas de los machos y de las hembras juntas.

Probabilidad de exclusión génica: Para evaluar la utilidad de un sistema de loci polimórficos en la asignación de paternidad es necesario estimar la probabilidad de exclusión génica para individuos de una población particular. Para el caso en que se desea asignar paternidad a progenie de madres conocidas pero padres desconocidos, la probabilidad de exclusión es la probabilidad de excluir a todos los machos de una población menos al macho padre. Para el caso en que se desea asignar a la pareja de padres (madre y padre) la progenie, la probabilidad de exclusión es la probabilidad de excluir a todas las parejas menos a la pareja paternal (Chakraborty,

Meagher et al. 1988). Estas probabilidades se estiman con base en la distribución de frecuencias genotípicas, y el número de loci polimórficos disponibles para la población de interés. La probabilidad de exclusión esperada cuando se conoce el genotipo materno y las frecuencias alélicas en los dos sexos ha sido derivada por (Chakraborty, Meagher et al. 1988). Nosotros utilizamos esta fórmula para evaluar la probabilidad de exclusión de cada uno de los loci polimórficos montados $\{E\{P(E)\}_L$ y de todos ellos combinados $\{P(E)_C$.

$$E\{P(E)\}_L = \frac{\sum_i P_i(1-P_i)^2 (1-Q_i+Q_i^2) + \sum_i \sum_j Q_i Q_j (P_i+P_j)(1-P_i-P_j)^2}{1 - \prod_i (1-P(E)_i)}$$

$$P(E)_C = 1 - \prod_i (1-P(E)_i)$$

La derivación de estas fórmulas se explica en el Apéndice 3. Esta derivación se basa en dos supuestos: apareamientos al azar entre machos y hembras, y distribución independiente de los loci. Dado que, para cada pareja madre-progenie, la probabilidad de que solamente uno de los machos quede no excluido (paternidad no ambigua) va a depender del número total de machos considerados, ésta será mayor cuanto menor sea el número de machos:

$$P_i = (P(E)_i)^{n+1}$$

donde P_i es la probabilidad de que solo un macho no sea excluido como posible padre; $P(E)_i$ es la probabilidad de exclusión para la i ésima pareja madre-hijo; y n es el número total de machos considerados.

Sitio de estudio y colecta de material

Se estudió una población establecida en un área de 8.96 ha de selva madura en la Estación de Biología Tropical de Los Tuxtlas, Veracruz (México). La estación está dominada por vegetación de Selva Alta Perennifolia (Miranda y Hernández-Xolocotzi 1963) y en ella predomina un clima cálido húmedo con una temperatura media anual de 24°C y una precipitación anual superior a los 4000 mm (para más detalles sobre las condiciones del sitio ver (Lot-Helgueras 1976). En la figura IV.1 se muestra la localización del sitio de estudio. Las muestras foliares para los análisis electroforéticos se colectaron de todos los individuos maduros establecidos en el sitio de 5 Ha. y en una franja de 30 m de ancho alrededor del sitio. De tal manera que se muestreó un

Tabla IV.1 Frecuencias alélicas y genotípicas observadas para las hembras (H) total (T) y machos (M) de *Cecropia obtusifolia*

		ALELOS						GENOTIPOS						Estadístico	Nivel de significación
		1	2	3	11	22	33	12	13	23	G	P			
ENZIMA	SEXO	Observado Esperado													
LAP	H	6(.0588)	7(.0686)	89(.8726)	0(0)	0(0)	38(.7451)	0(0)	7(.1372)	6(.1176)	N=96				
	M	3(.0333)	6(.0666)	81(.9001)	0(0)	0(0)	36(.8)	0(0)	6(.1333)	3(.0666)					
	T	9(.0469)	13(.0677)	170(.8854)	0(0)	0(0)	74(.7708)	0(0)	13(.1354)	9(.0938)					2.9283
FE1	H	0(0)	99(.9705)	3(.0295)	0(0)	48(.9412)	0(0)	0(0)	0(0)	3(.0588)	N=95				
	M	3(.034)	84(.9545)	1(.0114)	0(0)	40(.909)	0(0)	3(.0681)	0(0)	1(.0228)					
	T	3(.0158)	183(.9632)	4(.0211)	0(0)	88(.9263)	0(0)	3(.0316)	0(0)	4(.0421)					0.3287
FE2	H	1(.0098)	17(.1667)	84(.8235)	0(0)	0(0)	34(.6667)	1(.0196)	0(0)	16(.3137)	N=95				
	M	3(.034)	13(.1477)	72(.8182)	0(0)	1(.0227)	31(.7045)	2(.454)	1(.0227)	9(.2045)					
	T	4(.0211)	30(.1597)	156(.8211)	0(0)	1(.0105)	65(.6842)	3(.0316)	1(.0105)	25(.2632)					1.7364
ACP	H	41(.4019)	44(.4313)	17(.1667)	16(.3137)	18(.3529)	4(.0784)	4(.0784)	5(.098)	4(.0784)	N=95				
	M	47(.534)	22(.25)	19(.2159)	21(.4777)	6(.1363)	3(.0681)	1(.0228)	4(.0909)	9(.2045)					
	T	88(.4632)	66(.3474)	36(.1895)	37(.3895)	24(.2526)	7(.0737)	5(.0526)	9(.0947)	13(.1368)					61.5184

Tabla IV.1 Continuación

		ALELOS		GENOTIPOS			Estadístico	Nivel de significancia
		1	2	11	12	22		
ENZIMA	SEXO	Observado Esperado	Observado Esperado	Observado Esperado	Observado Esperado	Observado Esperado	G	P
GOT 1	H	27(.2872)	67(.7128)	3(.0638)	21(.4468)	23(.4894)	N=87	
	M	31(.3875)	49(.6125)	6(.15)	19(.475)	15(.375)		
	T	58(.3333)	116(.6667)	9(.1034)	40(.4598)	38(.4268)	.1237	NS
GOT 2	H	87(.8529)	15(.147)	36(.7059)	15(.2941)	0(0)	N=96	
	M	78(.8667)	12(.1333)	33(.7334)	12(.2666)	0(0)		
	T	165(.8594)	27(.1406)	69(.7188)	27(.2813)	0(0)	4.4374	NS
PGM 1	H	5(.0595)	79(.9404)	2(.0476)	1(.0238)	39(.9285)	N=78	
	M	5(.0694)	67(.9305)	2(0.0555)	1(.0277)	33(.9166)		
	T	10(.0641)	146(.9359)	4(.0513)	2(.0256)	72(.9231)	21.6304	P<.001
PGM 2	H	88(.9777)	2(.0223)	44(.9777)	0(0)	1(0.0222)	N=78	
	M	70(.1)	0(0)	35(.1)	0(0)	0(0)		
	T	158(.9875)	2(.0125)	79(.9875)	0(0)	1(.0125)	10.7515	.006>P>.001
PGM 3	H	26(.26)	74(.74)	4(0.08)	18(0.36)	28(0.56)	N=94	
	M	13(.1477)	75(.8522)	3(.0681)	7(.1590)	34(.7727)		
	T	39(.2074)	149(.7926)	7(.0745)	25(.266)	62(.6469)	2.7684	NS

área total de 8.96 Ha. Se colectó la segunada a quinta hoja de 54 árboles hembra y 45 macho establecidos en éste sitio.

Determinación de los genotipos

Para cada individuo se determinó el genotipo para los 9 loci polimórficos enzimáticos mostrados en el capítulo anterior mediante la técnica de electroforesis. El tratamiento de las muestras antes de la electroforesis y la técnica se describen en el apéndice 1. Las lecturas de los geles se hicieron con base en las interpretaciones genéticas discutidas en el capítulo anterior y cada individuo se corrió un promedio de 4 veces para confirmar su genotipo.

RESULTADOS

Se encontró una variación genética relativamente baja para la población de Cecropia obtusifolia estudiada. El índice de loci polimórficos (P) fue igual a 0.2708, considerando a un locus polimórfico cuando el alelo más común tiene una frecuencia menor a 99%. La heterocigosis promedio esperada (H) fue igual a 0.0538 y la heterocigosis promedio observada (H) fue igual a 0.0437. El número promedio de alelos por locus fue igual a 2.4444 y 1.2954 considerando a los loci polimórficos y a todos los loci respectivamente. El número de alelos efectivos fue igual a 1.47 y 1.088 considerando a los loci polimórficos y a todos los loci respectivamente.

Las frecuencias alélicas de 3 (FE1, PGM1, PGM2) de los 9 loci polimórficos son muy extremas (Tabla IV.1). En esta misma tabla se reportan los valores de G que resultaron de comparar las distribuciones de frecuencias genotípicas observadas con las esperadas por H-W. Únicamente se encontraron diferencias significativas para PGM1, PGM2 y AcPH2. El resto de las enzimas están en equilibrio Hardy-Weinberg.

En la tabla IV.2 se reportan los índices de fijación "F" para cada uno de los 9 loci polimórficos. En 5 de los 9 casos la "F" fue negativa (LAP, GOT1 y GOT2, Fe1 y 2), en uno fue positiva (PGM3), pero únicamente para PGM1 y PGM2, y AcPH2 las "Fs" fueron positivas y estadísticamente diferentes de cero. Estos resultados corroboran lo encontrado en la tabla IV.1; todas las enzimas están en H-W menos AcPH2 y PGM1 y 2. No hay evidencia de endogamia con base en la mayoría de las "Fs" estimadas.

En la tabla IV.3 se reportan las probabilidades de exclusión genética para cada uno de los loci polimórficos y la probabilidad de exclusión combinada. En general las probabilidades de exclusión son bajas (<0.5). La mayor de éstas corresponde a la AcPH2 y la menor a PGM2 para la cual todos los machos presentaron el mismo genotipo. A pesar de que aún hay problemas de lectura de la AcPH2 para los genotipos 11, 12 y 22, no creemos que la probabilidad de exclusión de esta isoenzima disminuya demasiado al corregir las lecturas ya que el mayor problema está en la subestimación de los genotipos 12. Se puede ver en la tabla IV.3 que la probabilidad de exclusión combinada aumenta lentamente conforme se añaden más loci; esto indica que se gana bastante capacidad de exclusión de paternidad al considerar todos los loci menos PGM2, aunque como muestran los límites de confianza el comportamiento promedio está sujeto a una gran incertidumbre.

DISCUSION

La variación encontrada para la población de Cecropia obtusifolia que se estudio es baja en relación a la que se ha reportado para otras especies vegetales. Ya que, a pesar de que el índice de loci polimórficos está cerca de los valores reportados para muchas plantas, la heterocigosis esperada promedio es menor que la de la mayor parte de las especies vegetales hasta ahora analizadas (Hart y Clark 1989). En comparación con otras especies de árboles tropicales (Fig. IV.2; Eguiarte 1990; Hamrick y Loveless 1986b), Cecropia obtusifolia presenta un porcentaje de loci polimórficos y un número de alelos por loci polimórfico intermedio, pero una heterocigosis y un número de alelos por loci relativamente bajos. En comparación con los valores promedio de las especies de árboles del dosel superior de selvas tropicales húmedas, Cecropia obtusifolia tiene un índice de loci polimórfico ligeramente mayor, pero una heterocigosis 50% menor al promedio reportado para este tipo de especies (Eguiarte 1990; Hamrick y Loveless 1986b). El número de alelos por locus polimórfico en nuestra especie es similar al encontrado para otros árboles del dosel, pero el número de alelos por locus (considerando todos los loci montados) es menor (1.2954 en comparación a 1.38). Es importante, puntualizar, sin embargo, que la mayoría de los muestreos realizados para recabar los datos de la Fig. IV.3 se hicieron en extensiones mayores a las consideradas en este estudio y

Tabla IV.2. Índices de fijación F para una población de *Cecropia obtusifolia* establecida en 5 ha de la selva de Los Tuxtlas (Veracruz).

LOCUS	H ₀	H _E	N	F	chi ²	P
LAP	0.2291	0.2091	96	-0.0956	1.7547	>0.05
GOT1	0.4597	0.4445	87	-0.0342	0.1017	>0.05
GOT2	0.2813	0.2416	96	-0.1643	2.5914	>0.05
FE1	0.0736	0.0715	95	-0.0294	0.1631	>0.05
FE2	0.3052	0.3002	95	-0.0167	0.0523	>0.05
PGM1	0.0256	0.1199	78	0.7865	48.2370	<0.05
PGM2	0.0000	0.0246	80	1.0000	80.0000	<0.05
PGM3	0.2659	0.3287	94	0.1911	3.4292	>0.05
ACPH	0.2842	0.6288	95	0.5480	7.0570	<0.05
PROMED.	0.2138	0.2632	91	0.2428		

Se reporta: H₀-porcentaje de heterócigos observados por locus; H_E-porcentaje de heterócigos esperados en H-W por locus; N-número de individuos corridos para cada locus; F-el índice de fijación (ver métodos este capítulo); chi²-estadístico de chi cuadrada calculado como $F^2N(K-1)$, donde F es el índice de fijación, N el número de individuos y K el número de alelos. El número de grados de libertad fue igual a $(K(K-1))/2$. P-probabilidad de error de la chi².

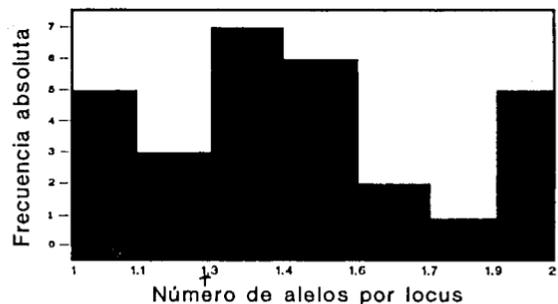
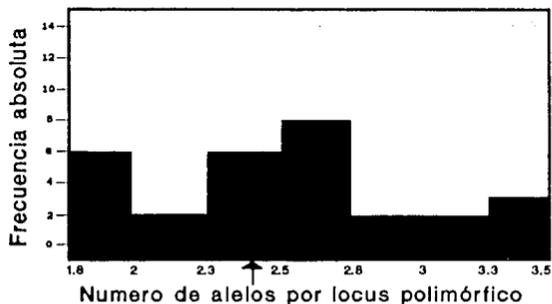
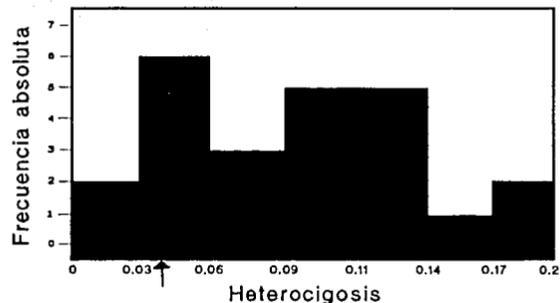
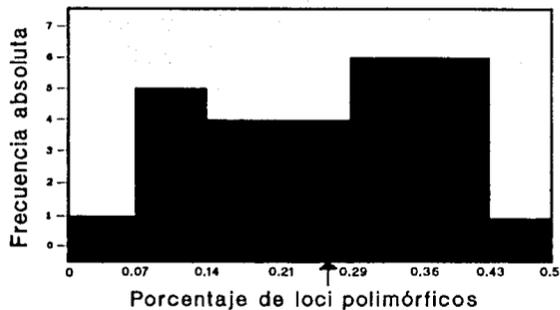


Figura IV.2. Parámetros de variación genética para una población de *Cecropia obtusifolia* en 5 Ha de la selva de Los Tuxtlas, Veracruz y su relación con los estimados para árboles tropicales a partir de datos isoenzimáticos (datos de otras especies de Hamrick & Loveless, 1986). Los valores para *C. obtusifolia* se indican con una flecha

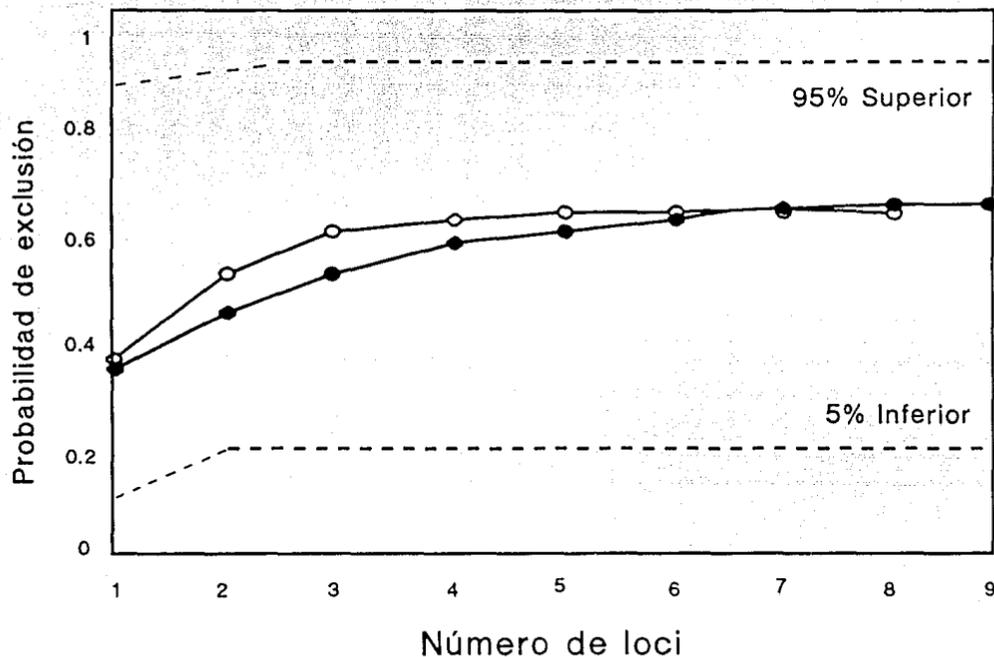


Tabla IV.3. Probabilidades de exclusión combinadas como función del número de loci para *Chamaelirium luteum* ○ (de Chakraborty, Meagher & Smouse, 1988) y para *C. obtusifolia* ● (este estudio). Se muestran los límites de confianza al 90% (tomados de los datos de *C. luteum*) para la distribución de las probabilidades de exclusión de las diferentes parejas madre-hijo.

seguramente abarcaron más de una población (Hamrick y Loveless 1986b).

En comparación a especies arbóreas templadas, *Cecropia obtusifolia* presenta un nivel de variación genética menor. Esto corrobora resultados anteriores (Eguarte 1990; Hamrick y Loveless 1986b).

Los resultados de los índices de fijación "F" sugieren que no hay endogamia en la población muestreada y que ésta se encuentra en equilibrio de H-W para los loci polimórficos montados. Estos resultados son explicables con base en la biología reproductiva de la especie, por ser dioica, y en la dispersión de sus semillas, que son transportadas a grandes distancias por aves y mamíferos (Alvarez-Buylla y Martínez-Ramos 1990). Las "F" positivas y desviaciones significativas de las frecuencias genotípicas observadas con respecto a las esperadas por H-W en AcPh2 y PGM1 y 2 se atribuyen a los posibles errores de lectura que aún existen en estos loci, más que a fuerzas selectivas actuando sobre los mismos. Este resultado apunta a que las diferencias encontradas para los estadísticos de la composición genética de una población, obtenidos para diferentes loci, pueden deberse a errores de lectura y/o a problemas con la interpretación de los geles. La corrección de este tipo de errores podría aumentar la confiabilidad de los estimadores y la comparatividad de los mismos. Para el presente trabajo se pretende corregir la lectura de las enzimas mencionadas arriba con base en la estrategia descrita en el capítulo anterior.

De acuerdo a las predicciones hechas por (Hamrick, Linhart et al. 1979; Loveless y Hamrick 1984), las características de historia de vida de *Cecropia obtusifolia* debieran determinar altos niveles de variación genética para poblaciones establecidas en condiciones naturales (Tabla IV.4). Las características de historia de vida que se relacionan con altos niveles de variabilidad genética para esta especie son: 1) el tener fecundación cruzada, 2) el ser una especie dioica, 3) el ser polinizada por viento, y 4) el tener un ciclo de vida largo (Tabla IV.4). Sin embargo, esta especie también tiene algunas características de historia de vida que han sido relacionadas con bajos niveles de variación genética, como: 1) el ser una especie colonizadora de habitats perturbados, 2) el tener tamaños poblacionales reducidos en condiciones naturales y 3) el presentar rangos de distribución geográfica relativamente restringidos (Tabla IV.4).

Probablemente estas últimas características han jugado un papel importante en determinar, por ejemplo, una baja variabilidad genética en cuanto al porcentaje de loci polimórficos, número promedio de alelos, y sobretodo, heterocigosis en poblaciones naturales de *Cecropia obtusifolia*.

Algunos de los factores que probablemente han favorecido una variación genética relativamente baja en condiciones naturales, no prevalecen en sitios perturbados por el hombre por largos periodos de tiempo. Por ejemplo, en estos últimos la densidad poblacional es alta y los sitios de establecimiento de perturbación permanente no tienen un carácter efímero. La comparación de la variabilidad genética encontrada en poblaciones naturales y perturbadas nos brindará información útil para explorar el posible efecto que han jugado este tipo de factores ecológicos en determinar la variación poblacional de *Cecropia obtusifolia*. Las diferencias en la variación genética entre estos dos tipos de poblaciones dependerá también, del nivel de flujo génico que exista entre ellas. Esto se podrá documentar con la estimación de los índices de Wright (Hartl y Clark 1989) que podrán ser calculados con las enzimas polimórficas que ya se han montado para esta especie.

El sistema de loci polimórficos montado será útil para estudiar, entonces, la variación genética dentro y entre poblaciones de *Cecropia obtusifolia*, y también para analizar si los apareamientos son al azar o entre individuos genética o geográficamente más cercanos. Para ambos tipos de análisis se podrán obtener estimaciones robustas con base en los 9 loci montados.

Además, los loci montados serán utilizados para obtener aproximaciones de los patrones de movimiento de polen con base en análisis de paternidad de semillas de madres con genotipo conocido. La batería de loci polimórficos que se ha montado en este estudio presenta probabilidades de exclusión esperadas combinadas similares al sistema de loci montado por (Meagher 1986) para *Chamaelirium luteum* (Meagher 1986; Fig. IV.3). En el caso de *Cecropia obtusifolia*, sin embargo, la probabilidad de exclusión aumenta paulatinamente al ir incluyendo más loci, mientras que en *C. luteum* la probabilidad de exclusión se estabiliza prácticamente después de los primeros tres loci. Esto se debe a que las probabilidades de exclusión de los loci montados para esta última son más diferentes entre sí que las de los loci montados para *C. obtusifolia*.

Tabla IV.4. Características de historia de vida de *Cecropia obtusifolia* y variación genética esperada de acuerdo a las mismas (fuentes: Pennington & Sarukhán, 1968; Alvarez-Buylla & Martínez-Ramos, 1990).

CARACT. HIST VIDA VARIACION ESPERADA

FECUNDACION CRUZADA	ALTA
DIOICA	ALTA
POLINIZACION POR VIENTO	ALTA
LONGEVIDAD LARGA	ALTA
REPRODUCCION SEXUAL	POTENCIALMENTE ALTA
DISPERSION POR ANIMALES	INTERMEDIA
PIONERA, COLONIZADORA	BAJA
RANGO GEOGRAF ESTRECHO	BAJA
TAMAÑO POBLACION REDUCIDO	BAJA
PRODUCCION CTE. SEMILLAS	SIN PREDICCION
POLICARPICA	SIN PREDICCION
BAJA DENSIDAD	SIN PREDICCION
DISTRIBUCION EN PARCHES	SIN PREDICCION

Estos resultados indican que para *Cecropia* valdría la pena considerar a todos los loci, menos a PGM2, en un análisis de paternidad hecho a la escala de nuestro utilizado en este estudio.

Las estimaciones esperadas de las probabilidades de exclusión se basan en las suposiciones de apareamiento al azar y distribución aleatoria o independiente de los loci (Chakraborty, Meagher et al. 1988). Para probar estas suposiciones se pretende tomar una muestra de parejas madre-hijo, estimar sus probabilidades de exclusión, obtener la distribución de frecuencias de las probabilidades de exclusión y comparar esta última con la distribución esperada (ver Apéndice 3). La diferencia entre estas dos distribuciones se puede deber a que no se cumple alguna de las dos suposiciones mencionadas anteriormente (apareamiento al azar y distribución alélica independiente). El relajamiento de estas suposiciones puede aumentar la información proporcionada por un mismo grupo de loci. Devlin y Ellstrand (1990) han analizado el efecto de ligamiento entre los loci. Para el caso de *C. obtusifolia* se pretende incluir información de ligamiento entre loci y de los padres posibles a diferentes distancias de la madre en cuestión para estimar curvas de movimiento de polen.

Además de usar el método de exclusión genética con la batería de loci montados, se utilizarán éstos para hacer un análisis de paternidad por inferencia estadística con base en un método de máxima verosimilitud (Meagher 1986). Este método se utilizará para asignar los padres más probables a semillas de madre conocida, y parejas de padres más probables a semillas de la lluvia y plántulas establecidas en el campo. Estos análisis proporcionarán datos adicionales acerca del movimiento de semillas, que podrán ser comparados con datos obtenidos de estudios anteriores (Alvarez-Buylla y Martínez-Ramos 1990). Estos análisis también serán útiles para explorar patrones de establecimiento y sobrevivencia diferencial de plántulas con diferentes genotipos en diferentes ambientes (e.g., claros de distinto tamaño).

CONCLUSIONES y PERSPECTIVAS

1) *Cecropia obtusifolia* es una especie con altos contenidos de fenoles que interfieren en la expresión proteica de macerados totales de tejido foliar. El efecto de los fenoles, y probablemente de otros compuestos secundarios, se evitó con un buffer de extracción que combina compuestos quí-

micos con 6 funciones diferentes para la inhibición de la actividad fenólica. Dicho buffer fue modificado a partir del propuesto por Mitton (Mitton, Linhart et al. 1979) y permitió la expresión de 26 enzimas y el montaje de 48 loci isoenzimáticos.

2) Los métodos de extracción enzimática utilizados en los estudios de genética de poblaciones pueden afectar la medición de las tres variables básicas de la variación genética poblacional: el número de loci detectables, el número de loci que aparecen como polimórficos y el número de alelos por loci. La experimentación previa con diferentes buffers de extracción al iniciar un estudio de genética de poblaciones puede desenmascarar posibles problemas y sesgos en la estimación de variación genética.

3) El estadio del ciclo de vida y el grado de desarrollo foliar afectan la expresión enzimática. Para el caso de *Cecropia obtusifolia* las plántulas y juveniles colectados del campo presentan mayores problemas de extracción enzimática, probablemente debidos a mayores concentraciones o variedad de fenoles, que los adultos y plántulas crecidas en el laboratorio.

4) Los análisis preliminares de herencia mendeliana de los loci polimórficos montados sugieren que la mayoría tienen segregación alélica independiente y se distribuyen al azar. Las desviaciones de este comportamiento, encontradas principalmente para ACPH2, y PGM1 y PGM2, se asocian a posibles errores de lectura en estos loci, más que a herencia no mendeliana. Las desviaciones en los arreglos genotípicos encontrados para otros loci se atribuyen a herencia no mendeliana o apareamientos no aleatorios. La evaluación de estas dos hipótesis puede lograrse con base en análisis de arreglos genotípicos de progenie de cruces controladas.

5) La proporción de enzimas polimórficas de *Cecropia obtusifolia* está significativamente asociada a la función de las mismas y a la ruta metabólica en la que participan.

6) La heterocigosis promedio y el número de alelos por locus estimados para *Cecropia obtusifolia* son bajos en relación a los reportados para otras plantas. Pero el índice de loci polimórficos y el número de alelos por locus polimórfico estimados para esta especie son muy similares a los valores medios del resto de las especies vegetales estudiadas.

7) Los resultados de los índices de fijación "F" y de las frecuencias alélicas y genotípicas sugieren que en la población de Cecropia obtusifolia estudiada no hay endogamia y sus frecuencias genotípicas se encuentran cerca de lo esperado por la ley de equilibrio de H-W. La inexistencia de endogamia se puede explicar con base en la biología reproductiva de la especie (i.e., dioica) y en su dispersión zoócora a grandes distancias.

8) Con la batería de loci polimórficos montados se podrán obtener estimaciones robustas de: 1) la estructura genética de las poblaciones de Cecropia obtusifolia (i.e., partición de la variación genética a nivel isoenzimático dentro y entre poblaciones), 2) el sistema reproductivo y la asociación entre la probabilidad de apareamiento y la distancia genética y geográfica de los individuos, 3) el movimiento de polen y semillas mediante un análisis de paternidad.

Apéndice 1

TECNICA DE ELECTROFORESIS

La electroforesis es el movimiento de enzimas en un gel (sustrato) bajo la influencia de la corriente eléctrica. Una enzima puede presentar formas moleculares alternativas en el mismo locus (aloenzimas) y en diferentes loci (isoenzimas).

El fundamento en la utilización de la electroforesis consiste en asumir que las aloenzimas (producto de cambios en la secuencia de aminoácidos) de una proteína reflejan cambios a nivel de ADN y en equiparar estas variantes móviles con alelos de un locus génico, y sus frecuencias de electromorfos con frecuencias alélicas (Hedrick 1983). La técnica electroforética separa a las isoenzimas por carga, forma y tamaño.

Una vez que se separan las enzimas por electroforesis se tiñen los geles mediante métodos histoquímicos que hacen al producto de la reacción enzimática visible. Las técnicas de tinción más usadas identifican la transferencia del ión hidrógeno del sustrato a NAD o NADP (que pasan a ser NADH o NADPH). Estas reacciones son llamadas deshidrogenasas. El PMS es usado para transferir el ión H² de NAD o NADP a alguna sal como MTT o NBT que se reduce dando lugar a formazan insoluble que aparece en color en el gel, en el sitio donde la reacción tuvo lugar.

Las proteínas presentan una estructura primaria que esta determinada, directamente, por la secuencia de aminoácidos en el correspondiente gen estructural. Hay 16 aminoácidos que se encuentran en las secuencias proteínicas, 3 de término y 1 de inicio. La secuencia de aminoácidos determina el tamaño y la carga de la cadena polipeptídica, así como si esta es hidrofóbica o hidrofílica. Estas características influyen, a su vez, la forma de la proteína pues esta se dobla dependiendo de las atracciones o repulsiones de sus aminoácidos. Esta forma constituye la estructura secundaria y terciaria de las cadenas que se cohesionan por enlaces débiles formados por puentes de hidrógeno o por enlaces fuertes de azufre que se establecen entre las cisteínas.

Algunas proteínas están formadas por más de una cadena polipeptídica. La interacción entre éstas

cadena constituye la estructura cuaternaria de las enzimas. Existen proteínas monoméricas formadas por una sola cadena polipeptídica, diméricas formadas por dos, tetraméricas formadas por cuatro, etc. Durante la lectura e interpretación genética de los geles es imprescindible tomar en cuenta la estructura cuaternaria de las enzimas. Por ejemplo, en organismos diploides los individuos heterocigotos presentan dos bandas para el caso de enzimas monoméricas y tres para diméricas. En este último caso un individuo con alelos distintos en cada cromosoma puede tener enzimas homodimérica de uno u otro tipo (con las dos bandas extremas) y enzimas heterodiméricas que generalmente corren a distancias intermedias entre las bandas de los homodímeros.

A continuación se detalla la técnica utilizada en el tratamiento de las muestras después de la colecta, su almacenamiento, el método de extracción de proteínas que se utiliza, y los procedimientos de corrimiento, tinción, lectura y almacenamiento de los geles para llevar a cabo electroforesis de enzimas a partir de tejido foliar de *Cecropia obtusifolia*. La secuencia metodológica se enlistan a continuación:

- 1) Colecta de muestras foliares del campo.
- 2) Almacenamiento temporal de muestras foliares en un tanque de Nitrógeno líquido a -196°C, como máximo 1/2 hora después de que se colectaban las muestras.
- 3) Almacenamiento permanente en un ultracongelador (REVCO) a 70°C.
- 4) Extracción de proteínas mediante el macerado de las muestras con un buffer específico (ver capítulo 1) y absorción en wicks.
- 5) Almacenamiento a largo plazo de los extractos de tejido foliar absorbidos en papel filtro y guardados en tubos eppendorf en el ultracongelador a -70°C.
- 6) Montaje de las muestras en el gel.
- 7) Electroforesis. Corrimiento del gel bajo un amperaje/voltaje específicos y una combinación de buffer de charola y gel adecuada.
- 8) Retiro del gel de la corriente eléctrica y corte en rebanadas de 2 mm de grosor.

9) Tinción con base en protocolos específicos para cada enzima.

10) Lectura. Se hace la lectura de los patrones de bandeo en los geles en fresco ya que es el momento de resolución óptima para algunas enzimas.

11) Fijación de geles en alcohol al 50%

12) Segunda lectura de los patrones de bandeo con geles fijados.

A continuación se describen con detalle cada uno de los pasos anteriores.

Se colectó la segunda a cuarta hoja ms nueva de cada uno de los árboles adultos, secortaron en fragmentos de aproximadamente 10x5 cm, se envolvieron en polietileno, se etiquetaron y se les puso una liga y un ganchillo para introducirlos en el tanque de Nitrógeno líquido (Fig. Ap1.1). Una vez en el laboratorio, las muestras se colocaron en un ultracongelador (REVCO de -70°C) para su posterior utilización. Se ha reportado (Kephart 1990) que las muestras guardadas por largos periodos de tiempo en un ultracongelador, presentan diferentes grados de viabilidad. Generalmente, en los tejidos con altos contenidos de compuestos secundarios las enzimas se degradan rápidamente aún a temperaturas de -50 grados centígrados. Por eso se decidió congelar instantáneamente con nitrógeno líquido y mantener las muestras a 70 grados. En el caso de *Cecropia obtusifolia* se ha observado que las muestras de hojas guardadas por más de 9 meses mantienen grados aceptables de expresión. Sin embargo, la intensidad de las bandas isoenzimáticas ha disminuido paulatinamente con el tiempo.

Los tejidos fueron homogeneizados (usando 2x2 cm, de material foliar con 15 gotas del buffer de extracción) en un buffer de extracción de Mit.mod (ver tabla II.4), absorbidos en papel para cromatografía Whatman (3 X 10mm) (3mm Chr. Cat. No. 3030614) y colocados en geles de almidón al 12%. Inicialmente se utilizaba papel para cromatografía Whatman No.17 que es un poco más grueso que el que se utiliza actualmente. Sin embargo, se observó que la resolución para muchas enzimas (por ejemplo AcPH2, como se puede ver en las fotografías Apend.1.2 que ejemplifican el uso de un papel absorbente con respecto al otro) se incrementa notablemente al cambiar de papel absorbente.

Como se mencionó anteriormente se requiere de un buffer de gel (que se usa para prepararlo) y un buffer de charola (que es una solución ionizada que conduce la corriente eléctrica a través del gel) para llevar a cabo una corrida electroforética. La corriente eléctrica produce un corrimiento diferencial de las proteínas, de acuerdo a sus cargas debido a la presencia de grupos amino y de grupos carboxilo. La carga neta de la proteína, y como resultado de esto, su migración en el gel, depende del pH, compuestos químicos y la concentración de estos en el sistema de buffer. Cuando las proteínas migran hasta su punto isoeléctrico (donde ya no hay carga) ya no se registra más movimiento.

Ya que las enzimas se ionizan a varios pH's, usualmente hay que ensayar con 2 a 4 diferentes sistemas de buffer hasta poder lograr una buena expresión enzimática. En este trabajo se montaron las enzimas poliméricas en 5 sistemas de buffer diferentes cuyos pH's van desde 6.1 hasta 8.3 y con 2 niveles de amperajes:

Tabla Apend.1. Amperaje y pH de los sistemas de buffer utilizados.

SISTEMA	CORRIENTE (mA)	pHCharola	pHGel
7	65	8.3	8.3
8-	55	8.0	7.6
Histidina	55	7.0	7.0
Morfolin	55	6.1	6.1
Hc 7.6	55	7.6	7.6

En cuanto detalles del corrimiento es importante mantener un nivel de voltaje debajo de los 250-300 V (dependiendo del grueso del gel) para evitar la desnaturalización de las enzimas por exceso de calor. Una de las estrategias que se utilizaron en este trabajo para evitar el aumento del voltaje, fue el de remojar las toallas que conducen la corriente eléctrica, cada dos horas aproximadamente, en el buffer de charola. El voltaje que se utiliza en los diferentes sistemas de buffer va a depender del tamaño y grueso del gel, de la concentración y composición química del sistema de buffer que se utilice y del grueso del wick. Los voltajes anteriores se establecieron con base en experiencias de otros laboratorios y en pruebas empíricas hechas específicamente para este trabajo.

Como se puede observar en la tabla (Apend.1.1) hay algunos sistemas de buffer que presentan el mismo pH para el buffer de gel y el de charola. Este tipo de sistemas de buffer se denominan continuos en contraposición a aquellos discontinuos en donde el pH del gel y de la charola son diferentes (e.g sistema 8-). Una de las consecuencias de usar un sistema de buffer discontinuo es que las bandas de los loci se adelgazan y permiten, en algunos casos, una mejor resolución de las isoenzimas.

Las enzimas montadas en cada uno de los sistemas de buffer utilizados, se enlistan a continuación:

SISTEMA DE BUFFER	ENZIMAS
A (Morfolin)	ACO, AcPH, FUM, PGAL, IDH, 6PGDH
B (HC 7.6)	AK, SOD
C (Sistema 7)	CE, PGAL, G6PDH, GDH, GOT, LAP, NADHDH, MNR, PGI, Rubisco, TPI
D (Sistema 8-)	FE
E (Histidina)	G2DH, GPT, MDH, PGM, SDH
F (HC 7.0)	HK

Las recetas utilizadas para preparar los sistema de buffer son las siguientes (todas las recetas están calculadas para 1 litro excepto cuando indican lo contrario):

SIST. BUFFER DE GEL	BUFFER DE CHAROLA
A	Buffer de charola - 25ml Ac cítrico-8.4g Agua destilada - 475ml Ajustar ambos a pH 6.1 con N - 3- (3-aminopropilmorfolin)

B	DL-Histidina - 0.958g Ajustar ambos a pH 7.6 con NaOH	Tris - 15.1g Ac. cítrico-8.3g
C	Tris - 5.45g Acido cítrico - 1.3g Aforar a 900 ml y ajustar a pH 8.3 con NaOH. Agregarle 100 ml de buffer de charola.	LiOH-1.6g Ac.bórico - 11.6g Ajustar pH 8.3 con comp. secos
D	Parte A - 76.8ml Parte B - 326.4ml Aforar a 1000 ml Ajustar a pH 7.6 con HCl diluido.	Parte A - 1 lt Agua dest. - 466ml
	Parte A: LiOH - 2.4g Ac.bórico - 23.4g Ajustar a pH 8.0 con LiOH	Parte B: Tris - 12.36g Ac cítrico-3.36g
E	DL-Histidina - 1.05g Ajustar ambos a pH 7.0 con NaOH.	Tris - 16.35g Ac cítrico-9.04g
F	DL-Histidina - 0.958g Ajustar ambos a pH 7.0 con NaOH.	Tris - 15.1g Ac cítrico - 8.3g

Para poder determinar a que distancia del cátodo va el frente de corrimiento se coloca, en las orillas de de los geles, dos wicks con extracto de amaranto. La mayoría de los geles se corren hasta que el frente ha recorrido aproximadamente 10 cm. En La FE se logró una mejor separación de los tres loci a los 8 cm. Los wicks con las muestras de cada individuo se colocan, después del wick de amaranto, a una distancia de 2-3 mm entre cada uno. El gel se retira de la corriente eléctrica y se corta en rebanadas de 2 mm. Cada rebanada se tiñe de acuerdo a un protocolo específico para cada enzima.

La nomenclatura de los loci, al igual que la de los alelos, se estableció en función de la migración de estos. Aquellos loci (o alelos) que estuvieran más cerca del cátodo se les dió el número 1, los que seguían el número 2 y así sucesivamente conforme se acercan al ánodo.

GDH		
Tris-HCl pH 8.0 0.2M	50 ml	75 ml
L-ácido glutámico	0.4 g	0.6 g
NAD 1%	1 ml	1.5 ml
NBT 1%	1 ml	1.5 ml
PMS 1%	1 ml	1.5 ml

GOT		
Tris-HCl pH 7.0 0.2M	50 ml	75 ml
Sustrato GOT	5 ml	7.5 ml
Piridoxal 5P	0.002 g	0.003g
Fast Blue BB sal	0.15 g	0.225 g

Sustrato GOT:		
L-acido aspártico	4 g	
acido ketoglutárico	2 g	
Agua destilada	100 ml	
Ajustar a pH 7.0 con NaOH		

GPT		
Tris HCl pH 8.0 0.2M	20 ml	
L-alanina	0.1 g	
acido ketoglutárico	0.4 g	
Lactato deshidrogenasa	0.006 g	
NADH	0.06 g	

HK		
Tris-HCl pH 8.0 0.2M	50 ml	75 ml
MgCl 2 1M	4 ml	6 ml
Glucosa 6P deshidrogenasa	2 ml	3 ml
DPN 1%	2 ml	3 ml
MTT 1%	1 ml	1.5 ml
PMS 1%	0.4 ml	0.6 ml
α-D-Glucosa	0.05 g	0.075 g
ATP	0.012 g	0.018 g
EDTA 4Na	0.02 g	0.03 g

IDH		
Tris-HCl pH 8.0 0.2M	50 ml	75 ml
MgCl 2 1M	2 ml	3 ml
TPN 1%	2 ml	3 ml
MTT 1%	1 ml	1.5ml
PMS 1%	0.4 ml	0.6 ml
Acido isocítrico	0.06 g	0.09 g

LAP		
Buffer tris maleato pH 5.2 0.2M	50 ml	75 ml
L-leucil amida 2.5%	1 ml	1.5 ml
Incubar 30 minutos y añadir:		
Fast black K sal	0.1 g	0.15 g
Disolverlo en agua	5 ml	7.5 ml

Buffer tris maleato pH 5.0 0.2M:		
Tris		24.2 g
Acido maleico		23.2 g
Agua		1 lt
Ajustar a pH 5.2 con NaOH o HCl		

MDH		
1M Tris HCl pH 8.0	10 ml	15 ml
Agua destilada	40 ml	60 ml
Na L-Malato pH 7.8	2 ml	3 ml
DPN 1%	2 ml	3 ml
PMS 1%	0.1 ml	0.15 ml
NBT	0.01 g	0.015 g
NaCN	0.0122 g	0.0183g

MNR		
0.05M Tris-HCl pH 7.0	50 ml	75 ml
NADH	0.05 g	0.075 g
Manadione	0.04 g	0.06 g
NBT	1 ml	1.5 ml

NADHDH		
Tris-HCl pH 8.0 0.2M	50 ml	75 ml
NADH	0.025 g	0.0375g
NBT	0.02 g	0.03 g

6PGDH		
Tris-HCl pH 8.0 1M	50 ml	75 ml
MgCl 2 1M	1 ml	1.5 ml
TPN 1%	0.5 ml	0.75 ml
MTT 1%	0.5 ml	0.75 ml
PMS 1%	0.1 ml	0.2 ml
Acido 6 fosfogluconico (Sal de bario)	0.02 g	0.03 g

PGI		
Tris-HCl pH 7.5 0.1M	50 ml	75 ml
Glucosa 6P deshidrogenasa	3 ml	4.5 ml
MgCl 10%	0.5 ml	0.75 ml
TPN 1%	1 ml	1.5 ml
MTT 1%	1 ml	1.5 ml
PMS 1%	0.3 ml	0.45 ml
D-fructuosa 6P 2Na	0.018 g	0.027 g

Las recetas de tinción de las isoenzimas montadas son:

ENZIMA	50 ml	75 ml
--------	-------	-------

ACO

Acido cis-aconítico	0.075 g	0.1125 g
Tris-HCl pH 8.0 0.1M	50 ml	75 ml
MgCl ₂	1.0 ml	1.5 ml
Isocitrato deshidrogenasa	10 ml	15 ml
TPN 1%	1.0 ml	1.5 ml
NBT 1%	2.0 ml	3.0 ml
PMS 1%	0.25 ml	0.5 ml

AcPH

AcP buffer de acetatos pH 4	80 ml	120 ml
Naphthyl phosphate acid	0.1 g	0.15 g
Fast Garnet GBC sal	0.2 g	0.3 g

AcP buffer de acetatos pH 4.0:

Acetato de sodio trihidratado	2.43 g
Acido acético glacial	4.7 ml
MgCl ₂ 1M	5 ml
Agua destilada	1 lt

AK

Tris-HCl pH 8.0 0.2 M	4.5 ml	9 ml
MgCl ₂ 10%	0.5 ml	1 ml
Glucosa 6PDH	0.625 ml	1.25 ml
PMS 1%	0.1 ml	0.2 ml
TPN 1%	0.6 ml	1.2 ml
MTT 1%	0.5ml	1 ml
Agar 1%	6ml	12 ml
ADP	0.006 g	0.12 g
Glucosa	0.225 g	0.45 g
Hexoquinasa	0.0315 g	0.063 g

CE

Buffer de Esterasa	50 ml	75 ml
Fast Garnet GBS	0.075 g	0.1 g
1% de solución de acetato de na til	0.75 ml	1 ml

Buffer de esterasa:

Fosfato de sodio monobásico	13.9 g
Fosfato de sodio dibásico	5.3 g
Agua destilada	1 lt

Solución de acetato de nafil:

Acetato de nafil	1 g
Acetona	50 ml
Agua destilada	50 ml

FE

Sustrato de FE	25 ml
Buffer de acetato de Na pH 5.0	18 ml
Agua destilada	82 ml
Acetona	500 ml
Methylumbelliferyl acetato	0.83 g

Sustrato de FE:

Acido acético glacial	5.72 ml
Agua destilada	80 ml
NaOH concentrado 4M	Aforar a 100ml

FUM

0.2M Tris-HCl pH 8.0	50 ml	75 ml
Acido fumárico 2Na sal	0.4 g	0.6 g
MDH	0.0146 g	0.0292g
DPN 1%	4 ml	6 ml
NBT 1%	1 ml	1.5 ml
PMS 1%	1 ml	1.5 ml

αGAL

0.05M Buffer de citratos-fosfatos, pH 4.0	40 ml
4-Methylumbelliferyl-α-D-galactosa (en 1 ml de N,N-dimetilformamida)	0.04 g

βGAL

0.05M Buffer de citratos-fosfatos, pH 4.0	40 ml
4-Methylumbelliferyl-β-D-galacto (en 1 ml de N,N-dimetilformamida)	0.04 g

G2DH

0.2M Tris-Hcl pH 8.0	10 ml	15 ml
Agua destilada	40 ml	60 ml
DPN 1%	2 ml	3 ml
NBT 1%	1 ml	1.5 ml
PMS 1%	1 ml	1.5 ml
DL-ácido glicérico	0.1 g	0.15 g

G6PDH

Tris-HCl pH 8.0 1M	6.25 ml	12.5 ml
Agua destilada	43.75 ml	62.5 ml
MgCl 1M	1 ml	1.5 ml
PMS 1%	1 ml	1.5 ml
MTT 1%	2 ml	3 ml
TPN 1%	2 ml	3 ml
Glucosa 6P 2Na	0.01 g	0.015 g

PGM

Tris-HCl pH 8.0 1M	5 ml	7.5 ml
Agua destilada	45 ml	67.5 ml
MgCl 2 1M	0.5 ml	1 ml
Glucosa 6P deshidrogenasa	2 ml	3 ml
TPN 1%	1 ml	1.5 ml
PMS 1%	0.2 ml	0.3 ml
MTT 1%	1.5 ml	2.25 ml
Glucosa 1P	0.075 g	0.1125 g

Rubisco

Metanol	50 ml	
Agua destilada	50 ml	
Acido acético glacial	10 ml	
Fast black K salt	0.2 g	
Teñir durante 30 min. a temperatura ambiente		

SDH

Acido	0.02 g	0.03 g
Tris-HCl pH 8.0 0.2M	50 ml	75 ml
TPN 1%	1 ml	1.5 ml
MTT 1%	1 ml	1.5 ml
PMS 1%	0.4 ml	0.6 ml

SOD

Glucosa	0.5 g	0.75 g
Tris HCl 0.2M pH 8.0	50 ml	75 ml
DPN 1%	3 ml	4.5 ml
NBT 1%	1 ml	1.5 ml
PMS 1%	1 ml	1.5 ml

TPI

PMS 1%	0.1 ml	0.2 ml
MTT 1%	0.4 ml	0.8 ml
DPN 1%	1 ml	2 ml
Gliceraldehido 3P- deshidrogenasa	75 u	150 u
Tris-HCl pH 8.0 0.1M	6 ml	12 ml
Agar 1%	6 ml	12 ml
EDTA 4Na	0.01 g	0.02 g
Acido arsénico	0.15 g	0.30 g
Dihidroxiacetona fosfato	0.0015 g	0.003 g

Una vez mezclados los componentes de las recetas para cada enzima, se incuban los geles con estas mezclas generalmente a 37 grados centígrados y en la oscuridad. De las enzimas montadas en este trabajo la ACPH y ACO se incuban en la oscuridad pero a temperatura ambiente o a 30 grados máximo. El tiempo de tinción varía mucho entre enzimas y especies. Las montadas en este trabajo tardaron de 1 a 2 horas. Las excepciones son la FE que se tiñe a los 3 a 5 minutos de incubación, y la ACPH que se

tiñe a las 24 horas de incubación.

A continuación se enumeran algunos de los problemas que se tuvieron durante el desarrollo de la electroforesis, y se enumeran algunas de las causas que identificamos al ensayar diferentes posibles soluciones a estos problemas:

Problema

1) Bandas barridas, no definidas.

Posible causa:

- No es un sistema de buffer óptimo
- Se pasó de corrimiento
- El wick presenta pedazos de tejido sin homogeneizar
- No se tiñó rápidamente y las enzimas difundieron lateralmente

Problema

2) Baja actividad enzimática.

Posible causa:

- Buffer de extracción inadecuado
- Se utilizo un radio Tej/Buf de ext. inadecuado
- Deterioro del material vegetal
- No es el sistema de buffer de charola y gel óptimo
- Problemas con la tinción; se dejó la solución preparada durante mucho tiempo antes de poner el gel a incubar, o bajas concentraciones de los sustratos o alguno otro de los reactivos
- Baja actividad de algunas enzimas debido a una baja concentración de las mismas en el tejido (se soluciona al dejar los wicks durante toda la corrida y al teñir rebanadas ms gruesas)

Problema.

3) El voltaje está demasiado alto.

Posible causa:

- Separación de las muestras del origen
- Contacto pobre de la esponja y el gel
- Toallas secas

Problema.

4) El frente en el gel es irregular

Posible causa:

- El gel es más ancho en una parte que en la otra
- Alguna de las regiones del origen no están haciendo contacto
- Alguno de los electrodos no funciona
- El platino de alguna de las dos cajas de corrimiento es demasiado corto

Problema.

5) Baja resolución enzimática en sistema de buffer de extracción, charola y gel ya probado.

Posible causa:

-Reactivos secos o en solución deteriorados (se encontró que las soluciones de los cofactores, en particular, se deterioran después de 2 semanas, probablemente porque en solución se saturan con agua

-El poro de la matriz de almidón en el gel es demasiado grueso porque la concentración del mismo o su enfriamiento varían ligeramente

-Se utilizó la primera o última rebanadas en las cuales la difusión lateral de la muestra hace que las bandas tñan barridas

De esta lista resulta claro que durante la electroforesis existen muchos factores que son difíciles de controlar y que afectan los resultados electroforéticos, inclusive una vez que se han establecido protocolos adecuados para cada isoenzima.

Apéndice 2.

HERENCIA MENDELIANA

Para los dos análisis siguientes se asumió apareamiento aleatorio entre los machos y las hembras de las 8.96 hectáreas consideradas. Es decir, la probabilidad de apareamiento de una hembra dada con machos de un genotipo particular fue igual a la frecuencia del genotipo en cuestión entre los machos muestreados. Estas frecuencias se reportan en la Tabla IV.1.

esperadas en un arreglo genotípico de una progenie de madre con genotipo conocido (en este caso LAP2 = 33).

Macho	Hembra	13	23	33
33	X	33	0	0
23	X	33	0	0.5x0.0666
13	X	33	0.5x0.1333	0
11	X	33	0	0
12	X	33	0	0
22	X	33	0	0

Frec. genotíp.esp: 0.0666 0.0334 0.8999

Para obtener las frecuencias absolutas se multiplica por el número de individuos:

Genotipo:	13	23	33
	0.0666 X 80	0.0334 X 80	0.8999 X 80
Frec. absolutas:	5.32	2.66	71.99

Con estos datos se pueden obtener los valores de G:

Genotipo:	13	23	33
Observado (f _i)	7	4	69
Esperado (F _i)	5.32	2.66	71.99

$$G = (4.60517) (f_i) (\log_{10} \{f_i/F_i\})$$

En este caso la $G = 1.2518$; con 2 g.l.; $P > 0.05$. Esto quiere decir que para este locus los apareamientos son al azar y la segregación alélica es mendeliana.

Análisis preliminar de la hipótesis de apareamientos al azar.

Para explorar la hipótesis de apareamiento al azar se hizo el un análisis igual al anterior, pero las frecuencias genotípicas de los machos se obtuvieron para aquellos 5 individuos que estuvieron más cercanos a cada hembra. En el caso de que hembras del mismo vecindario tuvieran el mismo para algún locus, se juntaban los datos de su progenie para este análisis. Un ejemplo de éste cálculo (para la GOT2) es el siguiente:

Las hembras 47 (11), 68 (11) y 72 (11) comparten el mismo vecindario de machos que es:

Para llevar a cabo este análisis se juntaron los datos de la progenie de madres con el mismo genotipo para el locus en cuestión. Las frecuencias genotípicas en cada uno de los arreglos de progenie constituyen los datos observados. Los datos esperados se estimaron con un diagrama de Punnet y la probabilidad de apareamiento con machos de los diferentes genotipos. Las frecuencias observadas y esperadas se compararon con una prueba de G y no una chi cuadrada porque en varios casos se registraron frecuencias pequeñas. A continuación se muestra un ejemplo de como se realizaron estos cálculos para la LAP2:

Para una hembra con genotipo (33) (genotipo entre paréntesis siempre). Se observaron en la progenie: 69 (33); 4 (23) y 7 (13). Las frecuencias de cada uno de los genotipos entre los machos de la población fueron: 0.1333(13); 0.0666(23); 0.8(33).

La siguiente tabla muestra las posibles cruza si suponemos que los apareamientos son al azar, y la frecuencia relativa de cada genotipo en la progenie de cada tipo de cruce. En la tabla, el primer número para cada genotipo es la probabilidad de que ocurra dicho genotipo en cada tipo de cruce, y el segundo número corresponde a la probabilidad de que la hembra en cuestión se aparee con un macho del genotipo indicado en la cruce. La multiplicación de estas dos probabilidades es la probabilidad de que ocurra una cruce y de esta se origine un genotipo particular en la progenie. Las probabilidades de ocurrencia de los diferentes genotipos en la progenie para todas las cruza posibles (las sumas hasta el final de la tabla) corresponden a las frecuencias

51 (12), 61 (22), 63 (11) 64 (11) y 75 (11) (el primer número es el número de macho y el segundo su genotipo). La frecuencia de los genotipos en los machos es:

Genotipos	11	12	22
Números	3	1	1
Frecuencia	$3/5 = 0.6$	$1/5 = 0.2$	$1/5 = 0.2$

La siguiente tabla muestra las cruza de las hembras con los machos del mismo genotipo y las frecuencias de la progenie que resultan:

Genotipos de la progenie			
Macho X Hembra	11	12	
11 X 11	1 (0.6)	0	
12 X 11	0.5 (0.2)	0.5 (0.2)	
22 X 11	0	1 (0.2)	
Frec.genot.esp.:	0.7	0.3	

Cada una de éstas frecuencias se multiplica por el número de individuos:

Genotipo:	11	12
Frec. absoluta:	0.7×68	0.3×68
	47.6	20.3

Con éstos datos se obtienen los valores de G como en el ejemplo anterior.

Apéndice 2b

Distribución independiente de los loci.

Para el análisis de ligamiento se utilizó una hembra y los datos genotípicos de 30 individuos de su progenie. Las frecuencias observadas se obtuvieron a partir del número de individuos observados para cada genotipo bi-locus. Las esperadas se obtuvieron con base en las frecuencias genotípicas encontradas en los machos de la población y asumiendo distribución independiente de los loci. Las frecuencias observadas y esperadas se compararon con una prueba de G. A continuación se va a mostrar un ejemplo de éstos cálculos para la pareja bi-loci GOT1-Fe1:

Los genotipos de los diferentes loci se van a indicar poniendo el locus de GOT1 arriba de la diagonal y el de Fe1 abajo (GOT1/Fe1):

Se cuentan los individuos de la progenie: 16 (12/22); 5(22/22); 1(22/23) y 5(11/22). Estos datos se comparan con los esperados en donde se asume apareamiento al azar y distribución independiente de los loci. Las probabilidades de ocurrencia de cada uno de los genotipos de la progenie a partir del set de machos de la población estudiada se calcula de la misma manera que en el apéndice 2a.

La siguiente tabla muestra las cruza de las hembras con todos los machos:

Genotipos de la progenie		Genotipos de la progenie							
MachoXHembra	12/22	22/22	11/22	11/12	12/12	12/23	22/23		
22/22X12/22	.5(12)	.5(12)	0	0	0	0	0		
12/22X12/22	.5(15)	.25(15)	.25(15)	0	0	0	0		
12/12X12/22	.25(1)	.25(1)	0	.25(1)	.25(1)	0	0		
11/22X12/22	.5(5)	0	.5(5)	0	0	0	0		
12/23X12/22	.25(1)	0	.25(1)	0	0	.25(1)	.25(1)		
Frec.gen.esp.	.4853	.2941	.1911	.0073	.0073	.0073	.0073		

Cada una de estas frecuencias se multiplica por el número de individuos de la progenie:

Genotipo:	12/22	22/22	11/22	11/12	12/12	12/23	22/23
Frecuencia absoluta:	13.103	7.941	5.159	0.197	0.197	0.197	0.197

Estas frecuencias se comparan con las frecuencias observadas mediante el estadístico G como en el caso del análisis de segregación independiente de alelos.

Apéndice 3.

Probabilidades de exclusión de paternidad.

La probabilidad esperada de exclusión promedio para un locus multialélico, si los machos y las hembras tienen diferentes frecuencias alélicas, es la siguiente (derivada por Chakraborty, Meagher et al. 1988, fórmula A.1):

$$E(P(E)_L) = \{P_i (1-P_i)^2 (1-Q_i+Q_i^2)\} \cdot \left\{ \sum_i \sum_j Q_i Q_j (P_i+P_j) (1-P_i-P_j)^2 \right\}$$

donde $P(E)$ es la probabilidad de exclusión, $A=(1-P_i)^2$ y $B=(1-P_i-P_j)^2$ son los dos valores que puede tomar la variable y $P_i(1-Q_i+Q_i^2)$ y $Q_iQ_j(P_i+P_j)$ son las probabilidades de que $P(E)$ tome los valores A y B respectivamente.

Esta corresponde a la fórmula general de esperanza de una variable aleatoria; es decir:

$$E(PE_L) = \sum_i \{x_i (P(PE_L=x_i))\}$$

donde PE_L es la variable aleatoria; en este caso la probabilidad de exclusión o de que una hembra se aparee con machos que no pueden dar el genotipo hijo en la pareja ($m \times h$). La variable aleatoria (PE_L) tiene una distribución discreta y puede tomar dos valores:

- 1) $(1-P_i)^2$ con probabilidad $P_i(1-Q_i+Q_i^2)$ para todo $i=1,2,\dots,k$
- 2) $(1-P_i-P_j)$ con probabilidad $Q_iQ_j(P_i+P_j)$ para todo $j>i=1,2,\dots,k$

es decir, para algunas parejas madre x hijo la PE_L es igual a $(1-P_i)^2$ y para otras parejas es igual a $(1-P_i-P_j)$.

Estos valores de PE_L se calculan de la siguiente manera: La primera parte de la fórmula (A.1, de la primera sumatoria) calcula cuál es el porcentaje de machos que pueden ser padres de la progenie A_1A_1 dada una pareja de madre X hijo (que en el ejemplo van a ser de genotipos A_1A_1 y A_1A_1 respectivamente). La probabilidad de aparearse con alguno de los padres que tienen el alelo A_1 se calcula como:

Padre	%
A_1A_1	P_1^2
A_1A_2	P_1P_2
A_2A_1	P_2P_1
A_1A_3	P_1P_3
A_3A_1	P_3P_1

La suma de estas probabilidades nos da el porcentaje de machos que pueden ser padres de esa progenie A_1A_1 dada una pareja madre X hijo (A_1A_1 X A_1A_1). El resultado de la sumatoria es:

% de machos que son posibles padres: $P_1(2-P_1)$

El porcentaje de machos que no pueden ser padres de esa progenie dada esa pareja madre x hijo va a ser 1- el porcentaje de machos que sí pueden ser padres:

% de machos que no pueden ser padres: $(1-P_1)^2$

La segunda parte de la fórmula (A.1, de la primera sumatoria) nos da la probabilidad de que PE_L tome el valor de $(1-P_i)^2$. Este valor se calcula sumando todas las frecuencias de los apareamientos (madre x hijo) que involucren al alelo P_i . El resultado de sta sumatoria es:

$$P_i(1-Q_i+Q_i^2)$$

La segunda sumatoria de la fórmula A.1 se deriva de la misma manera que la primera parte de sta sumatoria haciendo los cálculos para el otro set de parejas $m \times h$.

Esta fórmula (A.1) nos da la probabilidad de exclusión promedio solamente para un locus. Cuando se quiere calcular la probabilidad de exclusión combinada para todos los loci de $l=1$ hasta L se utiliza la siguiente fórmula:

$$P_E(C) = 1 - \sum_L (1-PE_L)$$

$\frac{\text{-----}}{\text{-----}}$
 $\frac{\text{-----}}{\text{-----}}$
 $\frac{\text{-----}}{\text{-----}}$

a
b
c

donde a es la probabilidad de no ser excluidos por cada loci, b es la probabilidad de no ser excluido por todos los loci y c es la probabilidad de ser excluido por todos los loci.

Esta última fórmula proporciona una estimación de la efectividad de exclusión de un conjunto particular de loci que en la figura IV.3 llamamos probabilidad de exclusión combinada.

Con base en la distribución de probabilidades de la PE se puede construir numéricamente una distribución de frecuencias del porcentaje de parejas madre-hijo con las diferentes

PE. Esta distribución se puede comparar con la observada para explorar las dos hipótesis sobre las cuales est basada la derivación de la probabilidad de exclusión y su distribución probabilfstica: apareamientos al azar y distribución de los loci independientes.

REFERENCIAS

- Allard, R. W., A. L. Kahler y B. S. Weir. (1972). "The effect of selection on esterase allozymes in a barley population." *Genetics*. 72: 489-503.
- Alvarez-Buylla, R. E. (1986). Demografía y dinámica poblacional de *Cecropia obtusifolia* Bertol (Moraceae) en la selva de Los Tuxtlas, México. Tesis de Maestría, UNAM, México, D.F.
- Alvarez-Buylla, R. E. (1988 ms). Individual variability in seed and seedling traits: Its possible demographic and evolutionary roles for tropical tree species. Botany 250 research report, U. C. Berkeley, California
- Alvarez-Buylla, R. E. y M. Martínez-Ramos. (1990). "Seed bank versus seed rain in the regeneration of a tropical pioneer tree." *Oecologia*. 84: 314-325.
- Alvarez-Buylla, R. E. y J. R. García-Barrios. (1991). "Seed and forest dynamics: a theoretical framework and an example from the Neotropics." *The American Naturalist* (en prensa)
- Anderson, J. W. (1968). "Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues." *Phytochemistry*. 7: 1973-1988.
- Aquadro, C., M. Desse, C. Bland, C. Langley y C. Laurie-Ahlberg. (1986). "Molecular population genetics of the alcohol dehydrogenase gene region of *Drosophila melanogaster*." *Genetics*. 114: 1165-1190.
- Avise, J., J. Shapira, S. Daniel, C. Aquadro y R. Lansman. (1979). "Mitochondrial DNA differentiation during the speciation process in *Peromyscus*." *Molecular biology and evolution*. 1: 38-56.
- Brown, A. (1990). Genetic characterization of plant mating systems. Plant population genetics, breeding, and genetic resources. (Ed. Brown, A.; Clegg, M.; Kahler, A. Weir) pp. 145-162. Sinauer, Sunderland.
- Brown, A., A. Matheson y K. Eldridge. (1975). "Estimation of the mating system of *Eucalyptus obliqua* L'Hérit. by using allozyme polymorphisms." *Australian Journal of Botany*. 23: 931-949.
- Brown, A. y B. Weir. (1983). Measuring genetic variability in plant populations. Isozymes in plant genetic and breeding (Ed. Tanksley, S. and Orton, T.) DR. Junk, Amsterdam..
- Brown, A. H. D. (1978). "Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation." *Theoretical and Applied Genetics*. 52: 145-157.
- Brown, A. H. D. y M. T. Clegg. (1983). "Isozyme assessment of plant genetic resources." Isozymes: Current Topics in Biological and Medical Research. 11 (Medical and Other Applications: 285-295.
- Burdon, J. J., D. R. Marshall y A. H. D. Brown. (1983). "Demographic and genetic changes in populations of *Echium plantagineum*." *Journal of Ecology*. 71: 667-679.
- Buth, D. G. (1984). "The application of electrophoretic data in systematic studies." *Annals Review of Ecology and Systematics*. 15: 501-522.
- Cain, A. y P. Sheppard. (1950). "Selection in the polymorphic land snail *Cepaea nemoralis* (L.)." *Heredity*. 4: 275-294.
- Cain, A. J. y P. M. Sheppard. (1954). "Natural Selection in *Cepaea*." *Genetics*. 39: 89-116.
- Cavalli-Sforza, L. L. (1973). "Some Current Problems of Human Genetics." *American Journal of Human Genetics*. 25: 82-104.
- Chakraborty, R., T. R. Meagher y P. E. Smouse. (1988). "Parentage analysis with genetic markers in natural populations. I. The expected number of offspring with unambiguous paternity." *Genetics*. 118: 527-536.
- Cheliak, W. y J. Pitel. (1984). Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. Lab Protocol, Berkeley, California.
- Clegg, M. y B. Epperson. (1988). Natural selection on flower color polymorphisms in morning glory populations. Plant evolutionary biology, (Ed. Gottlieb, L. and Jain, S.) pp. 255-273. London,

Chapman.

Clegg, M. T., A. L. Kahler y R. W. Allard. (1978a). "Estimation of life cycle components of selection in an experimental plant population." *Genetics*. 89: 765-792.

Clegg, M. T., A. L. Kahler y R. W. Allard. (1978b). Genetic demography of plant populations. Ecological Genetics: the Interface. (Ed. Brossard, P. F.) pp. 173-187. New York, Springer Verlag.

Conkle, T (1982). Manual of the electrophoresis technique.

Crawford, D. (1985). "Electrophoretic data and plant speciation." *Systematic botany*. 10(4): 405-416.

Crosby, J. (1940). "High proportions of homostyle plants in populations of *Primula vulgaris*." *Nature*. 145: 672-673.

Devlin, B. y N. Ellstrand. (1990). "The development and application of a refined method for estimating gene flow from angiosperm paternity analysis." *Theoretical and Applied Genetics* (en prensa).

Dobzhansky, T. (1941). *Genetics and the origin of species*. Genetics and the origin of species. Nueva York, Univ. Press.

Eguarte, F. L. (1990). Genética de poblaciones de *Astrocaryum mexicanum* Liebm. en Los Tuxtlas, Veracruz. Tesis de Doctorado, Centro de Ecología, UNAM.

Ellstrand, N. (1984). "Multiple paternity within the fruits of the wild radish *Raphanus sativus*." *The american naturalist*. 123(6): 819-828.

Ellstrand, N. y J. Lee. (1987). "Cultivar identification of cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) using isozyme markers." *Scientia horticulturae*. 32: 25-31.

Ellstrand, N. y D. Levin. (1990). "Recombination system and population structure in *Oenothera*." *Evolution*. 34(5): 921-933.

Emerson, S. (1939). "A preliminary survey of the *Oenothera organensis*." *Genetics*. 27: 317-332.

Finnerty, V. y G. Johnson. (1979). "Post-transnacional modification as a potential explanation of high levels of enzyme polymorphism: xanthine dehydrogenase and aldehyde oxidase in *Drosophila melanogaster*." *Genetics*. 91: 695-722.

Fisher, R. y C. Diver. (1934). "Crossing-over in the land snail *Cepaea nemoralis* L." *Nature*. 33: 834-835.

Ford, E. B. (1975). Ecological Genetics. London, Chapman & Hall.

Gillespie, J. y K. Kojima. (1968). "The degree of polymorphisms in enzymes involved in energy production compared to that in non-specific in two *Drosophila ananassae* populations." *Genetics*. 61: 582-585.

Gillespie, J. y C. Langley. (1974). "A general model to account for enzyme variation in natural populations." *Genetics*. 76: 837-849.

Gottlieb, L. (1974). "Genetic confirmation of the origin of *Clarkia lingulata*." *Evolution*. 28: 244-250.

Gottlieb, L. (1981). "Electrophoretic evidence and plant populations." *Progress in phytochemistry*. 7: 2-42.

Gottlieb, L. (1982). "Conservation and duplication of isozymes in plants." *Science*. 216(23): 373-380.

Haldane, J. (1957). "The cost of natural selection." *Journal of Genetics*. 55: 511-524.

Hamrick, J., Y. Linhart y J. Mitton. (1979). "Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants." *Annual Review Ecology and Systematics*. 10: 173-200.

Hamrick, J. y M. Loveless. (1986a). The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of plant populations. Frugivores and seed dispersal. (Ed. Estrada, A.; and Fleming, T.) pp. 211-223. Dr. Junk Publ., The Hague.

Hamrick, J. y M. Loveless. (1986b). "Isozyme variation in tropical trees: procedures and preliminary results." *Biotropica*. 18(3): 201-207.

Hamrick, J. y M. Loveless. (1989). The genetic structure of tropical tree populations: associations with reproductive biology. The evolutionary ecology of plants. (Ed. Bock, J.; and Linhart, B.) pp. 129-146. Westview, New York.

Hartl, D. y A. Clark. (1989). Principles of population genetics. Massachusetts, Sinauer.

Hedrick, P. (1983). Genetics of populations. Boston., Science books Int.

Hodgskiss, P. (1988). Protocolo de laboratorio de la Técnica de electroforesis.

Johnson, G. (1974). "Enzyme polymorphism and metabolism." *Science*. **184**: 28-37.

Johnson, G. (1979). Enzyme polymorphism: genetic variation in the physiological phenotype. Topics in plant population biology. (Ed. Solbrig, O. Jain, S. Johnson, G. Raven, P.) pp. 62-83. New York., Columbia University Press.

Kelley, W. y R. Adams. (1977). "Preparation of extracts from *Juniper* leaves for electrophoresis." *Phytochemistry*. **16**: 513-516.

Kephart, S. (1990). "Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques." *American Journal of Botany*. **77**(5): 693-712.

Kesseli, R. y R. Michelmore. (1986). "Genetic variation and phylogenies detected from isozyme markers in species of *Lactuca*." *The journal of heredity*. **77**: 324-331.

Kettlewell, H. (1958). "A survey of the frequencies of *Biston betularia* L. (Lep.) and its melanic forms in Britain." *Heredity*. **12**: 51-72.

Kettlewell, H. (1973). The evolution of melanism: the study of a recurring necessity. Oxford., Oxford University Press.

Kimura, M. (1968). "Evolutionary rate at the molecular level." *Nature*. **229**: 467-469.

Kimura, M. (1983). The neutral theory of molecular evolution. Cambridge., Cambridge University Press.

Kimura, M. y T. Otha. (1971). Theoretical aspects of population genetics. Princeton, New Jersey., Princeton University Press.

Koehn, R., W. Diehl y T. Scott. (1988). "The differential contribution by individual enzymes of glycolysis and protein catabolism to the relationship between heterozygosity and growth rate in the coot clam, *Mulinia lateralis*." *Genetics*. **118**: 121-130.

Kreitman, M. (1983). "Nucleotide polymorphism at the alcohol dehydrogenase locus of *Drosophila melanogaster*." *Nature*. **304**: 412-417.

Lande, R. (1988). "Genetics and demography in biological conservation." *Science*. **241**: 1455-1459.

Landsteiner, K. y A. Weiner. (1940). "An agglutinable factor in human blood recognized by immune sera for rhesus blood." *Proc. Society of Experimental Biology*. **43**: 223.

Langenheim, J. (1985). The roles of plant secondary chemicals in wet tropical ecosystems. Ecophysiology Physiological ecology of plants of the wet tropics. (Ed. Medina, E., Mooney, H. A.; and Vázquez-Yanes) pp. 189-208. Stanford, Dr W. Junk. Publishers.

Lees, D. y E. Creed. (1973). "The genetics of the insularia forms of the peppered moth, *Biston betularia*." *Heredity*. **39**: 67-73.

Lehninger. (1983). Bioquímica. Barcelona, Omega.

Lewontin, R. (1974). "Population genetics." *Annual Review of Genetics*. **7**: 1-17.

Lewontin, R. y L. Dunn. (1960). "The evolutionary dynamics of a polymorphism in the house mouse." *Genetics*. **45**: 705-722.

Lewontin, R. y J. Hubby. (1966). "A molecular approach to the study of genic heterozygosity in natural populations. II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*." *Genetics*. **54**: 595-609.

Li, C. y D. Horvitz. (1953). "Some methods

of estimating the inbreeding coefficient." *American Journal of Human Genetics*. 5: 107-117.

Linhart, Y., J. Mitton, K. Sturgeon y M. Davis. (1981). "Genetic variation in space and time in a population of ponderosa pine." *Heredity*. 46(3): 407-426.

Loomis, W. (1974a). "Removal of phenolic compounds during the isolation of plant enzymes." *Methods in Enzymology*. 13: 555-563.

Loomis, W. (1974b). "Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles." *Methods in Enzymology*. 3: 528-544.

Loomis, W. y J. Battaile. (1966). "Plant phenolic compounds and the isolation of plant enzymes." *Phytochemistry*. 5: 423-438.

Lot-Helgueras, A. (1976). La estación de biología tropical Los Tuxtlas: pasado, presente y futuro. Regeneración de Selvas. (Ed. Gómez-Pompa) pp. 31-69. México., CECOSA.

Loveless, M. y J. Hamrick. (1984). "Ecological determinants of genetic structure in plant populations." *Annual Review of Ecology and Systematics*. 15: 65-95.

Marshall, D. y R. Allard. (1969). "Isozyme polymorphisms in natural populations of *Avena fatua* y *A. barbata*." :

Meagher, T. (1986). "Analysis of paternity within a natural population of *Chamaelirium luteum*. 1. Identification of most-likely male parents." *The American Naturalist*. 128(2): 199-215.

Meagher, T. y E. Thompson. (1986). "The relationships between single parent and parent pair genetic likelihoods in genealogy reconstruction." *Theoretical population biology*. 29: 87-106.

Miranda, F. y E. Hernández-Xolocotzi. (1963). "Los tipos de vegetación en México y su clasificación." *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 28: 29-179.

Mitton, J., Y. Linhart, K. Sturgeon y J. Hamrick. (1979). "Allozyme polymorphisms detected in mature needle tissue of ponderosa pine." *The journal of heredity*. 70: 86-89.

Mulcahy, D. L. y S. M. Kaplan. (1979). "Mendelian ratios despite non-random fertilization." *The American Naturalist*. 113: 419-425.

Nei, M. (1987). Molecular evolutionary genetics. New York, Columbia University Press.

Nevo, E. (1978). "Genetic variation in natural populations: Patterns and theory." *Theoretical population biology*. 13: 121-177.

O'Malley, D. y K. Bawa. (1987). "Mating system of a tropical rain forest tree species." *American Journal of Botany*. 74(8): 1143-1149.

Piñero, D. y L. Eguiarte. (1988). "The origin and biosystematic status of *Phaseolus coccineus* spp *polyanthus*: electrophoretic evidence." *Euphytica*. 37: 199-203.

Powell, J. y J. Lichtenfels. (1979). "Population genetics of *Drosophila amylose*. I. Genetic control of tissue-specific expression in *D. pseudoobscura*." *Genetics*. 92: 603-612.

Ramshaw, J., J. Coyne y R. Lewontin. (1979). "The sensitivity of gel electrophoresis as a detector of genetic variation." *Genetics*. 93: 1019-1037.

Richardson, B., P. Baverstock y M. Adams. (1986). Allozyme electrophoresis. Australia, Academic Press Australia.

Ritland, K. (1989). "Correlated matings in the partial selfer *Mimulus guttatus*." *Evolution*. 43(4): 848-859.

Schaal, B. y D. Levin. (1976). "The demographic genetics of *Liatris cylindracea* Michx. (Compositae)." *The American Naturalist*. 110: 191-206.

Shoen, D. (1982). "Genetic variation and the breeding system of *Gilia achilleifolia*." *Evolution*. 36(2): 361-370.

Slatkin, M. y W. Maddison. (1989). "A cladistic measure of gene flow inferred from the phylogenies of alleles." *Genetics*. 123: 603-613.

Sokal, R. y J. Rohlf. (1969). Biometry. San Francisco., Freeman and company.

Soltis, D., C. Haufler, D. Darrow y G. Gastony. (1983). "Starch gel electrophoresis of ferns: A compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules." American fern journal. 73(1): 9-27.

Soltis, D., C. Haufler y G. Gastony. (1980). "Detecting enzyme variation in the fern genus *Bommeria*: an analysis of methodology." Systematic Botany. 5: 30-38.

Stuber, C. y M. Goodman. (1983). Allozyme genotypes for popular and historically important inbred lines of corn. Southern Series, 29 pp.

Sytsma, K. y B. Schaal. (1985). "Genetic variation, differentiation and evolution in a species complex of tropical shrubs based on isozymic data." Evolution. 39(3): 582-593.

Waller, D., D. O'Malley y S. Gawler. (1987). "Genetic variation in the extreme endemic *Pedicularis furbishiae* (Scrophulariaceae)." Conservation Biology. 1: 335-340.

Werth, C. (1985). "Implementing an isozyme laboratory at a field station." Va. Journal of Science. 36: 53-76.

White, M. (1978). Modes of speciation. San Francisco., Freeman.

Wyatt, R. (1989). A general protocol for starch gel electrophoresis.

Zar, J. (1974). Biostatistical analysis. Prentice-Hall.

Zouros, E. (1979). "Mutation rates, population sizes and amounts of electrophoretic variation of enzyme loci in natural populations." Genetics. 92: 623-646.

Anulsekhar, S., D.E. Parfitt, W. Beres, P.E. Hansche. (1986). "Genetic of Malate dehydrogenase isozymes in peach." The Journal of Heredity. 77 : 49-51.

Buckley, D.P., D.M. O'Malley, V. Apsitt, G.T. Prence, K.S. Bawa. (1988). "Genetics of Brasil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. Bonpl. Lecythidaceae). I. Genetic variation in natural populations." Theoretical of Applied Genetics. 76 : 923-928.

Ellstrand, N. y B. Devlin. (1989). "Transmission genetics of isozyme loci in *Raphanus sativus* (Brassicaceae). Stress dependent non mendelian segregation." American Journal of Botany. 76(1): 40-46.

Gan, Y. y F. Robertson. (1981). "Isozyme variation in some rain forest trees." Biotropica. 13 (1): 20-28.

Lee, J. y N. Ellstrand. (1987). "Inheritance and linkage of isozyme in *Theobroma cacao*." The Journal of Heredity. 78: 383-387.

Smith, C. y J. Hamrick. (1984). "Variation in estimates of outcrossing in musk thistle populations." The Journal of Heredity. 75: 303-307.

Smith-Huerta, N. (1986). "Isozymic diversity in three allotetraploid *Citrullus* species and their putative diploid progenitors." The Journal of Heredity 77(3): 349-354.

Torres, A.M. y B. Tisserat. (1980). "Leaf isoenzymes as genetic markers in date palms." American Journal of Botany. 67 (2): 162-167.