



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**"ANALISIS COMPARATIVO EN LA ESTRUCTURA GENETICA Y TASAS DE ENTRECruzAMIENTO EN POBLACIONES DE *Reseda luteola* (RESEDACEAE) EN MEXICO Y ESPAÑA"**



BIBLIOTECA  
CENTRO DE ECOLOGIA

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A :  
ELLELI HUERTA OCAMPO

000 213915



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Ciudad Universitaria



FACULTAD DE CIENCIAS  
División de Estudios  
Profesionales  
Exp. Núm. 55

M. EN C. VIRGINIA ABRIN SATULÉ  
Jefe de la División de Estudios Profesionales  
Universidad Nacional Autónoma de México.  
P r e s e n t e .

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo  
revisado el trabajo de tesis que realizó la pasante Elleli  
Huerta Ocampo  
con número de cuenta 8622685-5 con el título:  
"Análisis comparativo en la estructura genética y tasas de  
entrecruzamiento en poblaciones de Reseda luteola  
(Resedaceae) en México y España"

Consideramos que reúne los méritos necesarios para que pueda conti-  
nuar el trámite de su Examen Profesional para obtener el título de -  
Biologo.

GRADO NOMBRE Y APELLIDOS COMPLETOS

FIRMA

Dr. Daniel Piñero Dalman  
Director de Tesis  
Dr. Luis Enrique Eguiarte Frons  
Dr. Juan Servando Nuñez Farfán  
M en C. Nidia Pérez Naesser  
Suplente  
Biol. Carlos Fabian Vargas Mendoza  
Suplente

*Daniel Piñero*  
*Luis Enrique Eguiarte Frons*  
*Juan Servando Nuñez Farfán*  
*Nidia Pérez Naesser*  
*Carlos Fabian Vargas Mendoza*

Ciudad Universitaria, D.F., a 8 de junio de 1994.

**A todos aquellos que no le temen a la felicidad y  
que luchan día con día para alcanzarla.**

## INDICE

|   |     |
|---|-----|
| RESUMEN   | III |
| AGRADECIMIENTOS                                 | IV  |
| INTRODUCCION                                    | 1   |
| Genética de poblaciones                         | 1   |
| Electroforesis                                  | 1   |
| Patrones de variación genética                  | 2   |
| Fuerzas evolutivas                              | 3   |
| Colonización                                    | 4   |
| OBJETIVOS                                       | 9   |
| LA ESPECIE DE ESTUDIO: <i>Reseda luteola</i> L. | 10  |
| MATERIAL Y METODOS                              | 12  |
| SIEMBRA   | 12  |
| PROCESADO DE MUESTRAS Y ELECTROFORESIS          | 13  |
| ANALISIS DE DATOS                               | 13  |
| Variación genética                              | 13  |
| Tasas de entrecruzamiento                       | 19  |
| RESULTADOS                                      | 20  |
| Variación genética                              | 20  |
| Índices de fijación $F$                         | 21  |
| Estadísticos $F$ de Wright                      | 23  |

|                                    |    |
|------------------------------------|----|
| Distancias e identidades genéticas | 24 |
| Tasas de entrecruzamiento          | 24 |
| DISCUSION                          | 27 |
| Variación genética                 | 27 |
| Frecuencias alélicas               | 28 |
| Diferenciación genética            | 28 |
| Indíces de fijación $F$            | 29 |
| Estadísticos $F$ de Wright         | 30 |
| Flujo génico                       | 31 |
| Tasas de entrecruzamiento          | 32 |
| CONCLUSIONES                       | 36 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS         | 38 |
| APENDICE                           | 45 |

## RESUMEN.

En este trabajo se estudio la variación y estructura genética, así como las tasas de entrecruzamiento para poblaciones de *Reseda luteola* utilizando electroforesis de enzimas en geles de almidón.

*Reseda luteola* es una especie introducida a la vegetación del Valle de México, por lo cual se estudiaron dos poblaciones introducidas (México) y una población nativa (España). Se encontró una relativamente variación genética en todas las poblaciones, expresadas en el polimorfismo, la heterocigosis y el número promedio de alelos por loci. El análisis de la estructura genética se realizó con datos de 12 loci. Los índices de fijación muestran un exceso de homocigos en la progenie y de heterocigos en las madres, lo cual sugiere que podría estar operando algún proceso de selección.

Los niveles de variación genética similares en las poblaciones de *Reseda luteola* y la *Fst* encontrada, indican que las poblaciones introducidas no están empobrecidas genéticamente con respecto a la población de España, sugiriendo que en el proceso de colonización de esta especie no existieron cuellos de botella o efecto fundador. Con los valores obtenidos de *Fst* y *Nm* se observa que existe un elevado flujo génico.

Respecto a las tasas de entrecruzamiento encontradas para *Reseda luteola* se encuentra que podrían existir procesos de endogamia biparental que probablemente esten ocurriendo por una subestructura en la población, lo cual se vería apoyado, ya que las tasas de entrecruzamiento por locus no se encuentran en equilibrio de endogamia.

Por lo encontrado respecto a la variación genética, los estadísticos *F* de Wright y las tasas de entrecruzamiento en *Reseda luteola* se puede decir que el sistema reproductivo en esta especie tiene un papel muy importante en la determinación de la estructura genética.

## **AGRADECIMIENTOS.**

Esta tesis fue realizada bajo la dirección del Dr. Daniel Piñero Dalmau, a quien agradezco todo su apoyo, sus comentarios y orientación en este trabajo. Quiero agradecerle también, el que me haya dado una visión muy especial de la biología; todo lo que me ha enseñado, pero sobre todo sus consejos científicos y de la vida, sin los cuales esta tesis no se hubiera terminado. Conocerlo y trabajar con él, han sido un verdadero gusto.

Al Dr. Luis Eguiarte Fruns, le agradezco toda la ayuda brindada a este trabajo, así como todo el entusiasmo de sus ideas y comentarios, que como siempre fueron muy valiosos.

Al Dr. Juan Nuñez Farfán le agradezco sus comentarios a esta tesis así como el haber aceptado ser sinodal.

A Fabián Vargas le agradezco infinitamente toda la ayuda brindada, sobre todo su paciencia y tiempo para enseñarme el uso de los diferentes programas utilizados en el análisis de los datos.

A Nidia Pérez Nasser quiero agradecer de una manera muy especial el haberme introducido en el arte de las electroforesis, además de toda la ayuda que siempre me brindo, los comentarios agradables y por hacer que el laboratorio no sea un caos.

A toda la gente del laboratorio de Genética y Evolución que de una manera u otra ayudaron en la elaboración de este trabajo y por todos los buenos ratos que me hicieron pasar.

A Erika quiero agradecerle de una manera particular, porque además de ser mi amiga, fue mi compañera de laboratorio. Sin ella, las cosas no hubieran sido iguales. Muchas gracias por haber hecho de todo este proceso algo tan agradable y lleno de cosas gratas, pero especialmente por todo su cariño.



A toda la gente del Centro de Ecología que de alguna manera han participado en este trabajo. Entre las cuales quiero agradecerle principalmente: A la Dra. Alma Orozco, por la oportunidad de participar en su proyecto "La flora introducida espontánea al Valle de México". Al Dr. Constantino Macías por su ayuda en la elaboración de las gráficas de este trabajo. A Gloria y Alicia por toda la lata que les daba en la dirección, que por lo que recuerdo puede ser que haya sucedido casi a diario y por mantener aún así el buen humor siempre. A Ana Mendoza por todo su apoyo, por los animos que siempre me ha dado, pero sobre todo por su cariño y porque siempre tiene una cosa agradable que decir.

Quiero agradecer a mis amigas de siempre: Maite y María por todos los lindos momentos que me han dado desde que las conocí, por sus alegrías, por todo el apoyo que me han dado, por las largas pláticas, por su cariño y por ayudarme a salir o mejor dicho por sacarme de los hoyos en los cuales suelo caer. Muchas gracias. Gracias también a Anna que aunque lejos me dio su apoyo.

A mis amigos: Manuel, Raúl, Oscar, Lucho y Nacho les agradezco todo su cariño y especialmente lo que me han consentido en todos estos años y el cumplirme no todos, pero si muchos de mis caprichos y que a pesar de todos mis berrinches todavía me quieran.

Ya que este trabajo significa demasiado para mí, quiero agradecer de una manera muy especial a mis padres Martha y Enrique por todo el cariño y apoyo que me han dado toda mi vida. A mi hermanito Diego le agradezco una infinidad de cosas, entre ellas: consentirme, cuidarme y quererme mucho; a mi hermana Icnelia le agradezco muchas cosas. Estoy segura que sin ellos todo hubiera sido tremendamente difícil.

Debo agradecer también a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico por otorgarme una beca en apoyo a la elaboración de esta tesis.

## **INTRODUCCION.**

### **Genética de poblaciones.**

Los objetivos centrales de la genética de poblaciones son comprender como ocurre la evolución genética de las poblaciones, explicar como se lleva a cabo el proceso de adaptación (Hartl y Clark, 1989; Eguiarte, 1990) y ayudar a entender el proceso de especiación (Hedrick, 1983; Eguiarte, 1986; Hartl y Clark, 1989). Así contempla principalmente dos tareas: 1) Describir los niveles de variación genética dentro y entre poblaciones, utilizando frecuencias alélicas y genotípicas, y 2) explicar esta variación en términos de las fuerzas evolutivas: selección natural, deriva génica, mutación, migración y sistemas reproductivos (Eguiarte y Piñero, 1990; Hedrick, 1983).

La distribución espacial y temporal de la variación genética, así como la frecuencia de los diferentes genotipos juegan un papel muy importante en la determinación del potencial evolutivo de las poblaciones. Se ha demostrado que ésta no se distribuye al azar en las poblaciones, y se le puede llamar estructura genética de la población (Hamrick, 1989). La distribución de la variación genética depende también de las características de historia de vida como son la dispersión de la semilla, mecanismos de polinización, fecundidad y de otras características propias de las especies como son el ciclo de vida, tipo de hábitat, rango geográfico, etc. (Hamrick et al, 1979; Hedrick, 1983; Loveless y Hamrick, 1984; Hamrick, 1989; Hartl y Clark, 1989).

### **Electroforesis.**

A partir de los años setenta la variación genética ha sido estudiada ampliamente en poblaciones naturales. Antes de los años setenta, lo más desarrollado era toda la teoría matemática de la genética de poblaciones y casi no se tenían datos empíricos (Eguiarte, 1990). Se ha observado que casi todas las poblaciones tienen niveles relativamente altos de variación; las excepciones que se han encontrado corresponden a especies con distribuciones muy restringidas o que han pasado recientemente por cuellos de botella (Hamrick, 1989; Eguiarte y Piñero, 1990; Pérez-Nasser, 1990).

Desde finales de los años sesenta el procedimiento más utilizado para detectar variación genética ha sido fundamentalmente la electroforesis de proteínas (Hartl y Clark, 1989; Eguiarte y Piñero, 1990).

Durante mucho tiempo, las características morfológicas determinadas por un solo gen, se utilizaron para obtener estimaciones cuantitativas de los sistemas de apareamiento, flujo génico y ocasionalmente selección natural. Las técnicas bioquímicas, como la electroforesis de proteínas en geles de almidón proveen marcadores adicionales para estudiar procesos evolutivos. Los loci de isozimas tienen varias ventajas sobre los caracteres morfológicos: 1) la mayoría de los loci se heredan mendelianamente; 2) muchos son codominantes y las frecuencias alélicas pueden calcularse directamente; 3) los estimados de la distribución y los niveles de variación genética pueden compararse directamente entre poblaciones o especies y 4) muchos loci se expresan en todos los estadios del ciclo de vida (Hamrick, 1989; Weeden y Wendel, 1989).

### **Patrones de variación genética.**

Se ha observado que las plantas mantienen niveles altos de variación genética entre poblaciones. Una proporción significativa de esta variación está asociada con caracteres de historia de vida y ecológicos de las especies (Hamrick et al., 1979; Loveless y Hamrick, 1984; Hamrick, 1989). Entre los factores ecológicos más importantes se encuentran: rango geográfico, ciclo de vida, fenología, dispersión de semillas, mecanismos de polinización, modo de reproducción, morfología floral y sistema de apareamiento (Loveless y Hamrick, 1984).

Se han observado patrones en la relación que existe entre las características de historia de vida y los factores ecológicos, en la determinación de la estructura genética de las poblaciones. Por ejemplo: las especies leñosas mantienen mayor variación genética entre poblaciones, que las especies herbáceas (Hamrick, 1989); las especies polinizadas por viento presentan un índice de polimorfismo mayor que las especies polinizadas por animales (Hamrick et al., 1979). Con respecto al mecanismo de dispersión de las semillas, se ha encontrado que se presenta una mayor diversidad promedio ( $H$ ) en las especies en las cuales las semillas son ingeridas y dispersadas por animales, que aquellas dispersadas por gravedad (Loveless y Hamrick, 1984).

También se ha reportado que el tiempo de generación es muy importante en la determinación de la estructura genética, encontrándose una variación genética mayor, en las especies perennes que en las anuales y mucho menor aún, en las especies bianuales (Hamrick et al., 1979; Loveless y Hamrick, 1984).

Por varias décadas la biología reproductiva de las plantas y la evolución de los sistemas de apareamiento ha sido interpretada en el contexto de la teoría que la tasa de entrecruzamiento es un factor primario que determina la estructura genética de las poblaciones de plantas (Layton y Ganders, 1984). Existe una asociación positiva entre la cantidad de entrecruzamiento y la variación genética (Hamrick et al., 1979). El patrón que se encuentra es que las especies que predominantemente se entrecruzan presentan niveles de variación genética mayores, que aquellas que se autofecundan totalmente, y las especies con sistemas mixtos de apareamiento presentan niveles intermedios de variación (Hamrick et al., 1979; Loveless y Hamrick, 1984). Se ha demostrado en trabajos realizados con alozimas en *Lycopersicon pimpinellifolium* que las poblaciones que tienen una mayor tasa de entrecruzamiento son más polimórficas que las poblaciones que se autofecundan (Hamrick et al., 1979). El entrecruzamiento como sistema de apareamiento es muy importante, ya que es el que promueve el movimiento de polen entre individuos y reduce la diferenciación entre las poblaciones.

Algunos factores ecológicos y características de historia de vida, pueden tener un papel más importante que otros en la determinación de la estructura genética de las poblaciones, como los que promueven el flujo génico, ya que incrementan los tamaños efectivos de población (Hedrick, 1983) y de esta manera se disminuye la diferenciación entre poblaciones.

### **Fuerzas evolutivas.**

La distribución de la variación genética entre poblaciones, es el producto de la integración entre varios factores evolutivos. Entre estos es muy importante el flujo génico. Las especies con mayor flujo génico tienen menor diferenciación entre poblaciones que las especies con un flujo génico restringido (Hamrick, 1989).

La migración o flujo génico puede aumentar la variabilidad genética existente de una población y dicha variación puede ser importante desde el punto de vista selectivo. Por otro lado, la migración puede introducir genes adaptados a otras condiciones, y en consecuencia disminuir la adaptación promedio de la población (Eguiarte, 1986; Slatkin, 1987).

El movimiento de genes entre poblaciones tiene diferentes efectos relacionados con la estructura genética de las poblaciones. Las altas tasas de flujo génico incrementan los tamaños efectivos de población ( $N_e$ ) y reducen la diferenciación genética entre poblaciones, que podría darse por procesos de deriva génica o selección natural.

Todas las poblaciones experimentan procesos de migración y/o colonización, sin que las consecuencias genéticas sean las mismas para todas ellas (Barrett y Husband, 1989). La colonización de nuevos hábitats es un componente integral de la biología de la mayoría de las especies de plantas (Barrett y Shore, 1989). Los eventos de colonización son importantes en la determinación de la estructura genética de las poblaciones sobre todo cuando ocurren frecuentemente, como por ejemplo, en especies de ambientes efímeros o cuando son el resultado de una dispersión a gran distancia, pudiendo producir poblaciones genéticamente aisladas (Barrett y Richardson, 1986; Slatkin, 1987; Barrett y Husband, 1989). Los procesos de colonización también se conocen como invasiones biológicas (Barrett y Richardson, 1986).

### **Colonización.**

La genética de la colonización es importante no solo para estudios evolutivos y de biología poblacional, sino también en agricultura y conservación.

El término "colonizador" ha tomado varios significados biológicos diferentes. Los agricultores han implementado el término "colonizador" a especies no nativas que afectan los agrosistemas, como por ejemplo algunas especies de malezas (Bazzaz, 1986). En otro sentido se piensa en "colonizador" como aquellas especies que se dispersan a grandes distancias y llegan a un hábitat desocupado donde subsecuentemente interactúan con otras especies (Bazzaz, 1986).

Para los propósitos de este trabajo, se tomará el término colonización como la dispersión y el establecimiento de organismos en una región o hábitat no ocupado previamente por organismos de la especie (Barrett y Richardson, 1986; Barrett y Husband, 1989; Carson, 1989).

La información de las consecuencias genéticas de la colonización es esencial para entender la genética de poblaciones y evolución de los organismos. La información de la estructura genética de las poblaciones colonizadoras puede utilizarse de dos maneras: 1) Reconstruir procesos históricos de migración y colonización, e 2) Inferir el potencial evolutivo de las poblaciones que entran en un nuevo ambiente (Barrett y Husband, 1989).

Los cuellos de botella asociados a eventos fundadores a grandes distancias, la ausencia de migraciones repetidas de la población original y la posibilidad de nuevas presiones de selección en el nuevo ambiente, pueden producir pérdida de variación genética durante eventos de colonización (Clegg y Brown, 1983; Barrett y Husband, 1989).

Por otra parte se ha especulado mucho acerca de las características necesarias de una especie para tener éxito en la colonización de un área. Brown y Marshall (1981) han identificado varios patrones recurrentes en el éxito de los organismos colonizadores. Las características que comparten incluyen: heterocigocidad fija a través de poliploidia, propagación por autofecundación o de maneras asexuales, altos niveles de asociación multilocus, marcada diferenciación genética entre poblaciones y altos niveles de plasticidad fenotípica (Brown y Marshall, 1981).

Se ha observado que el sistema de apareamiento tiene una gran relevancia en los niveles de variación genética, y que afecta de manera importante en el éxito de la colonización (Price y Jain, 1981; Clegg y Brown, 1983; Layton y Ganders, 1984; Barrett y Richardson, 1986; Bazzaz, 1986; Barrett y Husband, 1989; Brown y Burdon, 1989). Glover y Barrett (1987) sugieren que una reducción en las tasas de entrecruzamiento en las poblaciones introducidas puede deberse a la diferencia en la diversidad genética de ésta con respecto a la población original.

La introducción de las especies endogámicas como por ejemplo, *Avena barbata* a California y *Bromus mollis* a Australia, tuvo como resultado una reducción en el número promedio de alelos y diversidad genética en los nuevos hábitats (Clegg y Brown, 1983). Sin embargo la introducción de especies no está necesariamente asociada a una reducción en la diversidad alélica o en el número promedio de alelos por locus; un ejemplo de esto son las especies: *Trifolium hirtum* (Molina-Freaner y Jain, 1992) y *Apera spica-venti* (Warwick, 1990), ambas introducidas de un continente a otro. En *T. hirtum* se encontró que en las poblaciones introducidas las tasas de entrecruzamiento son más altas que en las originales, sugiriendo que el sistema de apareamiento es el responsable de que se encuentre una mayor

diversidad genética en las poblaciones introducidas de esta especie (Molina-Freaner y Jain, 1992). Es muy importante entonces estudiar la tasa de entrecruzamiento de las poblaciones introducidas y compararlas con las originales, ya que así se podrán sugerir hipótesis sobre la evolución de los sistemas reproductivos en las especies introducidas o colonizadoras.

La domesticación de plantas y animales, involucran cuellos de botella importantes. La introducción accidental o planeada de cultivos y malezas de un continente a otro, involucran procesos genéticos que operan durante los eventos de colonización en poblaciones silvestres (Barrett y Husband, 1989). Estas introducciones pueden tomarse como experimentos naturales, para estudiar la colonización.

Por la actividad humana intencionalmente se han transportado plantas a nuevas áreas por diversas razones y su introducción generalmente se debe a exploraciones y colonizaciones (Baker, 1974; Foy et al, 1983). Además de la introducción intencional de plantas por el hombre, existen introducciones accidentales, siendo muy comunes entre éstas malezas asociadas a cultivos (Foy et al, 1983).

Existen en la literatura varias definiciones de lo que es una maleza. Muchas de estas definiciones involucran como característica principal, la interferencia de éstas con la actividad humana (Foy et al., 1983; Perrins et al., 1992).

Baker (1965) define una maleza como una planta que crece en un área geográfica específica predominantemente perturbada por el hombre. Esta definición de maleza, incluye plantas ruderales. Este mismo autor ha enlistado 14 características que describen a una maleza ideal. Varias de estas características son características típicas de plantas pioneras, en el sentido de sucesión ecológica. Por ejemplo: adaptaciones para la dispersión a pequeñas y grandes distancias, germinación discontinua, gran latencia de las semillas, ausencia de requerimientos especiales para la germinación y polinización, rápido crecimiento de la plántula; todas ellas contribuyen al éxito para establecerse y dispersarse en un área nueva (Baker, 1974; Foy et al., 1983).

Las malezas poseen ciertas características que contribuyen a su habilidad como plantas colonizadoras (Baker, 1974; Barrett y Richardson, 1986).

El rango de atributos genéticos encontrados en las colonizadoras exitosas, sugieren que no existe un patrón único en estas especies. Lo que es claro es que una ventaja para las plantas colonizadoras son los niveles de variación genética alta, la habilidad para producir progenie, y el rápido desarrollo de fenotipos en el nuevo ambiente (Barrett y Richardson, 1986). El éxito de la colonización puede radicar en cambios genéticos simples en algunas especies, mientras que en otras están involucradas adaptaciones más complejas.

Los patrones contrastantes que se presentan en las plantas colonizadoras, aumentan la importancia de los estudios comparativos en grupos que posean características exitosas diferentes para los procesos de colonización.

La investigación de los efectos de la colonización en la estructura genética de las poblaciones, pueden proveer resultados interesantes en el significado biológico de la colonización y contribuir a determinar el potencial evolutivo de las mismas subsecuente a este proceso (Barrett y Husband, 1989).

Muchos de los procesos de colonización han ocurrido durante la colonización europea a América y a Australia (Clegg y Brown, 1983). Esto es posible de utilizar para generar hipótesis respecto a los cambios genéticos asociados a la fundación de poblaciones de plantas.

Los patrones de colonización y la escala geográfica y temporal a la que han ocurrido, podrían afectar la organización de la variación genética en poblaciones de plantas. Los modelos de colonización y migración ayudarían a predecir patrones espaciales de diferenciación genética entre poblaciones (Barrett y Husband, 1989).

En este estudio se trabajó con *Reseda luteola* L. que es una especie introducida al Valle de México. Esta especie fue introducida intencionalmente por los españoles en la época colonial con la finalidad de realizar un tinte, y al abandonar su cultivo se expandió ampliamente por el Valle de México.

Se pretenden conocer los niveles de variación genética y tasas de entrecruzamiento que presentan poblaciones introducidas y nativas, y realizar comparaciones entre ellas. Siendo una especie que se autofecunda y presenta entrecruzamiento, es muy importante estudiar la tasa de entrecruzamiento para observar si existe un patrón geográfico o si hay una relación de ésta con la diversidad genética de las poblaciones introducidas o con el proceso mismo de la colonización.



La información obtenida a partir de esta comparación, podrá proporcionar un mayor entendimiento de los eventos genéticos asociados eventos de colonización; así como las consecuencias genéticas asociadas a este proceso en la estructura genética de las poblaciones introducidas.

## OBJETIVOS.

Los objetivos de este trabajo son:

- 1) Estimar los niveles de variación genética a través de la heterocigosis, el polimorfismo y número promedio de alelos por loci, en una población nativa (España) y dos poblaciones introducidas al Valle de México, utilizando marcadores enzimáticos.
- 2) Describir la estructura genética de las tres poblaciones de *Reseda luteola* L. (estadísticos  $F$  de Wright).
- 3) Determinar las tasas de entrecruzamiento de las tres poblaciones.
- 4) Comparar las características genéticas de la población nativa y las poblaciones introducidas, para generar hipótesis acerca de las consecuencias genéticas que pudieron operar durante el proceso de colonización.

## LA ESPECIE DE ESTUDIO: *Reseda luteola* L.

El género *Reseda* pertenece a la familia Resedaceae, su nombre proviene del latín *resedare* = calmar, ya que en la antigüedad se le atribuían propiedades sedantes (Villarias-Moradillo, 1992). El género tiene cerca de 55 especies, todas nativas de Europa (Standley y Steyermark, 1946).

*Reseda luteola*, se encuentra en España, en donde germina en primavera y florece en primavera-verano (Villarias, 1992). Se le conoce en Gran Bretaña como *weld* o *dyer's rocket*; en Francia como *réséda jaunatre*; en España como *gualda*, *gabarro* o *luteolina*, en Italia como *reseda biondella*, *erba guada* y en México como *gualda* (Clason, 1989).

*Reseda luteola* L. es una hierba anual o bianual. Pertenece a la familia Resedaceae, es diploide, se han encontrado dos cariotipos:  $n=12$  y  $n=13$  (presentando este último serias anomalías meióticas) (Fernández y González, 1982).

*Reseda luteola* es glabra, erecta. Su tamaño varía entre 40 y 80 cm. Tallo simple o ramificado. Hojas sésiles, lineares o lanceoladas de 2 a 12 cm de largo y de 0.5 a 1.5 cm de ancho; enteras, a veces onduladas. Tienen racimos especiformes de 20 a 30 cm de largo; con 4 o 5 pétalos lacinados, de 2 mm de largo (los más cortos), hasta 4 o 5 mm de largo (los más grandes); de 20 a 30 estambres; ovario tricarpelar unilocular. Cápsula subglobosa, de 4 a 6 mm de diámetro abriéndose en el ápice por 3 o 4 dientes; semillas globoso-reniformes, oscuras, lisas, brillantes, de 1 mm de largo. Su raíz es típica y gruesa (Rzedowsky y Rzedowsky, 1979).

*R. luteola* produce néctar en pequeñas cantidades por flor. Este néctar puede ser recolectado por las abejas. Sin embargo es razonable pensar que las visitas de *Apis mellifera* a *R. luteola* sean fundamentalmente en busca de polen (Ortiz, 1990).

En Europa *R. luteola* se plantaba a menudo como cultivo asociado con cebada y se cultivaba como hierba tintorea. En Gran Bretaña, la demanda era tan grande que a menudo se importaba de Francia la *gualda* seca (Garland, 1989).

*R. luteola* (gualda) es uno de los colorantes conocidos más antiguos; produce un color amarillo fuerte cuando se utiliza la alúmina o el estaño como mordiente; antiguamente se utilizaba con glasto para producir verde sajón (Garland, 1989). La gualda se siembra en un suelo ligero y calizo y en una posición soleada. Las semillas permanecen fértiles durante varios años (Garland, 1989).

Fue importada a México en la época colonial para teñir de amarillo, y después de haber caído en desuso, la especie se extendió enormemente (Sánchez, 1984; Rzedowsky y Rzedowsky, 1979). Es un habitante común de las comunidades de plantas arvenses y ruderales, ocupando un sitio considerable en el Valle de México, encontrándose en altitudes entre 2250 a 3000 m (Rzedowsky y Rzedowsky, 1979).

Prospera como acompañantes de los cultivos agrícolas a la orilla de los caminos. *R. luteola* se ha llegado a establecer con éxito en México, pero no se encuentra en América Central (Standley y Steyermark, 1946).



BIBLIOTECA  
CENTRO DE ECOLOGIA

## **MATERIAL Y METODOS.**

Este trabajo se realizó utilizando la técnica de electroforesis para isozimas en geles de almidón (Stuber et al, 1988, Wendel y Weeden, 1989; Eguiarte, 1990, Pérez-Nasser, 1990) para el análisis de tres poblaciones de *R.luteola*. Dos de las poblaciones son introducidas al Valle de México, una al norte (San Cristobal, Ecatepec) y otra al sur (Ajusco), y una población de Córdoba, España.

Los sitios de colecta en el Valle de México fueron: al sur, el Parque Ecológico de la Ciudad de México, Ajusco Medio, D.F (abril de 1993) y al norte, la localidad de Las Manzanas en San Cristobal Ecatepec, Edo. de México (abril de 1993) (Figura 1a). El sitio de colecta en España se denomina los Villares (100 m de altitud), localizado en la Sierra de Córdoba, al oeste de la ciudad de Córdoba (Figura 1b); esta colecta se realizó en mayo de 1993. El sitio de colecta de España es una zona árida, cubierta por pastizal. Los nombres utilizados para denominar a las tres poblaciones son: Sur, Norte y España.

De estas poblaciones se colectó la inflorescencia de 30 individuos (familias) que fueron muestreados al azar, esto con el propósito de tener el mayor número de semillas. En el Ajusco Medio, el método de colecta fue: en un transecto de 30 metros, sistemáticamente se colectaron las semillas de la planta que se encontraba cada metro en el transecto. En la población Norte, se colectaron 30 individuos en un área de 200 mts. En la población de España, se colectaron las semillas de 32 plantas que se encontraron en un transecto de 4 kilómetros.

### **SIEMBRA.**

Con el propósito de obtener plántulas para realizar las electroforesis y estimar la variación genética, las semillas de las tres poblaciones se pusieron a germinar. De las inflorescencias de cada población se tomaron entre 20 y 30 semillas al azar. Estas fueron sembradas en tierra previamente esterilizada en una estufa a 350°C durante 24 horas. Una vez puestas las semillas en la tierra, se colocaron en el refrigerador a 0°C durante 10 días. Posteriormente se trasladaron a una cámara ambiental con una temperatura constante de 19°C. Todo esto se hizo con el fin de romper la latencia y acelerar la germinación. Una vez germinadas las semillas se pasaron a una casa de sombra para que las plántulas continuaran su crecimiento.



Figura 1a. Sitios de colecta de las poblaciones de *Reseda luteola* de México utilizadas en este estudio, donde:  
A) Norte y B) Sur.

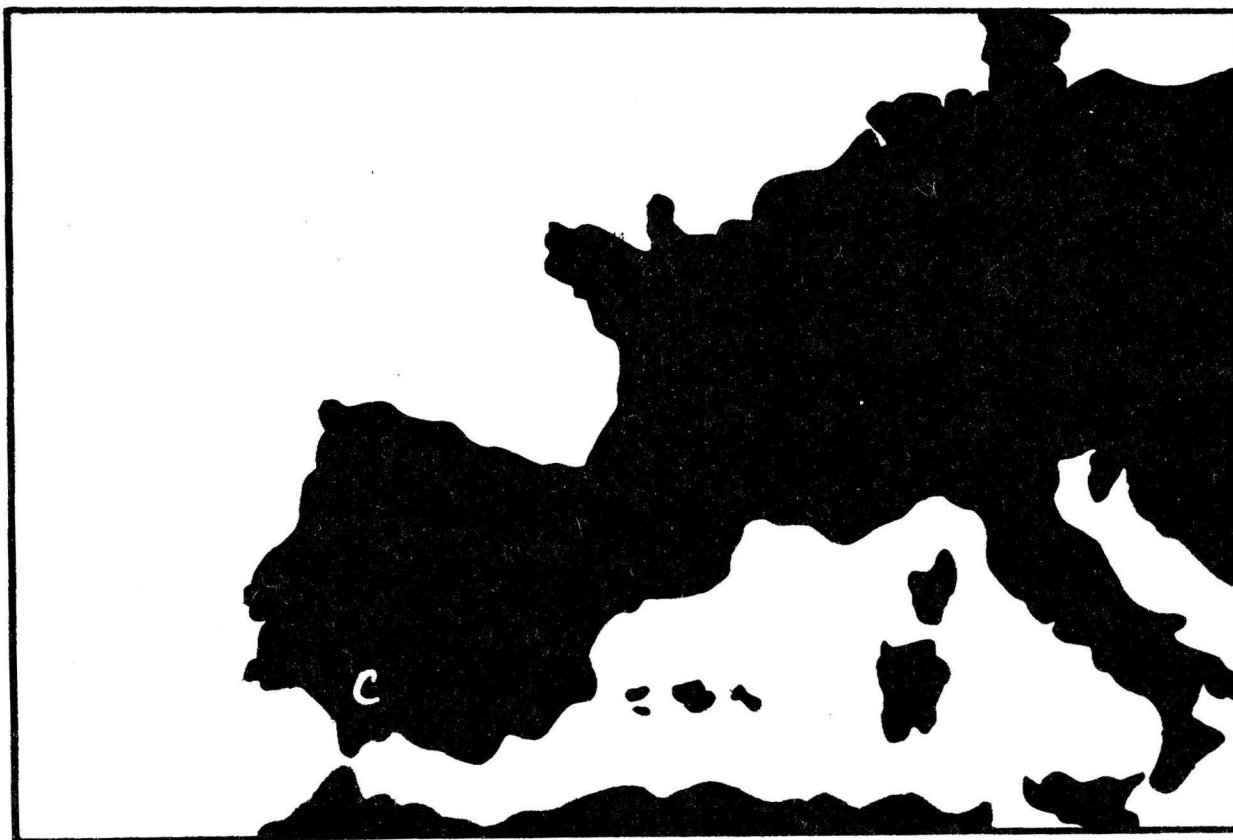


Figura 1b: Sitio de colecta de la población de *Reseda luteola* de España utilizada en este estudio, donde: C)Sierra de Córdoba.

## **PROCESADO DE MUESTRAS Y ELECTROFORESIS.**

Cuando las plántulas alcanzaron un tamaño entre 3 a 5 cm, se molieron con buffer de extracción para tejidos bajos en fenoles y compuestos secundarios (Wendel y Weeden, 1989). Las electroforesis se realizaron en geles horizontales de almidón al 10% (peso/volumen) en dos sistemas distintos: Litio (pH=8) e Histidina (pH=6.5), ambos sistemas continuos. Se ensayaron un total de 26 enzimas, de las cuales por su actividad se eligieron 7. En el apéndice I se presenta la descripción del método seguido para realizar las electroforesis (Stuber *et al.*, 1988; Wendel y Weeden, 1989; Eguiarte, 1990; Pérez-Nasser, 1990), así como las recetas de los buffers utilizados y de las soluciones de tinción para cada una de las enzimas ensayadas. Los geles fueron fijados en alcohol etílico al 50% durante 24 horas en el refrigerador.

Para la interpretación de los geles se asignó el número 1 al loci que tuvo una migración anódica mayor, el número 2 al siguiente por debajo del primero y así sucesivamente. Lo mismo se utilizó en la designación de los alelos.

## **ANALISIS DE DATOS.**

### **Variación genética.**

Para estimar la variación genética y la tasa de entrecruzamiento, se utilizaron 330 individuos de 78 familias (inflorescencias) diferentes para las tres poblaciones. El tamaño de muestra para cada población fue: 28 familias, 135 individuos para la población Norte; 25 familias, 109 individuos para la población Sur y 25 familias, 86 individuos para la población de España. A partir de los genotipos obtenidos de las electroforesis se inferieron los genotipos maternos con el programa MLT de Ritland (1983), siguiendo el método de Brown y Allard (1970), de esta manera se realizaron comparaciones entre los genotipos maternos inferidos y los genotipos de la progenie obtenidos directamente de las electroforesis. Hay que tomar en cuenta que los genotipos maternos, no son independientes de los genotipos de la progenie y que los resultados de las comparaciones entre ambos pueden ser producto de los errores al inferir los genotipos maternos por el tamaño de la muestra.

En la estimación de la variación genética para los genotipos de la progenie como de las madres se utilizaron varios índices:



### 1) Proporción de loci polimórficos ( $P$ ).

Este índice toma valores entre 0 y 1. Si es cero no existe variación genética. Entre mayor sea el valor de la variación genética el índice es más alto. Cuando el valor es 1, todos los loci analizados son polimórficos.

Un locus se puede considerar polimórfico, si el alelo más común no excede el 95% en la población; otros criterios se pueden tomar en cuenta para considerar un loci polimórfico, por ejemplo que el alelo más común no exceda el 99% de la población (Hedrick, 1983).

Se obtiene mediante la fórmula:

$$P = x/m$$

donde  $x$  es el número de loci polimórficos en una muestra  $m$  de loci.

### 2) Heterocigosis promedio esperada ( $H$ ).

Este índice se obtiene a partir del promedio de la heterocigosis esperada en el equilibrio de Hardy-Weinberg para todos los loci estudiados en la población.

Para un locus dado se puede estimar como:

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

donde  $p_i$  es cada una de las frecuencias alélicas para ese locus (Hedrick, 1983; Hartl y Clark, 1989).

### 3) Número promedio de alelos por locus.

Es simplemente el promedio aritmético de alelos por locus.

### 4) Frecuencias alélicas.

Se calcularon las frecuencias alélicas para cada locus, para cada población (Hedrick, 1983).

$$p = \frac{(a_{11} + \frac{1}{2}a_{12})}{N}$$

$$q = \frac{(\frac{1}{2}a_{12} + a_{22})}{N}$$

Donde  $a_{11}$  son los genotipos 11,  $a_{12}$  son los genotipos 12,  $a_{22}$  son los genotipos 22 y  $N$  es el total de la muestra ( todos los genotipos :  $a_{11} + a_{12} + a_{22}$  ).

Se realizó un análisis de contingencia de las poblaciones para obtener la heterogeneidad de las frecuencias alélicas de cada locus (Workman y Niswander, 1970) y así poderlas comparar entre ellas.

### 5) Índice de fijación ( $F$ ).

El índice de fijación  $F$ , propuesto por Wright en 1951 (Hedrick, 1983) se define como:

$$F = 1 - (H \text{ obs} / H \text{ esp}).$$

Este índice toma valores de -1 a +1. Tiene un valor de cero si la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, de -1 si existen exclusivamente individuos heterocigos y de +1 si sólo se presentan individuos homocigos (Hedrick, 1983; Hartl y Clark, 1989).

Se calcularon los índices  $F$  para cada locus de cada población, de los cuales se obtuvo una media para cada población. Los errores estándar asociados a la media, se calcularon con un método de remuestreo de jackknife (Weir, 1990).

## 6) Estadísticos $F$ de Wright.

El índice de fijación  $F$  se puede partir a varios niveles geográficos, lo que genera los estadísticos  $F$ 's:  $F_{is}$ ,  $F_{it}$ ,  $F_{st}$  (Eguiarte, 1990).

a)  $F_{is}$  ( $F$  individuo-subpoblación) es la diferenciación a nivel local. Toma valores de -1 a +1. Se expresa como:

$$F_{is} = (H_s - H_o) / H_s$$

donde  $H_o$  es la proporción de heterócigos observados promedio dentro de una subpoblación y  $H_s$  es la proporción de heterócigos esperada promedio a nivel de subpoblación (Hartl y Clark, 1989).

b)  $F_{it}$  ( $F$  individuo-total) mide la diferenciación total debida tanto a la endogamia como a la deriva génica. Se puede obtener:

$$F_{it} = (H_t - H_o) / H_t$$

Puede tomar valores entre -1 a +1 (Hartl y Clark, 1989).

c)  $F_{st}$  ( $F$  subpoblación-total) es la diferenciación entre poblaciones. Toma valores entre 0 y 1 y se puede obtener:

$$F_{st} = (H_t - H_s) / H_t$$

donde  $H_s$  es la proporción de heterócigos esperada promedio a nivel subpoblación y  $H_t$  es la proporción de heterócigos esperada promedio a nivel global (Hartl y Clark, 1989). Su valor es cero si todas las subpoblaciones son idénticas entre sí en términos de variación genética, mientras que toma valores de 1 si son completamente diferentes entre sí, es decir que no comparten ningún alelo.

Los estadísticos  $F$  funcionan como descriptores de la variación genética y por otro lado sugieren cuáles serían las fuerzas evolutivas que han estado operando en una población dada. Si la  $F_{is}$  es positiva señala que en la población existe un exceso de homócigos en relación a los esperados si se cumplieran los supuestos de Hardy-Weinberg, y que posiblemente la endogamia ha sido importante. Si la  $F_{is}$  es negativa indica que hay menos homócigos de los esperados y sugiere que podría existir selección a favor de los heterócigos (Linhart et al., 1981).

A partir del índice  $F_{st}$  se estimó  $Nm$  (que es un estimador del flujo génico), con la fórmula de Crow y Aoki (1984):

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

donde  $\alpha = (n/n-1)^2$  y  $n$  es el número de subpoblaciones.

Para evaluar la probabilidad de que  $F$ ,  $F_{is}$  y  $F_{it}$  fueran distintas de cero, se utilizó una chi-cuadrada =  $F^2 N (k-1)$ , para  $k(k-1)/2$  grados de libertad, donde  $N$  es el tamaño de la muestra y  $k$  el número de alelos (Li y Horvitz, 1953). La chi-cuadrada de  $F_{st} = 2 N F_{st} (k-1)$  con  $(k-1)(s-1)$  grados de libertad, donde  $N$  es el tamaño de muestra,  $k$  el número de alelos y  $s$  el número de subpoblaciones (Workman y Niswander, 1970).

El error estándar asociado al promedio de  $F_{st}$  para las madres y la progenie, se estimaron por el método de jackknife (Weir, 1990).

## 7) Distancias e identidades genéticas.

Las identidades genéticas se calcularon con la fórmula de Nei (1972):

$$I = J_{xy} / (J_x J_y)^{1/2}$$

donde  $J_{xy}$  es la probabilidad de escoger un par de alelos idénticos, uno de la población  $x$  y otro de la población  $y$ , entonces  $J_{xy} = \sum p_i^x * p_i^y$ .  $J_x$  y  $J_y$  son las probabilidades de escoger un par idéntico dentro de cada población,  $J_x = \sum p_i^2 x$  y  $J_y = \sum p_i^2 y$  (Hedrick, 1983). La identidad genética ( $I$ ) toma valores de 0 (si no comparten alelos) a 1 (si las poblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas) (Hedrick, 1983).

A partir de las identidades se puede obtener la distancia genética  $D$  de Nei (1972):

$$D = - \ln I$$

Las distancias genéticas ( $D$ ) toman valores de 0 (si las poblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas) a infinito (si no comparten alelos) (Hedrick, 1983).

## Tasas de entrecruzamiento.

Las tasas de entrecruzamiento multiloci, para cada locus y por familia de cada población se estimaron con el programa MLT de Ritland, basado en el método de Ritland y Jain (1981). Para la estimación de la  $t$  multiloci se utilizaron 28 familias y 135 individuos, para la población Norte; 25 familias y 109 individuos para la población Sur y 25 familias y 86 individuos para la población España. El número promedio de hijos por familia fue para la población Norte 4.8214, para la población Sur 4.36 y para España 3.3076. Con este programa también se infirieron los genotipos maternos por el método de Brown y Allard (1970); con tamaños pequeños de familia este método tiene un sesgo, de manera que asigna el genotipo más frecuente en la población al genotipo materno (Ritland, 1983). El error estándar se obtuvo con el método de bootstraps, usando 1000 iteraciones, para la  $t$  multiloci, y 100 iteraciones para las  $t$  por locus.

Al calcular la tasa de entrecruzamiento multiloci ( $tm$ ) el programa estima un promedio ponderado de la tasa de entrecruzamiento por locus ( $ts$ ), y con estas medidas se obtiene una diferencia ( $tm-ts$ ) con un error estándar asociado, con el que se puede saber si la diferencia es distinta estadísticamente de cero. Esta diferencia ( $tm-ts$ ) puede ser una buena medida de la endogamia, sugiriendo cuando es estadísticamente diferente de cero, que existen procesos de endogamia biparental. Para las poblaciones de *Reseda luteola*, se obtuvo esta diferencia y a partir de su error estándar (basado en un método de bootstraps, usando 1000 iteraciones) y se pudo observar si era diferente estadísticamente de cero.

Para observar si las  $t$  multiloci para cada población son diferentes de 0 y 1, a partir del error estándar se obtuvieron los intervalos de confianza al 95% (error estándar \* 1.96, se multiplica por esto para tener el 95% del tamaño de la muestra hacia un lado y otro de la media) (Sokal y Rohlf, 1981).

Las tasas de entrecruzamiento en equilibrio, por locus para cada población, se obtuvieron a partir de los índices de fijación  $F$  obtenidos para cada locus en las diferentes poblaciones. La fórmula utilizada fue (Hedrick, 1983):

$$t \text{ eq} = 1 - F / 1 + F$$

## **RESULTADOS.**

Se ensayaron un total de 26 enzimas (ver apéndice) de las cuales por su actividad se eligieron siete. De las siete enzimas elegidas, se registraron un total de 12 loci, de los cuales 8 fueron polimórficos usando el criterio de que la frecuencia del alelo más común no exceda el 95%. Esto se observó para las tres poblaciones (Tabla 1).

Para las enzimas glutamato oxaloacetato transaminasa (GOT), peroxidasa anódica (APX) y diaforasa (DIA), el sistema donde se obtuvo una mejor resolución fue el de litio pH 8.0; y para las enzimas isocitrato deshidrogenasa (IDH), superóxido dismutasa (SOD), malato deshidrogenasa (MDH) y fosfoglucomutasa (PGM) la mejor resolución se tuvo con el sistema Histidina pH 6.5. Los patrones de bandeo que presentaron los loci se muestran en la figura 2.

Las electroforesis se realizaron para 135 individuos de 28 familias de la población Norte, para 109 individuos de 25 familias de la población Sur y para 86 individuos de 25 familias de la población de España.

### **Variación genética.**

De los ocho loci polimórficos encontrados, solamente en siete se observaron dos alelos, excepto para el locus GOT-1, el cual presentó tres alelos (Figura 2b).

Respecto a las frecuencias alélicas parecen ser más similares para las tres poblaciones en las madres que en la progenie. Se observó para la progenie que para los loci: GOT-1, GOT-2, APX, DIA, IDH, PGM-2 y MDH existe una heterogeneidad en las frecuencias alélicas (Tabla 2). En cuanto a las madres se observó que existe únicamente heterogeneidad en las frecuencias alélicas para tres de los loci GOT-1, APX y MDH (Tabla 2).

Si comparamos la heterogeneidad de las frecuencias alélicas entre madres e hijos; se observa que los loci GOT-1, APX y MDH para los cuales las madres presentan una cierta heterogeneidad, también presentan heterogeneidad en la progenie (Tabla 2).

Al comparar la heterogeneidad de las frecuencias alélicas por pares de poblaciones para la progenie, se observa que la chi-cuadrada es mayor para el Norte y España (69.461) y menor para España y el Sur (39.648) y para el Norte y Sur es 63.329, siendo en todos los casos significativa (Tabla 3). Esto sugiere que no hay algún patrón geográfico en las poblaciones, en cuanto a las frecuencias alélicas.

La progenie de *R.luteola* tiene un polimorfismo al 95% (P) de 0.667 para las tres poblaciones, mientras que para las madres fue de 0.636 (Tabla 4). El número promedio de alelos por locus para la progenie fue igual en las tres poblaciones (1.8) (Tabla 4), el de las madres fue igual para las poblaciones Norte y España (1.7) y para la población Sur fue de 1.6 (Tabla 4). El número promedio de alelos por locus fue mayor para la progenie que para las madres, pero esta diferencia no es estadísticamente significativa (Tabla 4). La heterocigosis promedio observada en la progenie fue mayor para la población Norte (0.222) y menor en la población España (0.163). En las madres la heterocigosis promedio observada fue mayor para la población Norte (0.438) y menor para la población Sur (0.396). Al comparar la heterocigosis promedio observada en las madres y la progenie, fue mayor para las tres poblaciones en las madres que en la progenie, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (Tabla 4).

Para la progenie la heterocigosis promedio esperada fue para la población Norte 0.319, para la población Sur 0.0298 y para la población España 0.303, esta diferencia no es estadísticamente significativa (Tabla 4). Para los genotipos maternos la heterocigosis promedio esperada difiere para las tres poblaciones, pero al igual que para la progenie ésta diferencia no es significativa. Si se comparan las heterocigosis promedio esperadas para las madres y la progenie, se observa que es mayor para la progenie, pero esta diferencia no es significativa estadísticamente (Tabla 4).

### **Indices de fijación $F$ .**

Para la progenie, los índices de fijación  $F$  fueron en sólo 4 (IDH, Norte y Sur; APX, España y MDH, Sur) de 25 casos negativos, y sólo uno de estos fue significativamente negativo (IDH, Norte) (Tabla 5). En los 21 casos restantes, los índices de fijación  $F$  fueron positivos, siendo en 16 casos positivos significativamente (Tabla 5). La media del índice de fijación para la progenie fue mayor para la población España (0.4651) y menor para la población Norte (0.2943). Con la media del índice de fijación y el error estándar se observa que éstos son diferentes estadísticamente de cero, en las tres poblaciones. Las diferencias en los índices de fijación para las tres poblaciones muestran el Norte y Sur no son diferentes



estadísticamente, mientras que España sí lo es con respecto a las otras dos poblaciones (Tabla 5).

Para las madres, en los 21 casos, la  $F$  fue negativa y lo fue significativamente en 15 casos (Tabla 6). La media del índice de fijación para las madres fue más negativo para la población Norte (-0.4583) y menor para la población Sur (-0.4066) (Tabla 6). Con el error estándar de la media se observa que en las tres poblaciones, el índice de fijación es estadísticamente diferente de cero. El error estándar asociado a la media, muestra que estas diferencias entre las poblaciones España y Sur y, España y Norte no son significativas, mientras que la diferencia entre las poblaciones Norte y Sur si es significativa estadísticamente (Tabla 6).

Se observa que la media de los índices de fijación para las madres en las tres poblaciones son negativos, mientras que para la progenie en las tres poblaciones son positivos, y que esta diferencia entre madres y progenie es estadísticamente significativa (Tabla 5 y 6). Esto sugiere que podrían existir procesos de selección a favor del heterócigo, depresión por endogamia o desequilibrio gamético que provoquen la diferenciación que se observa entre las madres y la progenie. Es importante notar que la diferenciación que se está dando sucede en un tiempo muy corto, ya que esta especie es una planta anual o bianual.

También es importante resaltar el hecho de que los genotipos maternos se infirieron de los genotipos de la progenie, y que con valores bajos de número de hijos promedio por familia, existe un sesgo al inferir los genotipos. El método utilizado (Brown y Allard, 1970) requiere que el tamaño de cada familia (número de hijos por madre) sea grande, para distinguir entre patrones alternativos de segregación de cada genotipo materno posible. El patrón de segregación de cada genotipo materno depende de la tasa de entrecruzamiento, las frecuencias genicas del polen y la solución a las ecuaciones de verosimilitud para estimar la tasa de entrecruzamiento y a su vez las frecuencias genicas dependen de la inferencia de los genotipos maternos, convirtiéndose en un proceso iterativo. Hay que tomar en cuenta lo anterior, ya que podría estar ocurriendo que en este caso, se tuviera un problema en la inferencia de los genotipos maternos, por el tamaño de muestra utilizado y que las diferencias que se están observando no sean reales.

## Estadísticos $F$ de Wright.

En la tabla 7 se presentan los valores de  $F_{is}$  y  $F_{it}$  para la progenie, siendo negativos únicamente para la enzima  $Idh$  ( $F_{is} = -0.114$  y  $F_{it} = -0.098$ ), y significativo sólo para el caso de  $F_{is}$ ; mientras que para todos los demás loci fueron positivos, siendo significativos para  $F_{is}$  en ocho loci (GOT-1, GOT-2, DIA, IDH, SOD, PGM-1, PGM-2 y MDH) y para  $F_{it}$  en ocho loci (GOT-1, GOT-2, APX, DIA, SOD, PGM-1, PGM-2 y MDH). Para la progenie,  $F_{st}$  fue significativo para los siguientes loci: GOT-2, APX, DIA, IDH, PGM-2 y MDH (Tabla 7).

Al calcular  $F_{st}$  entre pares de poblaciones para la progenie, se observa que todos son significativos y que el mayor valor es entre Norte y España (0.025) y el menor entre Sur y España (0.014) (Tabla 8). El error estándar (calculado con el método de remuestreo de jackknife) asociado a el valor de  $F_{st}$ , muestra que para Sur y España y, Norte y Sur los valores encontrados no son diferentes estadísticamente. Mientras que el valor de  $F_{st}$  para Norte y España, muestra que éste es diferente estadísticamente respecto al de Sur y España y Norte y Sur (Tabla 8). Lo anterior indica que la diferenciación genética es mayor entre las poblaciones Norte y España, lo que podría sugerir que la introducción mayor o principal fue a la población Sur (por ser más parecida a España) y que la población Norte es una submuestra de ésta, aunque los valores de  $F_{st}$  son pequeños como para asegurar algo así.

Los valores de  $F_{is}$  y  $F_{it}$  para las madres  $F_{is}$  y  $F_{it}$  son para todos los loci significativamente negativos. En cuanto a  $F_{st}$  sólo lo es para los loci APX y MDH (Tabla 9).

En las madres y en las progenes, los valores de  $F_{is}$  en todos los loci son mayores que los de  $F_{st}$ .  $F_{st}$  no es muy grande para todos los loci, indicando que la diferenciación genética que existe no se generó por deriva génica (Eguiarte, 1990).

$F_{st}$  promedio es mayor para las madres (0.039) que para la progenie (0.02311). Con el error estándar asociado a este promedio, obtenido con un método de jackknife (Weir, 1990), se observa que  $F_{st}$  para la progenie y las madres son diferentes estadísticamente (Tablas 7 y 9), indicando que la diferenciación que existe entre las poblaciones es mayor en las madres que en la progenie.

En las tablas 7 y 9 se muestran los estimados para la  $N_m$  utilizando la fórmula de Crow y Aoki (1984). La  $N_m$  promedio para las madres (6.808) es menor al de la progenie (10.307). Si se comparan con valores reportados en la literatura para especies con sistema mixto de apareamiento y polinización por animales (0.161) (Hamrick, 1987), se observa que los valores de *Reseda luteola* son mucho mayores, encontrándose mucho más cercanos a especies con una polinización por viento, como por ejemplo *Pseudotsuga menziesii* en donde el  $N_m$  reportado es 5.3 o en *Pinus rigida* en donde se encontró un  $N_m$  de 17.2 (Hamrick, 1987).

### **Distancias e identidades genéticas.**

En la progenie, se observa que la mayor identidad genética de Nei (1972) es entre las poblaciones Sur y España (0.98597) y la menor es entre las poblaciones Norte y España (0.9732) (Tabla 10). El valor promedio de la identidad genética para la progenie es 0.98019.

Al igual que con los genotipos de la progenie, se observa que la mayor identidad genética de Nei (1972) para las madres es entre las poblaciones Sur y España (0.96955) y la menor entre las poblaciones Norte y España (0.83489) (Tabla 11). La identidad promedio para los genotipos maternos es de 0.91827.

Se puede decir que las distancias e identidades no varían mucho entre las poblaciones, teniendo para la progenie y las madres en las identidades valores mayores a 0.83489, mientras que para las distancias se presentan siempre valores no mayores a 0.05 (Tablas 10 y 11).

Si comparamos las distancias e identidades de madres e hijos, se observan las mismas relaciones entre las poblaciones, pero al comparar la identidad genética promedio, se observa que es mayor para la progenie que para las madres, apoyando la idea de que en los genotipos maternos existe una diferenciación genética mayor que en la progenie.

### **Tasas de entrecruzamiento.**

Las tasas de entrecruzamiento por locus por población, tienen un rango muy amplio en los valores obtenidos. El rango de valores de  $t$  por locus varía entre 0.001 (DIA, población Sur y España) a 0.957 (MDH, población Sur) (Tabla 12).

La  $t$  en equilibrio (por endogamia) por locus varía entre 0.0198 (PGM-2, población Norte) a 1.2857 (MDH, población Sur). La media de la  $t$  en equilibrio no es estadísticamente diferente entre poblaciones. Para las tres poblaciones se observa que la media de la  $t$  en equilibrio es mayor a la media de la  $t$  observada (Tabla 12).

Al comparar la tasa de entrecruzamiento multiloci con la media de la  $t$  en equilibrio, se observa que son diferentes para las tres poblaciones. Sin embargo el error estándar asociado a la media de la  $t$  en equilibrio, muestran que para la población Norte, la diferencia es estadísticamente significativa, mientras que para las otras dos poblaciones la diferencia no es estadísticamente significativa. Se podría decir que la población Norte no se encuentra en el equilibrio, mientras que las poblaciones Sur y España, si lo están (Tabla 12).

Al comparar la tasa de entrecruzamiento por familia para cada población, se observa que la distribución varía entre poblaciones (Figura 3). Para la población Norte la mayor parte de las familias se encuentran en el rango de 0.7 a 0.8 (sugiriendo una gran cantidad de entrecruzamiento) (Figura 3a). Para la población Sur y España la frecuencia alta de familias está entre 0 y 0.1 (sugiriendo mucha autofecundación) (Figura 3b y 3c).

Al analizar las tres poblaciones juntas, se ve que la frecuencia más alta está en el rango de 0 a 0.1 y la menor en los rangos 0.1 a 0.2 y 0.2 a 0.3. Los rangos de 0.3 a 1 muestran frecuencias muy parecidas y al juntarse se observa que su frecuencia es mucho mayor a la que muestra el rango de 0 a 0.1 (Figura 3d). Al observar la frecuencia de la tasa de entrecruzamiento por familia para las tres poblaciones (Figura 3d), lo que se sugiere es que existe una enorme variación en la tasa de entrecruzamiento y que la predicción del modelo de Schemske y Lande (1985) de la evolución del sistema reproductivo hacia la autofecundación o al entrecruzamiento; en este caso no se está cumpliendo, ya que según estos autores por ser una hierba se esperaba que estuviera evolucionando a la autofecundación y lo que se observa es que se tiene un sistema mixto de apareamiento.

La relación entre el índice de fijación  $F$  y la tasa de entrecruzamiento por loci por población, muestra que para algunos loci la tasa de entrecruzamiento observada es mayor a la  $t$  en el equilibrio y para otros es menor, sugiriendo que para algunos loci, se tiene un exceso de heterocigos y para otros un exceso de homocigos (Figura 4). Para la población Norte los loci APX, GOT-1, DIA y PGM-2 no muestran una diferencia estadística con respecto a lo esperado en el equilibrio ( $t$  en equilibrio) y los tres loci restantes (MDH, SOD y PGM-1) se encuentran por debajo de la curva, indicando que para estos loci existe un número mayor de heterocigos de los que se esperarían por su sistema reproductivo (Figura

4a). Para la población Sur únicamente el locus PGM-2 se encuentra en el equilibrio, los loci MDH, PGM-1, GOT-1 y DIA se encuentran con un exceso de heterocigos respecto a lo esperado, mientras que los loci APX y SOD muestran un exceso de homocigos respecto a lo que se esperaría por su sistema reproductivo ( $t$  por locus) (Figura 4b). Para la población España los loci SOD, PGM-1, GOT-1, PGM-2 y DIA se encuentran en lo esperado, mientras que los loci APX y MDH muestran un exceso de heterocigos (Figura 4c). Se observa que la población España es la que muestra un mayor número de loci (5) que se encuentran en el equilibrio, mientras que la población Sur es la que tiene un número menor de loci (2) en el equilibrio (Figura 4). Se puede ver que la población que tiene un número mayor de loci con un exceso de homocigos respecto a lo esperado por el equilibrio es el Sur (4 loci), mientras que las otras dos poblaciones tienen 3 loci con un aumento de heterocigos (Figura 4).

La diferencia que existe entre la  $t$  multiloci y la tasa de entrecruzamiento por loci ( $t_s$  es un promedio ponderado de las tasas de entrecruzamiento para cada locus, que calcula el programa MLT al calcular la tasa multiloci de entrecruzamiento), obtenida con el programa MLT de Ritland (1983) y el error estándar asociado (basado en un método de bootstraps, usando 1000 iteraciones) fue para las diferentes poblaciones: Norte 0.101 (0.043), Sur 0.085 (0.037) y España 0.115 (0.022). Los errores estándar de estas diferencias ( $t_m - t_s$ ) muestran que es estadísticamente diferente de cero, lo cual puede sugerir que existe endogamia biparental (ambos padres están relacionados), que estaría explicando los índices de fijación  $F$  positivos para la progenie.

Las tasas de entrecruzamiento multiloci fueron diferentes para cada población. El intervalo de confianza al 95% sugiere que la  $t$  multiloci para cada una de las tres poblaciones son significativamente distintas de 0 y de 1, pero iguales entre sí (Figura 5). Lo que sugieren las tasas de entrecruzamiento multiloci es que *Reseda luteola* tiene un sistema de entrecruzamiento mixto, sin predominar la autofecundación o el entrecruzamiento, aunque por las diferencias encontradas en la tasa de entrecruzamiento por familia se podría pensar que puede existir una subestructura de las poblaciones.

Tabla 1. Sistemas enzimáticos ensayados en *Reseda luteola*. Las letras C y D representan el buffer de Litio e Histidina respectivamente.

| ENZIMA   | ESTRUCTURA CUATERNARIA | SISTEMA BUFFER | NUMERO DE LOCI | NUMERO DE LOCI POLIMORFICOS |
|--|------------------------|----------------|----------------|-----------------------------|
| APX  | Monómero               | C              | 1              | 1                           |
| DIA  | Monómero               | C              | 1              | 1                           |
| GOT  | Dímero                 | C              | 3              | 1                           |
| IDH  | Dímero                 | D              | 1              | 1                           |
| MDH  | Dímero                 | D              | 1              | 1                           |
| PGM  | Monómero               | D              | 4              | 2                           |
| SOD  | Monómero               | D              | 1              | 1                           |
| SUMATORIA  |                        |                | 12             | 8                           |
| APX: Peroxidasa (E.C.1.11.1.7)                         |                        |                |                |                             |
| DIA: Diaforasa (E.C.1.6.99)                            |                        |                |                |                             |
| GOT: Glutamato oxaloacetato transaminasa (E.C.2.6.1.1) |                        |                |                |                             |
| IDH: Isocitrato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.41)          |                        |                |                |                             |
| MDH: Malato deshidrogenasa (E.C.1.1.1.37)              |                        |                |                |                             |
| PGM: Fosfoglucomutasa (E.C.5.4.2.2)                    |                        |                |                |                             |
| SOD: Superóxido dismutasa (E.C.1.15.1.1)               |                        |                |                |                             |

Tabla 2. Frecuencias alélicas para la progenie y las madres (genotipos inferidos con MLT, Ritland y Jain, 1981) y pruebas de heterogeneidad (Workman y Niswander, 1970) para las frecuencias alélicas de las poblaciones de *Reseda luteola* en España y México. Los valores de la progenie se encuentran antes de la diagonal y los de las madres después de la diagonal. Cuando solo se presenta un valor, es el de la progenie (loci monomórficos).

| Locus | Norte       | Sur         | España      | Chi-cuadrada | P            |
|-------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| GOT-1 |             |             |             |              |              |
| (N)   | 130/28      | 105/25      | 68/25       |              |              |
| 1     | 0.173/0.018 | 0.076/0.000 | 0.118/0.100 |              |              |
| 2     | 0.635/0.732 | 0.657/0.660 | 0.632/0.740 |              |              |
| 3     | 0.192/0.250 | 0.267/0.340 | 0.250/0.160 | 11.87/10.981 | .018*/0.026* |
| GOT-2 |             |             |             |              |              |
| (N)   | 134         | 101         | 69          |              |              |
| 1     | 0.000       | 0.000       | 0.022       |              |              |
| 2     | 1.000       | 1.000       | 0.978       | 10.268       | 0.00589*     |
| GOT-3 |             |             |             |              |              |
| (N)   | 134         | 108         | 75          |              |              |
| 1     | 1.000       | 1.000       | 1.000       | 0.000        | 1.000        |
| APX   |             |             |             |              |              |
| (N)   | 133/28      | 105/25      | 60/25       |              |              |
| 1     | 0.519/0.464 | 0.376/0.22  | 0.375/0.340 |              |              |
| 2     | 0.481/0.536 | 0.624/0.78  | 0.625/0.660 | 12.233/6.977 | .002*/.0305* |

| Cont.<br>Locus<br>DIA | Norte       | Sur         | España      | Chi-cuadrada | P            |
|-----------------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|
| (N)                   | 120/28      | 104/25      | 67/25       |              |              |
| 1                     | 0.542/0.554 | 0.428/0.420 | 0.627/0.58  |              |              |
| 2                     | 0.458/0.446 | 0.572/0.580 | 0.373/0.42  | 13.654/2.976 | .0010*/.2257 |
| IDH                   |             |             |             |              |              |
| (N)                   | 131         | 104         | 62          |              |              |
| 1                     | 0.725       | 0.779       | 0.847       |              |              |
| 2                     | 0.275       | 0.221       | 0.153       | 7.174        | 0.02768*     |
| SOD                   |             |             |             |              |              |
| (N)                   | 135/28      | 104/25      | 61/25       |              |              |
| 1                     | 0.456/0.446 | 0.389/0.360 | 0.467/0.480 |              |              |
| 2                     | 0.544/0.554 | 0.611/0.640 | 0.467/0.520 | 2.737/1.572  | 0.254/0.2257 |
| PGM-1                 |             |             |             |              |              |
| (N)                   | 131/28      | 105/25      | 68/25       |              |              |
| 1                     | 0.363/0.411 | 0.314/0.360 | 0.404/0.320 |              |              |
| 2                     | 0.637/0.589 | 0.689/0.640 | 0.596/0.680 | 3.035/0.947  | 0.2192/0.455 |
| PGM-2                 |             |             |             |              |              |
| (N)                   | 115/28      | 103/25      | 62/25       |              |              |
| 1                     | 0.661/0.661 | 0.714/0.620 | 0.54/0.48   |              |              |
| 2                     | 0.339/0.339 | 0.286/0.38  | 0.46/0.52   | 10.356/3.844 | 0.005*/0.622 |



| Cont.<br>Locus<br>PGM-3 | Norte       | Sur       | España     | Chi-cuadrada  | P           |
|-------------------------|-------------|-----------|------------|---------------|-------------|
| (N)                     | 135         | 107       | 73         |               |             |
| 1                       | 1.000       | 1.000     | 1.000      | 0.000         | 1.000       |
| PGM-4                   |             |           |            |               |             |
| (N)                     | 135         | 107       | 73         |               |             |
| 1                       | 1.000       | 1.000     | 1.000      | 0.000         | 1.000       |
| MDH                     |             |           |            |               |             |
| (N)                     | 132/28      | 103/25    | 54/25      |               |             |
| 1                       | 0.405/0.393 | 0.66/0.70 | 0.759/0.84 |               |             |
| 2                       | 0.595/.607  | 0.34/0.30 | 0.241/0.16 | 51.482/24.133 | 0.00*/0.00* |

Tabla 3. Valores de chi-cuadrada de las pruebas de heterogeneidad para las frecuencias alélicas (Workman y Niswander, 1970) entre las poblaciones de *Reseda luteola* en España y México.

| Población | 1. Norte | 2. Sur  | 3. España |
|-----------|----------|---------|-----------|
| 1. Norte  | -----    | 63.329* | 69.461*   |
| 2. Sur    |          | -----   | 39.648*   |
| 3. España |          |         | -----     |

\* P < 0.000

Tabla 4. Variabilidad genética de la progenie y de las madres en tres poblaciones de *Reseda luteola* en España y México (errores estándar entre paréntesis).

| Población | No.promedio de alelos por locus |              | % de loci polimórficos <sup>1</sup> |        | Heterocigosis observada |                  | promedio esperada ** |                  |
|-----------|---------------------------------|--------------|-------------------------------------|--------|-------------------------|------------------|----------------------|------------------|
|           | Progenie                        | Madres       | Progenie                            | Madres | Progenie                | Madres           | Progenie             | Madres           |
| 1. Norte  | 1.8<br>(0.2)                    | 1.7<br>(0.2) | 66.7                                | 63.6   | 0.222<br>(0.062)        | 0.438<br>(0.107) | 0.319<br>(0.069)     | 0.305<br>(0.073) |
| 2. Sur    | 1.8<br>(0.2)                    | 1.6<br>(0.2) | 66.7                                | 63.6   | 0.199<br>(0.053)        | 0.396<br>(0.097) | 0.298<br>(0.065)     | 0.287<br>(0.070) |
| 3. España | 1.8<br>(0.2)                    | 1.7<br>(0.2) | 66.7                                | 63.6   | 0.163<br>(0.049)        | 0.407<br>(0.107) | 0.303<br>(0.066)     | 0.283<br>(0.070) |

1. Un locus es considerado polimórfico si la frecuencia del alelo más común no excede 0.95

Tabla 5. Índices de fijación  $F$  para la progenie en tres poblaciones de *R. luteola* en España y México. Errores estándar entre paréntesis, obtenidos con la prueba de jackknife (Weir, 1990).

| Locus    | P O B L A C I O N   |                     |                     |
|----------|---------------------|---------------------|---------------------|
|          | Norte               | Sur                 | España              |
| GOT-1    | 0.347*              | 0.670*              | 0.663*              |
| GOT-2    |                     |                     | 0.659*              |
| APX-1    | 0.127               | 0.209*              | -0.031              |
| DIA-1    | 0.765*              | 0.666*              | 0.809*              |
| IDH-1    | -0.264*             | -0.172              | 0.192               |
| SOD-1    | 0.119               | 0.211*              | 0.045               |
| PGM-1    | 0.290*              | 0.293*              | 0.481*              |
| PGM-2    | 0.961*              | 0.739*              | 0.773*              |
| MDH-1    | 0.010               | -0.125              | 0.595*              |
| Promedio | 0.2943<br>(0.05345) | 0.3113<br>(0.04743) | 0.4651<br>(0.03736) |

Chi-cuadrada: \*  $P < 0.05$

Tabla 6. Índices de fijación F para las madres (genotipos inferidos con el programa MLT, basado en el método de Ritland y Jain (1981) en tres poblaciones de *Reseda luteola* en España y México. Errores estándar entre paréntesis, obtenidos con la prueba de jackknife (Weir, 1990).

| Locus    | P O B L A C I O N   |                     |                     |
|----------|---------------------|---------------------|---------------------|
|          | Norte               | Sur                 | España              |
| Got-1    | -0.335              | -0.515*             | -0.152              |
| Apx-1    | -0.436*             | -0.282              | -0.515*             |
| Dia-1    | -0.517*             | -0.396*             | -0.396*             |
| Sod-1    | -0.517*             | -0.389*             | -0.603*             |
| Pgm-1    | -0.402*             | -0.562*             | -0.471*             |
| Pgm-2    | -0.354              | -0.273              | -0.763*             |
| Mdh-1    | -0.647*             | -0.429*             | -0.190              |
| Promedio | -0.4583<br>(0.0169) | -0.4066<br>(0.0166) | -0.4414<br>(0.0379) |

Chi-cuadrada: \* P < 0.05



BIBLIOTECA  
CENTRO DE ECOLOGIA

Tabla 7. Estadísticos  $F$  de Wright y estimados de  $N_m$  en la progenie para tres poblaciones de *Reseda luteola* en España y México. Error estándar entre paréntesis, obtenido con la prueba de jackknife (Weir, 1990).

| Locus    | Fis      | Fit      | Fst                | Nm     |
|----------|----------|----------|--------------------|--------|
| GOT-1    | 0.557*** | 0.559*** | 0.005              | 22.111 |
| GOT-2    | 0.659*** | 0.664*** | 0.015*             | 7.296  |
| APX-1    | 0.102    | 0.119*   | 0.019**            | 5.737  |
| DIA-1    | 0.746*** | 0.753*** | 0.027***           | 4.004  |
| IDH-1    | -0.114*  | -0.098   | 0.015**            | 7.296  |
| SOD-1    | 0.124*   | 0.128*   | 0.005              | 22.111 |
| PGM-1    | 0.358*** | 0.362*** | 0.006              | 18.407 |
| PGM-2    | 0.825*** | 0.829*** | 0.023**            | 4.719  |
| MDH-1    | 0.128*   | 0.209*** | 0.093***           | 1.083  |
| Promedio | 0.361    | 0.376    | 0.024<br>(0.00342) | 10.307 |

Chi-cuadrada: \*  $P < 0.05$   
 \*\*  $P < 0.005$   
 \*\*\*  $P < 0.001$

Tabla 8. Valores de  $F_{st}$  entre poblaciones de *Reseda luteola* en España y México. Errores estándar obtenidos con el método de jackknife (Weir, 1990).

| Población | Norte | Sur               | España            |
|-----------|-------|-------------------|-------------------|
| Norte     | ----- | 0.016*<br>(0.003) | 0.025*<br>(0.005) |
| Sur       |       | -----             | 0.014*<br>(0.001) |
| España    |       |                   | -----             |

Chi-cuadrada: \*  $P < 0.05$

Tabla 9. Estadísticos  $F$  de Wright y  $N_m$  para las madres (genotipos inferidos con el programa MLT, basado en el método de Ritland y Jain (1981) para tres poblaciones de *Reseda luteola*, en España y México. Error estándar entre paréntesis, obtenido con la prueba de jackknife (Weir, 1990).

| Locus    | Fis       | Fit       | Fst               | Nm     |
|----------|-----------|-----------|-------------------|--------|
| Got-1    | -0.339**  | -0.312**  | 0.020             | 5.44   |
| Apx-1    | -0.423*** | -0.360*** | 0.044*            | 2.41   |
| Dia-1    | -0.437*** | -0.408*** | 0.020             | 5.44   |
| Sod-1    | -0.506*** | -0.490*** | 0.010             | 11.00  |
| Pgm-1    | -0.477*** | -0.468*** | 0.006             | 18.407 |
| Pgm-2    | -0.471*** | -0.435*** | 0.025             | 4.33   |
| Mdh-1    | -0.463*** | -0.240*   | 0.152***          | 0.619  |
| Promedio | -0.447    | -0.390    | 0.039<br>(0.0085) | 6.808  |

Chi-cuadrada: \*  $P < 0.05$   
 \*\*  $P < 0.005$   
 \*\*\*  $P < 0.001$



Tabla 10. Matriz de distancias genéticas (bajo la diagonal) de Nei (1972) e identidades genéticas (sobre la diagonal) de Nei (1972), para la progenie de *Reseda luteola* en poblaciones de España y México.

| Población | 1       | 2       | 3       |
|-----------|---------|---------|---------|
| 1. Norte  | *****   | 0.9814  | 0.9732  |
| 2. Sur    | 0.01877 | *****   | 0.98597 |
| 3. España | 0.02708 | 0.01412 | *****   |

Tabla 11. Matriz de distancias genéticas de Nei (1972) (bajo la diagonal) e identidades genéticas (sobre la diagonal) de Nei (1972), para las madres en poblaciones de *Reseda luteola* de España y México.

| Población | 1      | 2      | 3      |
|-----------|--------|--------|--------|
| 1. Norte  | *****  | .95037 | .83489 |
| 2. Sur    | .0509  | *****  | .96955 |
| 3. España | .18045 | .03923 | *****  |

Tabla 12. Tasas de entrecruzamiento multiloci (t mult) y tasas de entrecruzamiento observadas (t obs) y esperadas en el equilibrio (t eq) por locus, para tres poblaciones de *Reseda luteola*, en España y México. El error estándar de las tasas de entrecruzamiento se obtuvieron con un método de bootstraps (usando 100 iteraciones para las tasas por locus y 1000 para las tasas multiloci). El error estándar de la media de la t en equilibrio es el cociente de la desviación estándar sobre la raíz cuadrada de n.

| POBLACION | NORTE            |                    |       | SUR              |                    |        | ESPAÑA           |                    |        |
|-----------|------------------|--------------------|-------|------------------|--------------------|--------|------------------|--------------------|--------|
| Locus     | t obs            | t eq               | F     | t obs            | t eq               | F      | t obs            | t eq               | F      |
| Got-1     | 0.517<br>(0.086) | 0.4847             | 0.347 | 0.03<br>(0.070)  | 0.1976             | 0.67   | 0.219<br>(0.057) | 0.2026             | 0.663  |
| Apx       | 0.639<br>(0.224) | 0.7746             | 0.127 | 0.858<br>(0.073) | 0.6542             | 0.209  | 0.556<br>(0.294) | 1.063              | -0.031 |
| Dia       | 0.222<br>(0.118) | 0.1331             | 0.765 | 0.001<br>(0.0)   | 0.2004             | 0.666  | 0.001<br>(0.093) | 0.1055             | 0.809  |
| Sod       | 0.203<br>(0.124) | 0.7035             | 0.119 | 0.885<br>(0.103) | 0.6515             | 0.211  | 0.601<br>(0.261) | 0.9138             | 0.045  |
| Pgm-1     | 0.094<br>(0.082) | 0.5503             | 0.290 | 0.328<br>(0.158) | 0.5467             | 0.293  | 0.586<br>(0.225) | 0.3504             | 0.481  |
| Pgm-2     | 0.121<br>(0.091) | 0.0198             | 0.961 | 0.18<br>(0.141)  | 0.15               | 0.739  | 0.211<br>(0.176) | 0.128              | 0.773  |
| Mdh       | 0.825<br>(0.111) | 0.998              | 0.01  | 0.957<br>(0.153) | 1.2857             | -0.125 | 0.068<br>(0.090) | 0.253              | 0.595  |
| Media     | 0.3744           | 0.5234<br>(0.0497) | 0.294 | 0.5012           | 0.5265<br>(0.0567) | 0.311  | 0.3115           | 0.4309<br>(0.0559) | 0.465  |
| t mult    | 0.664<br>(0.058) | 0.5455             |       | 0.663<br>(0.116) | 0.5255             |        | 0.448<br>(0.108) | 0.3651             |        |

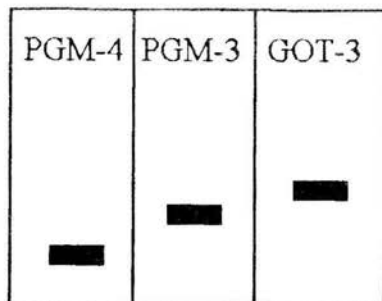


Figura 2.a. Esquema de los patrones de bandeo que presentaron las enzimas monomórficas.

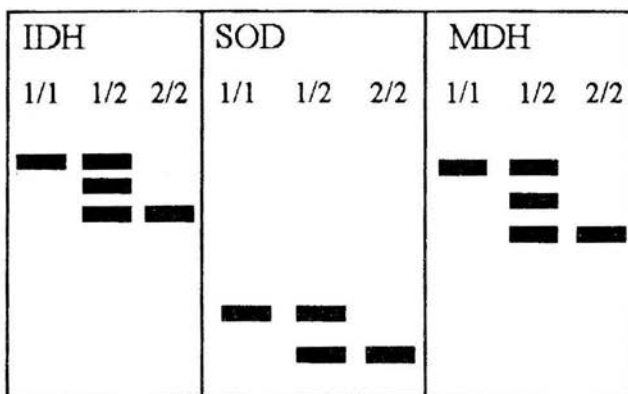
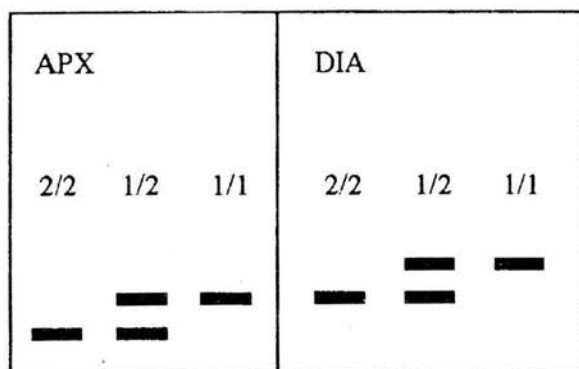


Figura 2b. Esquema de los patrones de bandeo que presentaron las enzimas polimórficas.

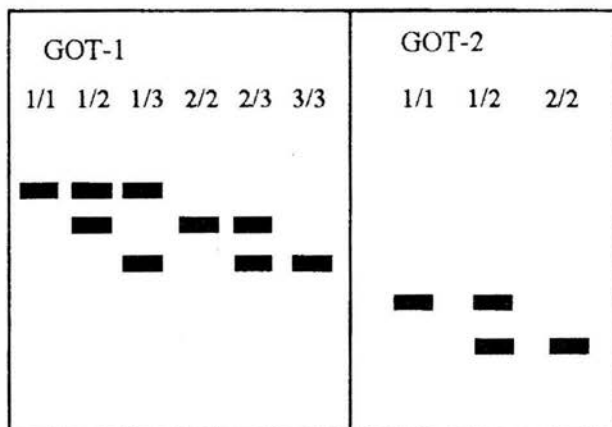


Figura 2b. Esquema de los patrones de bandeado que presentan las enzimas polimórficas.

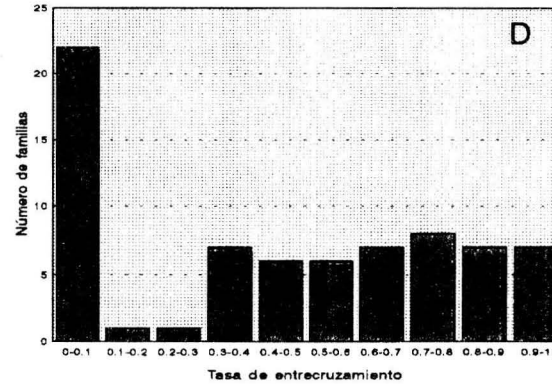
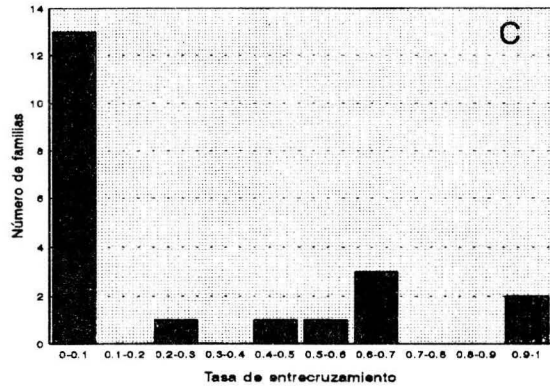
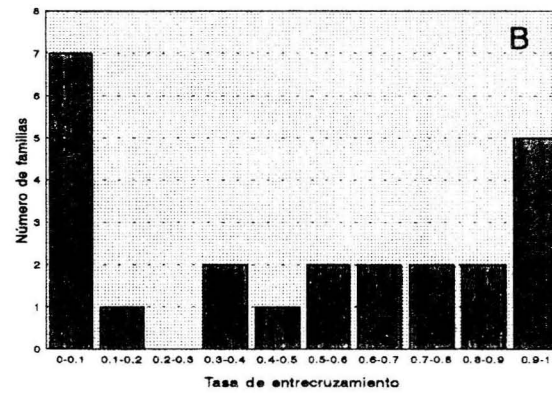
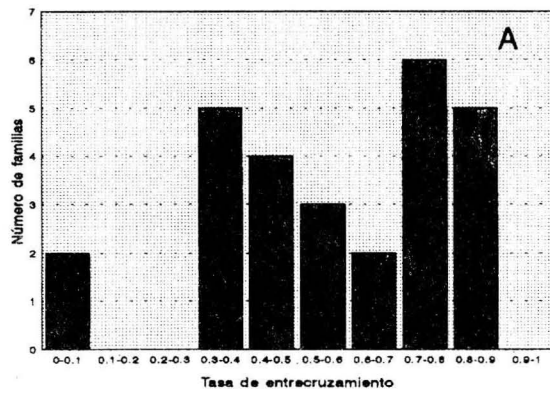


Figura 3. Distribución de la tasa de entrecruzamiento multiloci por familia para las poblaciones de *R. luteola*: (A) norte, (B) sur, (C) España y (D) para las tres poblaciones.

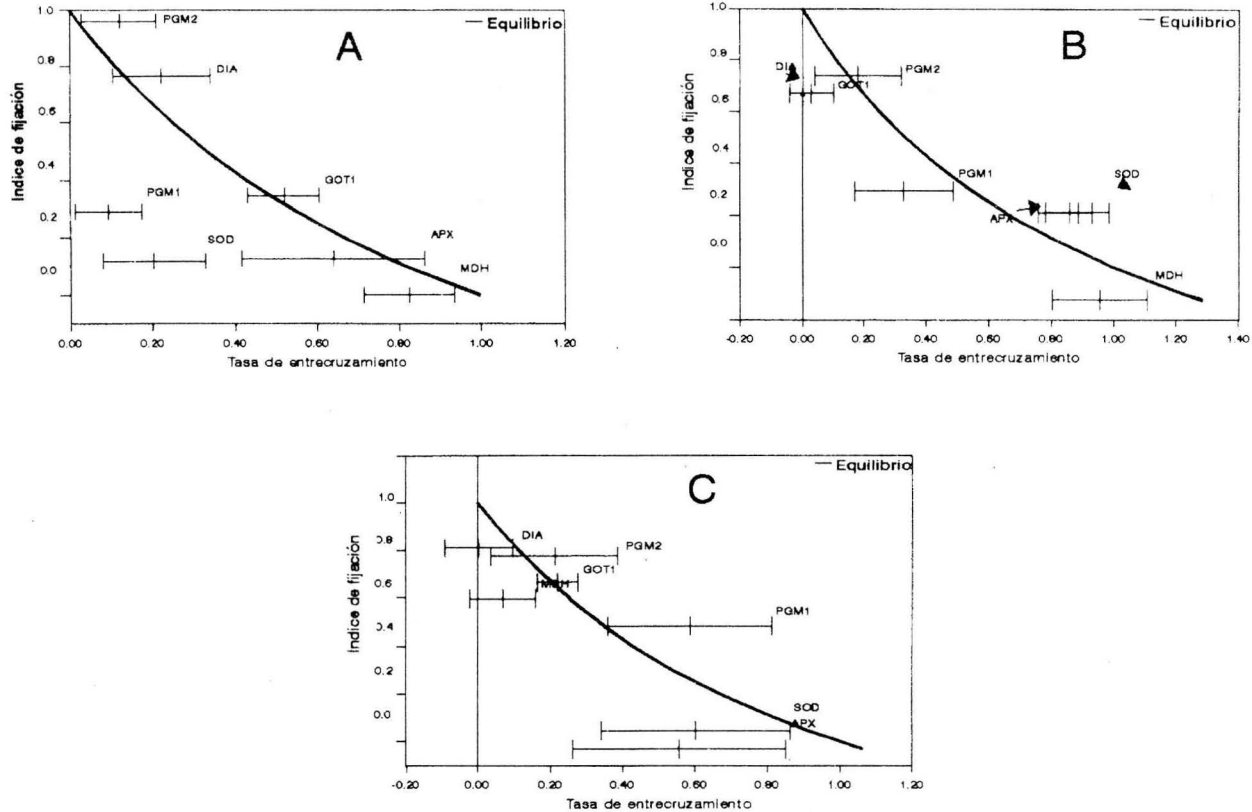


Figura 4. Relación entre el índice de fijación y la tasa de entrecruzamiento por locus en las poblaciones de *R. luteola*: A) Norte, B) Sur, C) España. Las barras indican intervalos de confianza (ver texto).

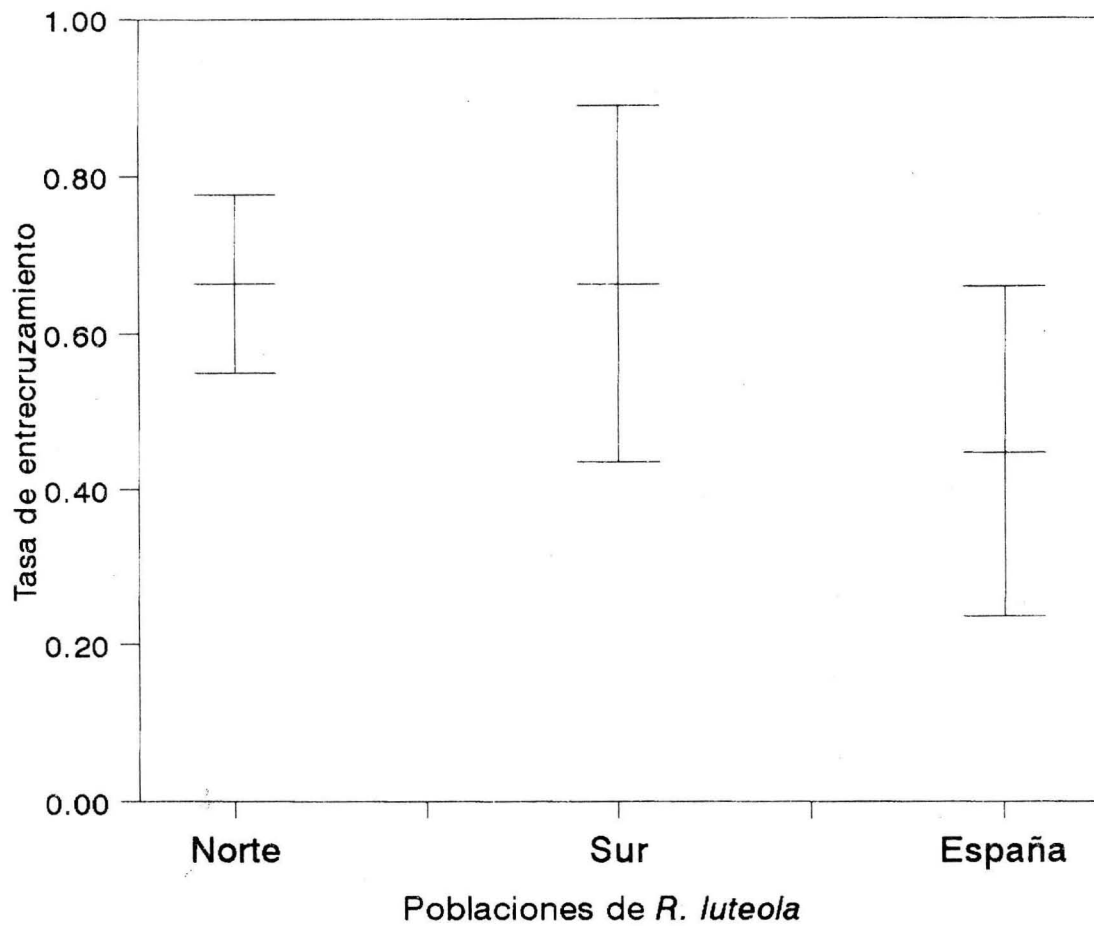


Figura 5. Tasas de entrecruzamiento multiloci ( $\pm 95\%$ ) de las poblaciones de *R. luteola*.



## DISCUSION.

### Variación genética.

Los niveles de variación genética estimada como heterocigosis ( $H$ ) y polimorfismo ( $P$ ) en *R. luteola* son parecidos a los encontrados en otras hierbas que tienen un sistema mixto de apareamiento ( $H= 0.174$ ) (Hamrick, 1979; Loveless y Hamrick, 1984). Una causa de los valores relativamente altos de heterocigocidad promedio puede ser explicada por la predicción de que las plantas que tienen fecundación cruzada y/o sistemas mixtos de apareamiento presentan una mayor variación genética que aquellas que se autofecundan (Hamrick, 1983; Loveless y Hamrick, 1984).

Se ha reportado que uno de los factores más importantes que determinan la estructura genética es el sistema de apareamiento, ya que aquellas especies polinizadas por animales, que se entrecruzan o tienen un sistema mixto, presentan niveles de variación mayores que las especies que se autofecundan (Hamrick, 1983; Loveless y Hamrick, 1984).

En algunos estudios sobre variación genética en plantas se ha observado que características de historia de vida son determinantes en la estructura genética de la población; encontrándose entre estas: sistemas reproductivos, morfología floral, mecanismos de polinización, fenología, latencia de la semilla, densidad poblacional; siendo también importantes características como: ciclo de vida, estado sucesional y rango geográfico (Loveless y Hamrick, 1984; Hamrick, 1983; Bazzaz, 1986; Clegg y Brown, 1983).

Dado que *R. luteola* es una planta introducida en México, se podría esperar que tuviera poca variación genética, lo cual no se observa. Esto sugiere que esta especie no ha sufrido efectos importantes por deriva génica o endogamia, que conducirían a una pérdida o disminución de la variación genética o que existe una gran cantidad de flujo génico entre poblaciones.

Generalmente, los procesos de colonización están relacionados con cuellos de botella y efecto fundador, aunque no siempre se observa que las poblaciones introducidas estén empobrecidas genéticamente. Esto se ha demostrado con estudios de especies introducidas, en donde se observa que no hay ninguna reducción en la variación genética de las poblaciones introducidas con respecto a las poblaciones originales (Warwick, 1990; Molina-Freaner y Jain, 1992).

### **Frecuencias alélicas.**

Se puede señalar que las frecuencias alélicas cambian de madres a hijos. Esto podría deberse a selección natural (Clegg, 1983; Hedrick, 1983). Demostrar que esto ocurre, es realmente muy difícil, ya que se necesitan diseños muy específicos, datos de varias generaciones y tamaños de muestra muy grandes. En este caso, un problema adicional es que la estimación de los genotipos maternos es de manera indirecta, ya que se infieren a partir de los genotipos de la progenie con el algoritmo de Ritland y Jain (1981), basándose en el método de Brown y Allard (1970); aunque la estimación es confiable, la probabilidad de equivocarse al inferir los genotipos maternos, depende de los tamaños de familia que se utilizan y de la tasa de entrecruzamiento que presenta la planta (Ritland y Jain, 1981; Ritland, 1983; Brown, 1989).

Comparando las frecuencias alélicas entre poblaciones para la progenie, se observa que la mayor heterogeneidad está dada por la población Norte y España y la menor por España y Sur, lo que podría sugerir que la primera introducción fue al Sur, y de aquí hubo otras introducciones al resto del Valle de México, aunque para asegurar esto, se necesitarían estudiar un mayor número de poblaciones de México y de España.

### **Diferenciación genética.**

La distancia genética  $D$  de Nei promedio para la progenie y para las madres fueron bajas y las identidades altas, indicando que los niveles de diferenciación son bajos. Si se comparan por ejemplo con los encontrados para *Astrocaryum mexicanum* (Eguiarte, 1990; Eguiarte *et al.*, 1992a) se observa que el promedio en los adultos es 0.024 y en la progenie 0.0056 y en ambos casos son menores a los encontrados en *R. luteola*. Al compararlos con un estudio de *Phaseolus coccineus* (Coello y Escalante, 1989) con poblaciones cultivadas y silvestres del centro de México y Chiapas, se encontró que la distancia con un valor más bajo fue 0.196, siendo mucho mayor a las encontradas en este estudio.

Para *R. luteola* no parece existir un patrón de diferenciación genética con distancia geográfica, ya que las poblaciones que presentaron menores distancias genéticas entre sí son Sur y España, tanto en la progenie como en las madres. Esto indica que las poblaciones introducidas de *R. luteola* no están empobrecidas genéticamente con respecto a la población original.

### **Índices de fijación $F$ .**

Los índices de fijación de la progenie indican que existe un exceso de homocigos respecto a lo esperado por apareamiento al azar. Los índices de fijación  $F$  son positivos para las madres en todos los loci, indicando un exceso de heterocigos. Se puede sugerir que podrían existir procesos selectivos a favor del heterocigo, depresión por endogamia, desequilibrio gamético u otras fuerzas evolutivas, por las cuales se observa esta diferenciación que ocurre entre las madres y la progenie. Debido al tiempo de generación de esta especie (1 ó 2 años) sería muy interesante estudiar otras poblaciones y más generaciones para explorar estas hipótesis.

Las diferencias observadas en los índices de fijación  $F$  y  $F_{is}$  entre madres y progenie puede deberse en parte a que los genotipos de las madres se estimaron a partir de los genotipos de la progenie lo cual, aunque las inferencias sean confiables pueden tener un margen de error, como ya se mencionó anteriormente (Ritland, 1983). En la literatura se encuentran reportados estudios en donde los índices de fijación varían entre madres e hijos. En un estudio con *Pinus monticola* (El-Kassaby *et al*, 1987), se reportan variaciones en la  $F$  entre los adultos y la progenie; en donde para las madres la  $F$  de 4 de 6 loci fueron negativos, mientras que para la progenie sólo 2 son negativos. En un estudio de *Astrocaryum mexicanum*, (Eguiarte, 1990), se reportan diferencias en los índices de fijación  $F$  y  $F_{is}$  entre adultos y semillas, en donde los adultos parecen presentar un mayor rango que las semillas (rango adultos -0.0769 a -0.8621, rango de semillas +0.1967 a -0.3397, 32 estimaciones de  $F$  para ambos). El exceso de heterocigos es mayor en los adultos que en las semillas (Eguiarte *et al*, 1992a).

Un exceso en el número de homocigos puede deberse a una gran variedad de causas: efecto Wahlund, apareamiento clasificado positivo (apareamiento preferencial entre genotipos similares), selección de homocigos, estructura familiar con vecinos restringidos causando apareamientos entre individuos relacionados. Mientras que un exceso de heterocigos puede resultar de un apareamiento clasificado negativo y selección favoreciendo

al heterocigoto (El-Kassaby *et al.*, 1987). En *Reseda luteola*, como se discutirá más adelante lo que puede estar pasando es que existan procesos de endogamia biparental, lo que podría estar debiendo a una subestructura de las poblaciones.

Dado que el índice de fijación  $F$  y  $F_{is}$  son negativos para todas las enzimas analizadas en las madres, se podría tener un caso de heterocis dada por una ventaja de los individuos que son heterocigos para un número mayor de genes, o porque exista en la población una carga de recesivos (algunos letales), por lo que los individuos homocigos es probable que posean genes deletéreos (Mitton y Grant, 1984; Ledig, 1986).

### **Estadísticos F de Wright.**

Se observó que los valores de  $F_{is}$  son para todos los loci mayores a los valores de  $F_{st}$ , tanto para la progenie como para las madres; lo que sugiere que el sistema de apareamiento es el principal factor que esta determinando la estructura genética de la población.

Los valores de  $F_{st}$  encontrados en *Reseda luteola*, aunque son significativos, al compararlos con la media de  $F_{st}$  (0.28) para plantas herbáceas anuales y perennes (Eguiarte, 1990) son pequeños; y se observa que son mucho más parecidos a la media encontrada (0.07) para arbustos, árboles y coníferas (Eguiarte, 1990). Esto puede estar ocurriendo debido al sistema de apareamiento que presenta *R. luteola*.

Al comparar los valores de  $F_{st}$  de *R. luteola* con los reportados en la literatura para plantas con características ecológicas y de historia de vida similares a los de *R. luteola* como: sistema de apareamiento, morfología floral, mecanismos de polinización, mecanismos de dispersión, ciclo de vida y rango geográfico, se observa que los valores encontrados son menores a los reportados (Loveless y Hamrick, 1984; Hamrick, 1983).

Los valores de  $F_{st}$  de *R. luteola* (rango 0.024 a 0.039) son más parecidos a los encontrados en árboles que a los de las especies herbáceas (Cuguen *et al.*, 1988; Eguiarte, 1990).

*Reseda luteola* tiene un sistema mixto de apareamiento, es polinizada por abejas y probablemente por viento y presenta autofecundación, esto explicaría en parte que los valores de  $F_{st}$  que se encuentran para esta especie, sean intermedios entre los reportados en la literatura para plantas polinizadas exclusivamente por animales y plantas polinizadas exclusivamente por viento (Hamrick, 1987; Loveless y Hamrick, 1984).

Varios estudios realizados con plantas colonizadoras e introducidas muestran que en general la variabilidad genética es menor en la población introducida, que en la población original, y por esto se puede observar una alta diferenciación genética entre las poblaciones colonizadoras (Clegg y Brown, 1983). Existen casos de ciertas plantas introducidas, como por ejemplo: *Apera spica-venti* (Warwick, 1990) y *Trifolium hirtum* (Molina-Freaner y Jain, 1992) en los que no se observa reducción de la variabilidad genética ni una diferenciación entre las poblaciones introducidas con respecto a las nativas. En estos estudios se sugiere que el sistema reproductivo de las especies además del número de individuos introducidos es muy importante para que no ocurra esta diferenciación entre las poblaciones y se mantengan entre ellas los mismos niveles de variación genética. En *T. hirtum* se encontró que las poblaciones introducidas tenían una tasa de entrecruzamiento mayor respecto a las originales, y se sugiere que esto es el factor responsable de encontrar altos niveles de variación genética en las poblaciones introducidas (Molina-Freaner y Jain, 1992).

### **Flujo génico.**

En *Reseda luteola* la  $Nm$  promedio para las madres es 6.309 y para la progenie es de 10.307. Wright señala que se debe esperar muy poca diferenciación genética entre sitios si  $Nm$  es  $>$  de 1 (Eguiarte, 1990). Kimura (1983) sugiere que en algunas condiciones se puede encontrar diferenciación genética entre sitios, aunque la  $Nm$  tome valores alrededor de 5. En *R. luteola* tanto en la progenie como en las madres la  $Nm$  toma valores mayores a cinco, y aunque los valores de  $Fst$  encontrados son significativos, podemos decir que la diferenciación genética es poca, por los valores encontrados de  $Nm$ . Los valores de  $Nm$  de *Reseda luteola*, se encuentran mucho más cercanos a los reportados para especies con polinización cruzada por viento, como por ejemplo *Pinus rigida* ( $Nm=17.2$ ) y *Pseudotsuga menziesii* ( $Nm=5.3$ ) (Hamrick, 1987).

Los altos niveles de variación genética encontrados para *R. luteola*, y los valores de  $Fst$  y  $Nm$ , reflejan que no existe un efecto fundador o de cuello de botella asociado a esta introducción y que existen altos niveles de flujo génico entre las poblaciones, lo que disminuye los efectos de la deriva génica (Slatkin, 1985).

Puede pensarse que *R. luteola* no tuvo una única introducción a México, ya que al ser una maleza en España, además de la introducción para su uso como planta tintorea, pudo haber habido otras introducciones accidentales. Esta hipótesis de varias introducciones podría explicar la baja diferenciación entre las poblaciones de México y España; ya que la ausencia de migraciones sucesivas de la población original a las poblaciones introducidas, es una causa de la reducción en la variación genética (Clegg y Brown, 1983).

### **Tasas de entrecruzamiento.**

Las tasas de entrecruzamiento multiloci encontradas en las poblaciones de *R. luteola* (rango 0.448 a 0.663) son cercanas a la media (0.42) encontrada en hierbas (Eguiarte, 1990). En las hierbas se encuentra todo el rango de valores de tasas de entrecruzamiento, aunque la moda se encuentra entre valores de 0.0 y 0.1, ya que la mayoría de las hierbas y plantas anuales se autofecundan casi de manera exclusiva (Eguiarte, 1990; Eguiarte *et al.*, 1992b).

Las tasas de entrecruzamiento reportadas para árboles, son muy cercanas a 1 (Eguiarte, 1990; Eguiarte *et al.*, 1992b; El-Kassaby *et al.*, 1987; O'Malley *et al.*, 1988), esto puede deberse a que por las grandes longevidades de los árboles, se podría acumular "carga mutacional" y al minimizar la autopolinización, esto se evitaría (Ledig, 1986; Eguiarte *et al.*, 1992b). En las hierbas, las grandes fecundidades permitirían, que cada año se eliminen una parte de los mutantes delétereos y recesivos, por selección natural (Eguiarte, 1990).

Los resultados muestran que en las poblaciones de *R. luteola*, la tasa de entrecruzamiento multiloci poblacional es estadísticamente diferente de cero y uno, pero iguales entre sí. Los intervalos de confianza al 95% no muestran que las tasas de entrecruzamiento en México y España sean diferentes de 0.5, por lo cual se puede decir que *R. luteola* tiene un sistema de apareamiento mixto, sin ser predominante el entrecruzamiento o la autofecundación.

Los resultados de la tasa de entrecruzamiento por familia muestran que existe una gran variación en las tres poblaciones. Varios autores han propuesto que una posible causa de esta variación es la existencia de una estructuración en la población (estructura en parches) (Clegg, 1980; Coello y Escalante, 1989). La variación encontrada en la tasa de entrecruzamiento entre individuos puede presentar sesgos debido al número de individuos ensayados de la progenie, ya que las estimaciones por familia son menos robustas que las estimaciones para un grupo de plantas (Ritland, 1983; Coello y Escalante, 1989).

Hamrick (1983) ha propuesto que la diferencia en la tasa de entrecruzamiento entre individuos puede deberse a diferencias genéticas en cuanto a su capacidad de fecundación. Los amplios rangos de variación observados, podrían ser también el resultado de variación en alguna característica morfológica o fisiológica entre plantas.

Los resultados de la tasa de entrecruzamiento por familia en *Reseda luteola*, muestran que existe una gran variación, lo cual no estaría apoyando la idea de Schemske y Lande (1985) de que las poblaciones evolucionan a la autofecundación o el entrecruzamiento; lo que se observa en este caso es que se está evolucionando a un sistema completamente mixto de entrecruzamiento.

En una revisión realizada por Schemske y Lande (1985), observaron que las especies que presentaban variación interpoblacional en la tasa de entrecruzamiento, eran plantas anuales, comúnmente con fluctuaciones en los tamaños poblacionales, características observadas frecuentemente en plantas anuales, lo que podría provocar una subestructura en parches de la población.

En un estudio realizado con *Phaseolus coccineus*, se encontró variación en las tasas de entrecruzamiento para diferentes familias y poblaciones, lo cual indica que esa característica no está fija en la especie y que podría variar por efecto de factores ambientales y genéticos (Coello y Escalante, 1989).

Si las tasas de entrecruzamiento varían en tiempo y espacio con los factores ambientales, la influencia de la selección natural en el sistema de apareamiento se ve reducida (Schemske y Lande, 1985). Se ha observado que en *Lupinus succulentus* y *L. nanus*, las tasas de entrecruzamiento son en su mayoría afectadas por la actividad de su polinizador y en *L. nanus* se ha confirmado que el sistema de apareamiento varía con la abundancia del polinizador (Schemske y Lande, 1985).

En *Clarkia tembloriensis* existe evidencia de que la variación en las tasas de entrecruzamiento entre poblaciones se debe a las diferencias poblacionales en la estructura floral (Vasek y Harding, 1976).

Una hipótesis de la variación en las tasas de entrecruzamiento es que la depresión por endogamia provoca que las poblaciones no se encuentren en el equilibrio (Schemske y Lande, 1985). Si se tiene una gráfica de la tasa de entrecruzamiento contra el índice de fijación, se puede observar que si los valores están cerca de la curva teórica ( $t$  en equilibrio)

indica que la estructura genética puede ser explicada por el sistema reproductivo, aunque otros factores pueden estar actuando sobre las poblaciones. La acción de otras fuerzas, además del sistema reproductivo, puede hacer que las poblaciones se alejen del equilibrio de endogamia, pero cuando el sistema reproductivo es el principal determinante de la estructura genética, otros factores asociados a éste, como el apareamiento entre parientes por subestructura de la población o depresión por endogamia, pueden provocar que los puntos se desvíen hacia arriba de la curva (Hedrick y Cockerham, 1986; Shea, 1987). Cuando los puntos se encuentran por debajo de la curva teórica, la hipótesis de que la selección natural está favoreciendo a los heterocigos es la explicación más aceptada (Brown, 1979; Schoen, 1982). A estas desviaciones se les denomina paradoja de los heterocigos (Brown, 1979)

En *Reseda luteola* los tamaños de muestra pueden estar sesgando la posición de los puntos. No obstante algunos de los factores mencionados anteriormente podrían estar provocando las desviaciones con respecto al equilibrio.

Se ha observado que si la adecuación relativa de la progenie producto de la autofecundación varía con la densidad de plantas o con la frecuencia de los genotipos (Price y Waser, 1982), la selección podría potencialmente mantener fluctuaciones en el equilibrio o una mezcla de entrecruzamiento y autofecundación.

La variación que existe en las tasas de entrecruzamiento por locus dentro de una población, se ha explicado en términos de la existencia de una subestructuración de la población, entre otras posibles causas (Coello y Escalante, 1989). Las poblaciones naturales pueden presentar una estructura poblacional espacial cuando el flujo de polen es limitado, o temporal cuando se presentan diferencias entre los genotipos en cuanto al tiempo de floración. Esta estructura poblacional puede traer como consecuencia una heterogeneidad en la poza de polen, es decir, que la poza de polen de entrecruzamiento no se distribuya al azar en toda la población (Ennos y Clegg, 1982; Coello y Escalante, 1989). El movimiento restringido de polen puede provocar apareamientos entre individuos relacionados (endogamia) que un modelo de locus simple no discrimina de la autofecundación (Coello y Escalante, 1989), esto traería como consecuencia la variación en las estimaciones de la tasa de entrecruzamiento. El estimador multiloci de la tasa de entrecruzamiento puede ser usado para el análisis de los efectos o factores, tales como heterogeneidad de las poblaciones y selección postcigótica (Shaw et al., 1981). Ritland y Jain (1981) mencionan que si la diferencia que se observa entre la tasa de entrecruzamiento multiloci y la tasa de entrecruzamiento por locus (promedio ponderado) es significativamente positiva, esta



sugeriría que existen procesos de endogamia biparental en la población. Otras explicaciones alternativas de la variación en las estimaciones de la tasa de entrecruzamiento son: herencia no mendeliana de algunos loci, selección de genes ligados o errores metodológicos en las estimaciones, debidos al tamaño de la muestra (Coello y Escalante, 1989).

En *Reseda luteola* se encontró que las tasas de entrecruzamiento por locus para las tres poblaciones son variables. Se podría pensar que en *R. luteola* ocurre lo que se observó para *Phaseolus coccineus* (Coello y Escalante, 1989), y que las tasas de entrecruzamiento por locus para México y España puede estar variando por efecto de factores ambientales y genéticos (temperatura, precipitación, actividad de los polinizadores, número de flores por planta, diferencias genéticas en la capacidad de fecundación, etc), ya que las tasas de entrecruzamiento multiloci indica que está fija en las tres poblaciones (las diferencias no son significativas). Sería muy interesante estudiar un número mayor de poblaciones, para ambos países y posiblemente de otras poblaciones de Europa, y ver de que manera varían los factores ambientales y las características genéticas y su relación con la variación en las tasas de entrecruzamiento; además observar como son las tasas de entrecruzamiento en las poblaciones nativas e introducidas daría herramientas para generar hipótesis sobre la evolución de los sistemas reproductivos en las poblaciones colonizadoras.

## CONCLUSIONES.

- 1) Los niveles de variación genética encontrados en las poblaciones de *R. luteola* son altos con respecto a los encontrados en otras hierbas y plantas con dispersión de semillas por gravedad. Son similares a los encontrados en árboles.
- 2) Los valores del índice de fijación  $F$  para las madres y progenie, sugieren que podría estar operado algún proceso de selección a favor del heterócigo. A este respecto sería interesante estudiar más poblaciones, más generaciones y diseñar experimentos.
- 3) La  $F_{st}$  y los valores de  $Nm$  indican poca diferenciación genética entre las poblaciones, lo que sugiere un elevado flujo génico y poca deriva génica.
- 4) Los niveles de variación genética similares en las tres poblaciones de *R.luteola* y la  $F_{st}$  encontrada, indican que las poblaciones introducidas no están empobrecidas genéticamente con respecto a la población de España.
- 5) Se puede decir que las poblaciones de *R. luteola* no sufrieron efecto fundador o de cuello de botella al ser introducidas. Sería importante estudiar un mayor número de poblaciones no solo de España, sino de otras partes de Europa, donde *R. luteola* es una planta nativa.
- 6) La  $F_{st}$  de madres e hijos, apoyan la idea de puede existir una diferenciación genética entre ellos, que sería muy interesante explorar, ya que el tiempo en que sucedería es relativamente corto (uno o dos años).
- 7) Las tasas de entrecruzamiento en las tres poblaciones fueron diferentes de cero y uno. Los valores encontrados indican que *R. luteola* tiene un sistema mixto, en donde no predominan el entrecruzamiento o la autofecundación.
- 8) La variación en las tasas de entrecruzamiento multiloci y por familia para las poblaciones de *R. luteola* sugieren que podría haber procesos de endogamia biparental, que podría estar dada por una subestructura en la población.

9) Las tasas de entrecruzamiento por locus en *R. luteola*, indican que no se encuentran en el equilibrio de endogamia, lo que apoyaría la idea de que existen procesos de endogamia biparental en las poblaciones estudiadas.

10) Por valores de variación genética, los estadísticos  $F$  de Wright y las tasas de entrecruzamiento encontrados en *R. luteola*, se puede decir que el sistema reproductivo de esta especie, juega un papel muy importante en la determinación de la estructura genética.

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- Baker, H.G. 1965. Characteristics and modes of origin of weeds, en. H.G. Baker y G.L. Stebbins, eds. **The Genetics of Colonizing Species**. Academic Press. New York. pags.147-168.
- Baker, H.G. 1974. The Evolution of Weeds. **Annu. Rev. Ecol. Syst** 5:1-24.
- Barrett, S.C.H. y B.J. Richardson. 1986. Genetic attributes of invading species, en R.H. Groves y J.J. Burdon eds. **Ecology of Biological Invasions**. Cambridge University Press. Sydney, Australia. pags.21-33.
- Barrett, S.C.H. y B.C. Husband. 1989. The genetics of plant migration and colonization, en A.H.D.Brown, M.T.Clegg, A.L.Kahlerand y B.S.Weir, eds. **Plant Populations Genetics, Breeding and Genetic Resources**. Sinauer Associates Inc. Publishers. Suderland, Massachusetts. pags: 254-277.
- Barrett, S.C.H. y J.S. Shore. 1989. Isozyme variation in colonizing plants, en. P.S Soltis y D. E Soltis, eds. **Isozymes in Plant Biology**. Dioscorides Press. Portland, Oregon. pags 106-126.
- Bazzaz, F.A. 1986. Life history of colonizing plants: some demographic, genetic, and physiological features, en. H.A. Mooney y J.A. Drake, eds. **Ecology of biological invasions of North America and Hawaii**. Ecological Studies. Vol 58. New York Inc. pags.96-110.
- Brown, A.H.D. 1979. Enzyme polymorphism in plant populations. **Theoretical population biology** 15: 1-42.
- Brown, A.H.D. 1989. Genetic characterization of plant mating systems, en A.H.D Brown, M.T.Clegg, A.L.Kahlerand y B.S.Weir eds. **Plant Populations Genetics, Breeding and Genetic Resources**. Sinauer Associates Inc. Publishers. Suderland, Massachusetts. pags: 254-277.
- Brown, A.H.D y R.W. Allard. 1970. Estimation of the mating system in open-pollinated maize populations using isozyme polymorphism. **Genetics** 66: 133-145.

Brown, A.H.D. y D.R. Marshall. 1981. Evolutionary changes accompanying colonization in plants, en. G.G.E. Scudder y J.L. Reveal, eds. **Evolution Today**. Proceedings, Second International Congress of Evolutionary Biology. pags: 351-363.

Brown, A.H.D. y J.J. Burdon. 1989. Mating systems and colonizing success in plants, en. A.J. Gray, P.J. Edwards y M.J. Crawley, eds. **Colonization, Sucesion and Stability**. The 26th Symposium of the British Ecological Society. Blackwell Scientific Publications. pags:115-131.

Carson, H.L. 1989. Colonization and speciation, en. A.J. Gray, P.J. Edwards y M.J. Crawley, eds. **Colonization, Sucesion and Stability**. The 26th Symposium of the British Ecological Society. Blackwell Scientific Publications. pags: 187-205.

Clason, W.E. 1989. **Elsevier's dictionary of wild and cultivated plants**. Science Publishing B.V. The Netherlands.

Clegg, M.T. 1980. Measuring plant mating systems. **BioScience** 30: 814-818.

Clegg, M.T. 1983. Detection and measurement of natural selection, en S.D. Tanksley y T.J. Orton eds. **Isozymes in Plant Genetics and Breeding**, Part A. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam.

Clegg, M.T. y A.H.D. Brown. 1983. The founding of plant populations, en. C.M. Schonewald-Cox, S.M. Chambers, B. MacBryde y W.L. Thomas. **Genetics and conservation**. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California. pags: 216-228.

Coello, J.G. y A.M. Escalante. 1989. Estructura genética y estimación de los parámetros del sistema de apareamiento en poblaciones silvestres y cultivadas de *Phaseolus coccineus*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.

Crow, J.F. y K. Aoki. 1984. Group selection for a polygenic behavioral trait: Estimating the degree of population subdivision. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 81: 6073-6077.

Cuguen, J., D. Merzeau y B. Thiebaut. 1988. Genetic structure of the European beech stands (*Fagus sylvatica* L.): F-statistics and importance of mating system characteristics in their evolution. **Heredity** 60:91-100.

- Eguiarte, L.E. 1986. Una guía para principiantes a la genética de poblaciones. **Ciencias, revista de difusión**. Número especial 1. págs 30-38.
- Eguiarte, L.E. 1990. Genética de poblaciones de *Astrocaryum mexicanum* Liebm. en Los Tuxtlas, Veracruz. Tesis de doctorado. Centro de Ecología, /UACPyP y del CCH, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. México.
- Eguiarte, L.E. y D. Piñero. 1990. Genética de la conservación: Leones vemos, genes no sabemos. **Ciencias, revista de difusión**. Número especial 4. págs 34-47.
- Eguiarte, L.E., N.Pérez-Nasser y D. Piñero. 1992a. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. **Heredity** 69: 217-228.
- Eguiarte, L.E., J. Nuñez-Farfán, C. Domínguez y C. Cordero. 1992b. Biología evolutiva de la reproducción en plantas. **Ciencias, revista de difusión**. Número especial 6. págs 69-86.
- El-Kassaby., M.D. Meagher., J. Parkinson y F.T. Portlock. 1987. Allozyme inheritance, heterozygosity and outcrossing rate among *Pinus monticola* near Ladysmith, British Columbia. **Heredity** 58: 173-181.
- Ennos, R.A. and M.T. Clegg. 1982. Effect of population substructuring on estimates of outcrossing rate in plant populations. **Heredity** 58:5-14.
- Fernández-Peralta, A.M. y J.J. González-Aguilera. 1982. Cytogenetic and evolutionary studies on the spanish species of *Reseda* L.: Section *Luteola* Dumort. (RESEDACEAE). **Taxon** 31:1-8.
- Foy, C.L., D.R. Forney y W.E. Cooley. 1983. **History of weed introductions, en Exotic Plant Pests and North American Agriculture**. Academic Press Inc. págs:65-91.
- Garland, S. 1989. **Gran libro de las hierbas y especies**. Editorial Blume. Barcelona.
- Glover, D.E. y S.C.H. Barrett. 1987. Genetic variation in continental and island populations of *Eichhornia paniculata* (Pontederiaceae). **Heredity** 59:7-17.

Hamrick, J.L. 1983. The distribution of genetic variation within and among natural plant populations, en C.M. Schonewald-Cox, S.M. Chambers, B. MacBryde y W.L. Thomas, eds. **Genetics and conservation**. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. California. pags: 3335-348.

Hamrick, J.L. 1987. Gene flow and distribution of genetic variation in plant populations, en K. Urbanska,eds. **Differentiation patterns in higher plants**. Academic Press. New York. pags 53-67.

Hamrick, J.L. 1989. Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations, en D.E Soltis y P.S. Soltis, eds. **Isozymes in Plant Biology**. Dioscorides Press. Portland, Oregon. pags 87-105.

Hamrick, J.L., Y.B.Linhart y J.B. Mitton. 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** 10: 173-200.

Hartl D.L. y A.G. Clark. 1989. **Principles of populations genetics**. 2nd. ed. Sinauer, Suderland, Massachusetts.

Hedrick, P.W. 1983. **Genetics of populations**. Science Books Int. Boston.

Hedrick, P.W. y C.C. Cockerham. 1986. Partial inbreeding: equilibrium heterozygosity and the heterozygosity paradox. **Evolution** 40: 856- 861.

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

Layton, C.R. y F.F. Ganders. 1984. The genetic consequences of contrasting breeding systems in *Plectritis* (Valerianaceae). **Evolution** 38 (6):1308-1325.

Ledig, F.T. 1986. Heterozygosity, and fitness in outbreeding plants, en M.E. Soulé ed. **Conservation Biology**. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts. pags:77-104.

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

- Loveless, M.D. y J.L. Hamrick. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. **Ann. Rev. Ecol. Syst** 15:65-95.
- Mitton, J.B. y M.C. Grant. 1984. Associations among protein heterozygosity, growth rate, and developmental homeostasis. **Ann. Rev. Ecol. Syst** 15: 479-499.
- Molina-Freaner, F. y S.K. Jain. 1992. Isozyme variation in California and turkish populations of the colonizing species *Trifolium hirtum*. **Journal of Heredity** 83: 423-430.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. **The American Naturalist** 106: 283-292.
- O'Malley, D.M., D.P. Buckley., G.T. Prance y K.S. Bawa. 1988. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb.& Bonp.: Lecythydaceae). 2. Mating system. **Theor Appl Genet** 76: 926-932.
- Ortiz, P.L. 1990. Aportación Melitopalínológica al conocimiento de la flora apícola del norte de Córdoba. **Lagascalia** 15: 165-177.
- Pérez-Nasser, N. 1990. Biología reproductiva y estructura genética de *Psychotria faxluensis* (Rubiaceae) en los Tuxtlas, Veracruz, Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F. México.
- Perrins, J., M. Williamson y A. Fitter. 1992. Do annual weeds have predictable characters?. **Acta Oecologica** 13: 517-533.
- Price, M.V. y N.M. Waser. 1979. Pollen dispersal and optimal outcrossing in *Delphinium nelsoni*. **Nature** 277:294-297.
- Price, S.C. y S.K. Jain. 1981. Are inbreeders better colonizers?. **Oecologia** 49:283-286.
- Ritland, K. 1983. Estimation of mating systems, en. S.D. Tanksley y T.J. Orton, eds. **Isozymes in Plant Genetics and Breeding** Part A. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam.
- Ritland, K. y S. Jain. 1981. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using  $n$  independent loci. **Heredity** 47: 35-52.



- Rzedowski, J. y G.C. de Rzedowski. 1979. **Flora fanerogámica del Valle de México**. Vol I. C.E.C.S.A. México, D.F.
- Sánchez, S.O. 1984. **La flora del Valle de México**. Ed. Herrero. México, D.F.
- Schemske, D.W. and R. Lande. 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. II. Empirical Observations. **Evolution** 39:41-52.
- Schoen, D.J. 1982. Genetic variation and the breeding system of *Gilia achilleifolia*. **Evolution** 36: 361-370.
- Shaw, D.V., A.L. Kahler and R.W. Allard. 1981. A multilocus estimator of mating system parameters in plant populations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. 78:1298-1302.
- Shea, K.L. 1987. Effects of population structure and cone production on outcrossing rates in engelmann spruce and subalpine fir. **Evolution** 4: 124-126.
- Slatkin, M. 1985. Gene flow in natural populations. **Ann. Rev. Ecol. Syst.** 16:393-430.
- Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science** 236: 787-792.
- Sokal, R.R. y F.J. Rohlf. 1981. **Biometry**. W.H. Freeman. San Francisco.
- Standley, P.C. y J.A. Steyermark. 1946. **Flora of Guatemala**. Fieldiana: Botany. Vol.24, part IV. Chicago Natural History Museum.
- Stuber, C.W., J.F. Wendel, M.M. Goodman y J.S.C. Smith. 1988. **Techniques and scoring procedures for starch gel electrophoresis of enzymes from maiza (Zea mays L.)**. Technical Bulletin 286. North Carolina Agricultural Research Service. North Carolina State University. Raleigh, North Carolina.
- Vasek, F.C. y J. Harding. 1976. Outcrossing in natural populations.V. Analysis of outcrossing, inbreeding and selection in *Clarkia exilis* and *Clarkia trembloreensis*. **Evolution** 30: 403-411.
- Villarias-Moradillo, J.L. 1992. **Atlas de malas hierbas**. Volumen I. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.

Warwick, S.I. 1990. Genetic variation in weeds- with particular references to cadanian agricultural weeds, en. S. Kawano, ed. **Biological Approaches and evolutionary trends in plants**. Academic Press. Tokyo, Japan. pags: 3-18.

Weeden, N.F. y J.F. Wendel. 1989. Genetics of Plant Isozymes, en D.E.Soltis y P.S.Soltis, eds. **Isozymes in Plant Biology**. Dioscorides Press. Portland, Oregon. pags 46-72.

Weir, B.S. 1990. **Genetic Data Analysis. Methods for discrete population genetic data**. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts.

Wendel, J.F. y N.F. Weeden. 1989. Visualization and Interpretation of Plant Isozymes, en D.E.Soltis y P.S.Soltis, eds. **Isozymes in Plant Biology**. pags 5-45.

Workman, P.L. y J.D. Niswander. 1970. Population studies on southwestern Indian tribes. II. Local genetic diferentiation in the Papago. **Amer. J. Human Genet.** 22: 24-49.

## APENDICE.

En este apéndice se describen los métodos electroforéticos en geles horizontales de almidón.

Para hacer los geles se procedió de la siguiente manera: Se pesan 40 gramos de almidón de papa hidrolizado para electroforesis Sigma S-4501 y 10 gr de sacarosa, se colocan en un matraz kitazato y se le agregan 400 ml. de buffer de gel del sistema a utilizar. Se agita vigorosamente hasta que todo el almidón quede completamente disuelto. La mezcla se calienta sobre un mechero, sin dejar de agitar, llega un momento, en el que la consistencia cambia y se vuelve transparente y comienza a hervir. Se retirará del fuego y se aplica vacío, hasta que no se formen burbujas. Se vacía inmediatamente en los moldes de acrílico, previamente armados y nivelados, cuidando que queden perfectamente cubiertas las esquinas. Se deja enfriar una hora en el sitio donde se hizo el gel y posteriormente se coloca en el refrigerador por una hora. Se retiran del refrigerador y se envuelven con un material plástico, como Kleenpack, y se dejan a temperatura ambiente hasta que se colocan las muestras.

Las plántulas de *Reseda luteola* se molieron con dos gotas de un buffer de extracción para plantas con contenido bajo en compuestos secundarios (Wendel y Weeden, 1989) en charolas pequeñas de plástico, con ayuda de un cilindro de acrílico. Una vez molidas las plántulas, se colocan en la mezcla entre 4 y 6 pedazos de papel filtro (wicks), previamente cortado, para saturarlos con el homogenado de la plántula y se colocan en tubos eppendorf, para mantenerlas en refrigeración a  $-70^{\circ}\text{C}$ , hasta que se utilizan.

Los geles se desprenden del borde y se les hace un corte a lo largo, aproximadamente entre 4 y 5 cm del borde. Este corte se separa, para colocar las muestras de las plántulas, que generalmente son entre 20 a 24 wicks por gel. En los carriles de los extremos se coloca un papel filtro saturado de un indicador para proteínas (amido black), que sirve como indicador del frente de corrida.

Se unen las dos partes del gel, con los wicks insertados y se aplica la corriente, para esto se une cada uno de los extremos del gel por medio de toallas de celulosa. El extremo largo del gel se conecta a la corriente positiva y el otro a la negativa. Dependiendo del sistema que se utilice, se mantiene constante la corriente o el voltaje. Después de 30 minutos, se retirarán los wicks insertados el en gel, separando las dos partes del gel y uniéndolas con mucho cuidado, se inserta un popote del tamaño del molde en un extremo del gel, para evitar que se formen burbujas de aire. Se deja correr el gel hasta que el indicador ha avanzado unos 8 cm. El gel se corre cubierto con Kleenpack para evitar que se deseque. Para evitar que los geles se calienten, se corren dentro de un refrigerador y se les coloca una bolsa de gelatina congelada, colocando una placa de vidrio entre el gel y la bolsa de gelatina.

Inmediatamente después de correr el gel, se corta el extremo superior hasta donde este el frente de corrida y se desecha este extremo. Las rebanadas del gel se cortan con placas de vidrio, de aproximadamente 3 mm. de alto, obteniendo 4 rebanadas de cada gel. Se realiza una perforación al gel con un popote, para distinguir el punto de origen y el orden de los carriles. Para realizar los cortes, se utilizan las placas de vidrio sostenidas por ligas a los moldes de los geles. Para cortar el gel se utilizó un cortapasteles, que consiste en una cuerda delgada de alambre. Cada rebanada obtenida, se coloca en una caja de plástico y se agregan las soluciones de tinción. Las enzimas se dejaron teñir, hasta que se observaron las bandas y el tiempo requerido para cada enzima varió entre 45 minutos y 12 horas. Las enzimas se leyeron inmediatamente después de la tinción. Posteriormente se enjuagaron con agua destilada y se fijaron en una solución de alcohol etílico al 50% durante 24 horas, en el refrigerador para posteriormente envolverlas en kleenpack y guardarlas en refrigerador, para conservarlas y poder releer.

### **Sistemas de buffers:**

Generalmente se utiliza un buffer para hacer el gel y otro para los recipientes del electrodo. En este trabajo se utilizaron dos sistemas, Litio (sistema C) e Histidina (sistema D) (Stuber et al., 1988).

#### **Sistema de Litio (C):**

El buffer del electrodo consiste en 11.875 gr de ácido bórico (0.19 M) y 1.60 gr de hidróxido de litio (0.04M) por litro. El pH se ajusta a 8.3 con hidróxido de litio.

El buffer del gel consiste en 1 parte del buffer del electrodo y 9 partes de buffer tris pH=8.3.

El buffer tris pH=8.3 consiste en 6.2 gr de trizma-base y 1.5 gr de ácido cítrico por cada litro, el pH se ajusta con ácido clorhídrico concentrado.

Se corre a 225 volts.

En este sistema se tiñeron las enzimas: APX, DIA, y GOT.

### **Sistema de Histidina (D):**

El buffer del electrodo consiste en 10.088 gr de L-Histidina y 1.5 gr de ácido cítrico, por cada litro. El pH se ajusta a 6.5 con ácido cítrico.

El buffer del gel consiste en una parte del buffer del electrodo y 3 partes de agua destilada.

Se corre a 30 miliamperes.

En este sistema se tiñeron las enzimas: IDH, MDH, PGM y SOD.

### **Buffer de extracción:**

50 mM Buffer de fosfatos o Tris-HCl, pH 7.5

5% Sacarosa.

14 mM Mercaptoetanol (0.1% v/v).

### **Las tinciones de las enzimas utilizadas son:**

#### **APX (Peroxidasa anódica).**

Pesar:

3-amino-9-ethylcarbazole      100 mg.

Añadir:

Dimetilformamida            7 ml.

Agua destilada                90 ml.

H<sub>2</sub> O<sub>2</sub> 3%                        1 ml.

CaCl<sub>2</sub> 1%                        2 ml.

1 M NaAc, pH 5                5 ml.

Teñir en la oscuridad y a temperatura ambiente.

### **DIA (Diaforasa).**

Pesar:

Vaso 1: 2-6 diclorofenol-indofenol 4 mg.

Vaso 2: b-NADH                8 mg.

   MTT                8 mg.

(3-[4,5-Dimethylthiazol-1,2-y1]

-2,5 Diphenyltetrazolium.

Vaso 3: Agar                      36 mg.

Añadir:

Vaso 1: Agua (justo antes de teñir) 4 ml.

Vaso 2: 0.025 M Tris-HCl, pH 8.6 30 ml.

Vaso 3: Agua                      36 ml.

Calentar la mezcla del vaso 3, hasta que hierva. Añadir la mezcla del vaso 2, al vaso 1 e inmediatamente mezclar con el vaso 3.

Tenir en la oscuridad e incubar a 37° C.

### **GOT (Glutamato oxaloacetato transaminasa).**

Pesar:

Piridoxal-5-fosfato            4 mg.

Fast Blue BB salt            150 mg.

Añadir:

0.2 M Tris-HCl, pH 7        50 ml.

Sustrato Got                5 ml.

Teñir en la oscuridad. Incubar a 37°C.

### **IDH (Isocitrato deshidrogenasa).**

Pesar:

Vaso 1) Acido isocitríco        100 mg.

Vaso 2) Agar                36 gr.

Añadir:

Al vaso 1:

0.2 M Tris-HCl, pH 8            25 ml.

MgCl<sub>2</sub> 10%                    1 ml.

TPN 1% (B-Nicotinamide adenine 1 ml.

dinucleotide phosphate).

MTT 1% 1 ml.

(3-[4,5-Dimethylthiazol-1,2-y1]

-2,5 Diphenyltetrazolium.

Al vaso 2:

0.2 M Tris-HCl, pH 8 25 ml.

Calentar la mezcla del vaso 2 hasta hervir, e inmediatamente añadir la mezcla del vaso 1.  
Teñir en la oscuridad e incubar a 37°C. Con la tinción de esta enzima, también se obtiene la  
enzima **SOD (Superoxido dismutasa)**.

### **MDH (Malato deshidrogenasa).**

Pesar:

NBT (Nitro blue tetrazolium) 8 mg.

DPN (B-Nicotinamide adenine 8 mg.

dinucleotide)

NaCn 25 mg.

Añadir:

0.2 M Tris-HCl, pH 8 50 ml.

1 M DL-Malato, pH 7.8 5 ml.

PMS 1% (Phenazine methosulfate) 0.1 ml.

Teñir en la oscuridad, a temperatura ambiente.



### **PGM (Fosfoglucosmutasa).**

Pesar:

D-glucosa-1-fosfato 0.075 gr.

Añadir:

1M Tris-HCl, pH 8 10 ml.

MgCl<sub>2</sub> 10% 1 ml.

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 2 ml.

TPN 1% (B-Nicotinamide adenine 1 ml.

dinucleotide phosphate).

MTT 1% 1 ml.

(3-[4,5-Dimethylthiazol-1,2-y1]

-2,5 Diphenyltetrazolium.

PMS 1% (Phenazine methosulfate) 0.2 ml.

Aforar a 50 ml con agua destilada. Teñir a la oscuridad, a temperatura ambiente.

### Las enzimas que se ensayaron fueron:

|   |               |
|---|---------------|
| APX (Peroxidasa)                                    | E.C. 1.11.1.7 |
| ACO (Aconitasa)                                     | E.C. 4.2.1.3  |
| AcPH (Fosfatasa ácida)                              | E.C. 3.2.3.2  |
| ADH (Alcohol deshidrogenasa)                        | E.C. 1.1.1.1  |
| ADK (Adenilato quinasa)                             | E.C. 2.7.4.3  |
| ALD (Aldolasa)                                      | E.C. 4.1.2.13 |
| CAT (Catalasa)                                      | E.C. 1.11.1.6 |
| CPX (Peroxidas catódica)                            | E.C. 1.11.1.7 |
| DIA (Diaforasa)                                     | E.C. 1.6.99   |
| EST (Esterasa)                                      | E.C. 3.1.1.-  |
| GDH (Glutamato deshidrogenasa)                      | E.C. 1.4.1.3  |
| G-3PDH (Gliceraldehído-3-fosfato<br>deshidrogenasa) | E.C. 1.2.1.12 |
| GPT (Glutamato piruvato transaminasa)               | E.C. 2.6.1.2  |
| G-6PD (Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa)            | E.C. 1.1.1.49 |
| GOT (Glutamato oxalacetato transaminasa)            | E.C. 2.6.1.1  |
| HEX (Hexoquinasa)                                   | E.C. 2.7.1.1  |
| IDH (Isocitrato deshidrogenasa)                     | E.C. 1.1.1.41 |



BIBLIOTECA  
CENTRO DE ECOLOGIA

*Imprenta BOLIVAR*  
Bolívar 290-A, Col. Obrera  
Tels. 578 68 66 761 40 64