

200
29



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"ESTRUCTURA GENETICA DE POBLACIONES
DE *Bursera cuneata* (BURSERACEAE)"

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 :

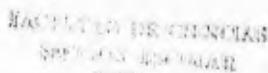
MARIA DEL VALLE CASTILLO



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM



DIRECTOR DE TESIS: DR. JUAN NUÑEZ FARFAN



MEXICO, D. F.
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: " Estructura genética
de poblaciones de *Bursera cuneata* (Burseraceae)".

realizado por María Del Valle Castillo

con número de cuenta 8955720-8 pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. Juan Núñez-Farfán

Propietario Dr. Luis E. Eguiarte Fruns

Propietario Dr. Daniel Piñero Dalmau

Suplente Dra. Elena Alvarez-Buylla

Suplente M. en C. Nidia Pérez Kasser

Consejo Departamental de Biología

INDICE.

Resumen	II
Agradecimientos	III
Introducción	I
Objetivos	9
Especie de estudio	10
Material y métodos	14
Resultados	25
Discusión	30
Conclusiones	39
Bibliografía	41
Apéndice	48

RESUMEN.

En este trabajo se estudió la variación y estructura genética para poblaciones de *Bursera cuneata*, utilizando electroforesis de enzimas en geles de almidón.

El análisis de la estructura genética se realizó con datos de siete loci. Los resultados obtenidos indican que las tres poblaciones estudiadas están estructuradas. Los valores de F_{is} sugieren que existe endogamia. La diferenciación genética entre las poblaciones es el resultado de cambios en las frecuencias de los genes y pérdida de alelos. Este proceso pudo haberse generado a partir de la colonización de habitats nuevos por *Bursera cuneata*.

Para *Bursera cuneata* existe un patrón de diferenciación genética con distancia geográfica.

AGRADECIMIENTOS.

Esta tesis fue realizada bajo la dirección del Dr. Juan Núñez Farfán a quien agradezco todo su apoyo y comprensión. Gracias también por las innumerables revisiones que hizo a mi trabajo de tesis, sus atinados comentarios y sabios consejos. Sin su ayuda y motivación esta tesis no hubiera sido posible.

Al Dr. Luis Eguarte Fruns, le agradezco todo el entusiasmo y su solidaria participación en las salidas al Pedregal. Quiero agradecerle de una manera muy especial, todo el tiempo que dedico a la revisión del manuscrito, así como la valiosísima ayuda en la elaboración de los cálculos y su orientación en las lecturas preliminares de los geles.

A Nidia Pérez quiero agradecerle el que me haya adoptado en el laboratorio de Genética y toda la ayuda que me brindo en el tiempo que duró mi invasión. Gracias también por toda la paciencia, por ayudarme siempre en las electroforesis y por haber aceptado ser mi sinodal.

A la Dra. Elena Alvarez-Buylla quiero agradecerle de una manera particular el haber sido la primera junto con Daniel en convencerme de que mis geles no eran "sismogramas". Gracias por las revisiones que hizo a mi tesis, por sus valiosísimos comentarios y por toda la confianza que siempre me ha tenido.

Al Dr. Daniel Piñero quiero agradecerle toda la confianza y la paciencia, así como también todo lo que me ha enseñado. Gracias por adentrarme en los oscuros terrenos de la estadística, sus truquitos y las distancias geográficas: ahora sabemos a lo que equivale una milla náutica. Pero sobre todo gracias por todo su tiempo, su apoyo, sus consejos y su cariño. Además los dos le vamos a los Pumas.

A toda la gente del laboratorio de Genética Ecológica y Evolución, así como también a 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. Gracias a: Lalo Morales y Erika Aguirre (que les puedo decir si me conocen desde la vaca Juana y siempre me han brindado su amistad), América, Oscar, Fabián, Amelia Cornejo, Juan Fornoni (porque ya casi es de la familia, por sus ricas comidas y por la solidaria ayuda en la edición y en tirar la basura por las mañanas), Lalo Cuevas y Chucho

En una ocasión como esta, aún y cuando no todos esten de acuerdo, uno no puedo dejar pasar la oportunidad de dar las gracias a toda la gente importante que uno tiene en la vida

A Elleli porque es mi amiga, mi hermana y mi editora en la vida y porque sin ella de verdad que esta tesis no hubiera sido posible. Gracias por estar siempre presente, por toda su ayuda, su confianza y sus sonrisas.

A Yuriria porque apareció en mi vida en 1974 pelirroja y con los ojos azules y desde entonces somos cómplices, llevamos el mismo apellido y lo hemos compartido todo (menos los hombres, los caballos y los perfumes).

A mi mamá por todo lo que me quiere y me consiente, porque desde antes de saber si iba a ser María o Emiliano ha creído en mí, me ha apoyado en todo y no ha hecho otra cosa que buscar mi felicidad. Además todos sabemos que es la mejor fotógrafa por la democracia.

A Jorge Del Valle porque nada me hace más feliz que ser su hija, porque me enseñó a andar en bicicleta y nunca imaginó lo que eso años después ocasionaría. Porque es el mejor negociador del mundo y además es uno de mis tres hombres favoritos.

A Gonzalo Pino porque sabe como yo que no sólo de las metáforas surge el amor, porque a veces pasan angeles por la via del tren del periferico y las flores, porque todo empezó con un domingo bicicletero, por todo lo compartido, por todo lo que lo quiero y porque finalmente gracias a sus ausencias pude acabar esta tesis

A Chirrinchin porque de premio me llevó a Nueva York, porque me sirvió en un vasito chiquito y porque es otro de mis tres hombres favoritos.

A Miguel porque aunque el no lo acepte me retó, porque cada viernes barriamos el subconsciente, disminuía el amperaje y me ayuda entender tanto "delirio biológico"; además siempre ha pensado que debí de haber sido actriz o psicóloga.

A Maite por toda su amistad, su cariño y sus maravillosos emails, por todas las jornadas democráticas y por ser mi otra hermana.

A la güerita porque me presentó a su hermano y es la culpable de que ahora seamos familia; lo cual me congratula enormemente.

Finalmente quiero dedicar con especial cariño esta tesis al Ingeniero Cuauhtémoc Cárdenas porque a veces las razones son simplemente porque sí y porque durante todos estos años ha luchado y dibujado el país en el que queremos vivir.

INTRODUCCION.

La variación genética de las poblaciones naturales ha sido ampliamente estudiada desde los años sesenta (Lewontin, 1974; Hedrick, 1983) y se ha descubierto que muchas especies tienen niveles relativamente altos de variación. Existen ya generalizaciones respecto a la cantidad de variación genética en las poblaciones naturales, por ejemplo, se ha encontrado que las poblaciones de especies arbóreas presentan niveles más altos de variación genética que las especies herbáceas. También, las plantas que se entrecruzan presentan niveles intrapoblacionales de variación génica mucho más altos que las plantas que se autofertilizan, y las especies con sistemas mixtos de apareamiento presentan niveles intermedios de variación. Finalmente, aquellas especies cosmopolitas o con distribuciones tropicales son mucho más variables que las especies en hábitats especializados o con distribuciones templadas. (Hamrick, Linhart y Mitton, 1979; Loveless y Hamrick, 1984). Encontrar las causas de estos patrones de variación genética es un objetivo fundamental de la genética de poblaciones.

Genética de Poblaciones.

Dentro de este objetivo general, la genética de poblaciones tiene dos objetivos particulares: a) describir los niveles de variación genética dentro y entre poblaciones usando para esto tanto las frecuencias alélicas como las genotípicas y b) tratar de hacer inferencias acerca de las fuerzas que afectan esta variación, tales como la selección natural, deriva génica, mutación, migración y sistemas de apareamiento (Hedrick, 1983; Eguiarte, 1986).

La genética de poblaciones es una disciplina que trata de explicar, en términos cuantitativos y predictivos, el proceso de adaptación biológica, así como la base genética de esta adaptación. Los genetistas de poblaciones han definido evolución como el cambio en las frecuencias alélicas. En este contexto, cualquier fuerza o fenómeno que haga que cambien estas frecuencias alélicas genera evolución (Eguiarte, 1986). Este cambio sucesivo en las frecuencias alélicas puede provocar un incremento en la adaptación de los organismos al medio ambiente en donde se encuentran (Hartl y Clark, 1989).

Genética de poblaciones de plantas tropicales.

Muchos autores opinan que la preservación de los recursos genéticos es la clave de la conservación, ya que la pérdida de la diversidad genética dentro de las especies incrementa la posibilidad de extinción (Ehrlich, 1988). Las estimaciones que se han hecho sobre la diversidad genética en las plantas tropicales son escasas, y los estudios comparativos sobre la pérdida de esta diversidad antes y después de una perturbación son aún más escasos (Oyama, 1993).

Los estudios comparativos sobre la distribución geográfica de las plantas muestran que las especies con una distribución geográfica restringida por lo general presentan bajos niveles de diversidad genética (Karron, 1987). Sin embargo, no es posible saber si la especificidad en el hábitat es una causa o una consecuencia de los bajos niveles de variación genética. Muchos autores opinan que los factores históricos pueden explicar de mejor manera los niveles de variación de especies vegetales con diferentes tipos de distribución geográfica (Hamrick et al, 1979). Por ejemplo, la distribución geográfica

restringida observada en algunas especies puede ser el resultado de una reducción en su tamaño poblacional o de un origen y dispersión reciente (formando muchas poblaciones pequeñas).

Se han hecho estimaciones de la diversidad genética en diferentes poblaciones de plantas utilizando análisis de isoenzimas (Hamrick y Godt, 1990). La técnica de electroforesis en geles es actualmente un muy buen método para detectar la variación genética y de esta manera poder utilizar, explorar y conservar los recursos genéticos disponibles; de la misma manera, para la realización de estudios de diferenciación, especiación y análisis de reconstrucción filogenética (Hamrick et al., 1991).

Uno de los primeros reportes de variación aloenzimática en plantas tropicales fue el realizado para distintas especies de *Lycopersicon* en América del Sur (Rick et al., 1976). En este estudio se reportan valores de polimorfismo a nivel de individuo, población y especie, asimismo se describen las relaciones existentes entre los sistemas de apareamiento y la variación genética. Para árboles tropicales uno de los primeros estudios fue el de Gan et al. (1977) quienes encontraron que las poblaciones de *Shorea leprosula* y *Xerospermum intermedium* presentan altos niveles de polimorfismo genético en la península de Malasia.

Sin embargo, los estudios más amplios en plantas tropicales han sido los realizados por Hamrick y sus colegas en 29 diferentes especies de árboles de la Isla de Barro Colorado, Panamá (Hamrick y Loveless, 1986, 1989). En este trabajo encontraron que los niveles de heterocigosis son comparables a aquellos reportados para otras dicotiledóneas,

aún cuando la variación genética dentro de las poblaciones es más alta que la que normalmente presentan otras leñosas (particularmente coníferas). Un aspecto importante es que los índices de diferenciación genética entre las poblaciones son bajos debido a un alto flujo génico (Hamrick y Loveless, 1989).

En un estudio reciente realizado con el árbol *Cordia alliodora* (Chase et al., 1995) se encontró que el nivel de la diversidad genética dentro de las poblaciones es comparable al valor promedio reportado para plantas regionales, sucesionales, polinizadas por animales; sin embargo, este valor resultó ser menor al reportado para las especies tropicales de amplia distribución.

Resultados similares han sido reportados antes para otras plantas tropicales. En trabajos realizados en la selva alta perennifolia de los Tuxtlas, Veracruz, México con la palma *Astrocaryum mexicanum* (Eguiarte et al., 1992) y el árbol del dosel medio *Psychotria faxlucens* (Pérez-Nasser et al., 1993), los autores encontraron altos niveles de heterocigosis y poca diferenciación genética entre las poblaciones. En el caso del árbol pionero *Cecropia obtusifolia* (Alvarez-Buylla et al., 1994) los autores reportan distintos niveles de heterocigosis que se incrementan a lo largo del ciclo de vida, sin embargo, estos valores caen en el rango de los encontrados para árboles tropicales. Tanto en *Astrocaryum mexicanum* como en *Cecropia obtusifolia* existe evidencia de selección actuando en las primeras etapas del ciclo de vida.

Finalmente, los patrones que presentan los árboles tropicales como son los altos niveles de variación genética y los pequeños niveles de diferenciación geográfica, pueden

deberse a que existe mucho movimiento de polen y semillas (flujo génico) entre las poblaciones. Otra causa que podría estar generando este patrón es que las poblaciones se hayan fundado recientemente y la deriva génica y/o selección natural han tenido poco o ningún efecto en ellas (Slatkin, 1987)

Implicaciones para la conservación de árboles tropicales.

En el diseño de estrategias de conservación de la diversidad genética de las especies son importantes tanto los datos demográficos como los datos genéticos (Eguiarte y Piñero, 1990). Debido a que es difícil conservar todo, es necesario jerarquizar y establecer prioridades.

Las especies con distribuciones geográficas restringidas, bajas densidades y que crecen en hábitats muy específicos y aislados, son más propensas a experimentar los efectos de la deriva génica y a presentar altos niveles de divergencia poblacional, en comparación con aquellas especies con poblaciones grandes, ampliamente distribuidas y que se encuentran menos aisladas (Godt y Hamrick, 1993). No obstante, este patrón de estructura genética puede modificarse dependiendo de los niveles de flujo génico que ocurran dentro y entre las poblaciones, y del sistema de cruzamiento predominante de la población. Las especies que estén dentro de la primera categoría son las que potencialmente están en peligro de desaparecer y en consecuencia son las más urgentes a estudiar y conservar.

La erosión de la variación genética dentro de las especies por fragmentación o alteración del hábitat tiene consecuencias importantes en la poza génica de la población. Si

los resultados de los estudios de la variación genética en las plantas tropicales son una regla general para todas las especies pertenecientes a esta categoría, muchos genotipos con distribución específica pueden desaparecer al haber fragmentación, disminuyendo la riqueza de la poza génica de la población (Oyama, 1993)

Los estudios genéticos que se han hecho con marcadores isoenzimáticos han sido de mucha ayuda para poder dilucidar los sistemas de apareamiento de poblaciones arbóreas para las cuales es difícil observar a los polinizadores. El conocimiento de estos sistemas de apareamiento provee la información básica para determinar los grupos de apareamiento existentes en los bosques y selvas y, de esta manera, hacer planes congruentes para la conservación de los árboles tropicales (Oyama, 1993)

En los últimos años los intentos que se han hecho para caracterizar la variación genética en las poblaciones naturales son a una escala local, o en poblaciones que se encuentran muy cercanas entre sí (Hamrick y Loveless, 1986, 1989; Hamrick y Godt, 1990). El hecho de ampliar el rango de la escala geográfica permite de alguna manera analizar la relación existente entre los caracteres genéticos observados y los parámetros ambientales (Chase et al., 1995).

Las especies tropicales de selvas secas han sido menos estudiadas que las de los trópicos húmedos y hasta la fecha son pocos los estudios realizados que se enfocan a evaluar cómo es el conocimiento de la variación encontrada en las poblaciones naturales puede ser utilizado para la conservación (Oyama, 1993). Sin embargo, este tipo de estudios pueden dar información muy precisa sobre cómo está organizada espacial y

temporalmente la variación genética, la cual está relacionada con la ecología de las plantas. Esto permite diseñar metodologías más adecuadas para coleccionar germoplasma en donde exista la mayor variación genética posible y de esta manera tener un mejor manejo y conservación de las áreas naturales (Brown, 1978; Frankel y Soulé, 1981).

Estimadores de la variación genética.

Con la técnica de electroforesis se pueden obtener los datos básicos para estimar la variación genética. Estos estimadores cuantifican el porcentaje de loci polimórficos por población (P), el número efectivo de alelos por locus (N_a), y la proporción promedio de individuos heterocigos por locus (H) (Crow y Kimura 1970; Hedrick 1983; Hamrick y Loveless 1986; Nei 1987). El polimorfismo se refiere a la existencia de diferentes formas genéticas de un gene en una misma población, y toma valores entre cero y uno. Si es cero no existe variación genética. Entre más alto, mayor es la variación, hasta llegar a uno donde todos los genes analizados son polimórficos; es decir, todos los genes tienen dos o más formas alternativas. La heterocigosis se refiere a la proporción de genotipos diploides compuesto por dos alelos distintos (Hedrick 1983). Este índice se obtiene a partir del promedio de la heterocigosis esperada en el equilibrio de Hardy-Weinberg para todos los genes estudiados en la población. Toma valores que van de cero, cuando no se registra variación en ninguno de los genes estudiados, a uno, cuando todos los loci son polimórficos, tienen un número infinito de alelos (o muy grande) y las frecuencias de los alelos son iguales. El número de alelos es el promedio aritmético de alelos por locus, y el número efectivo de alelos es el inverso de la homocigosis teórica. Este último índice toma

en cuenta la abundancia de cada alelo, los muy raros tienen poco peso y los comunes mucho (Hedrick, 1983).

Sistema de estudio.

El género *Bursera* posee características especiales que lo hacen único para estudios de evolución tanto a nivel de genética de poblaciones, como en el análisis de evolución fenotípica de caracteres de importancia ecológica. Dentro del género hay cerca de cien especies endémicas de México, lo cual indica que muchos de los eventos de especiación han ocurrido aquí. En éste estudio se trabajó con *Bursera cuneata* (Figura 1).

La presencia de un gran número de taxa congénicos en distintos grupos sugiere que las tasas de especiación son mucho más altas en los lugares tropicales que en cualquier otro sitio (Bawa, 1992). Como parte de un proyecto que intenta analizar el proceso de especiación y los patrones que genera, se decidió iniciar los estudios con el análisis de la estructura genética de una especie de distribución amplia. En este sentido el presente trabajo pretende establecer los sistemas de electroforesis y loci más adecuados para hacerlos extensivos a otras especies o a complejos de especies dentro del género.

OBJETIVOS.

1. Establecer los sistemas electroforéticos adecuados para el análisis de genética de poblaciones de la especie *Bursera cuneata*.
2. Estimar los niveles de variación genética a través de la heterocigocis esperada y la proporción de loci polimórficos, así como el número promedio de alelos por loci en tres poblaciones de *Bursera cuneata* en México , usando marcadores enzimáticos.
3. Describir la estructura genética de tres poblaciones de *Bursera cuneata* por medio de los estadísticos F de Wright y discutir sus implicaciones evolutivas y para la conservación.

LA ESPECIE DE ESTUDIO: *Bursera cuneata* (Schlecht.) Engl. Burseraceae.

Arbol (o a veces arbusto) dioico, hasta de 10 m de alto, resinoso, tomentoso en sus partes verdes; presenta un tronco hasta de 40 cm de diámetro, con corteza gris o gris rojiza, no exfoliante la cual hace que la especie pertenezca al grupo de los "copales", sección *Bullockia* (Rzedowski y Guevara-Féfer, 1992).

Presenta ramillas lignificadas de color rojizo, glabras, hojas con (3) 5 a 9 (13) folíolos, peciolo de 1 a 3 cm de largo, tomentoso-puberulo, el raquis angosta a anchamente alado, folíolos sésiles o con peciólulos hasta de 3 mm de largo, oblongos a lanceolados, elípticos u ovalados, el terminal a veces oblanceolado, de (1) 2 a 6.5 cm de largo y (0.59) 0.7 a 2.3 cm de ancho, los del par inferior a menudo mucho más pequeños que los demás, por lo general agudos en el ápice, obtusos a cuneados en la base, margen toscamente aserrado, los dientes (6) 10 a 30 de cada lado, desiguales, algunos escotados en el ápice, con (6) 10 a 18 pares de nervaduras laterales distalmente bifurcadas o a veces más profusamente ramificadas, impresas en el haz, prominentes en el envés, de textura coriácea, conspicuamente reticulado-venosos, sobre todo en el haz que tiene un aspecto rugoso. El haz es verde, cortamente hirsuto, los pelos originándose de una base ampuliforme y el envés es densamente blanquesino-grisáceo-tomentoso.

Las inflorescencias tienen forma de panículas abiertas y se originan en los ápices de ramas cortas o lateralmente en ramas largas.

La presencia de conjuntos de catáfilos, agrupados en forma de roseta alrededor de conjuntos de hojas tiernas, se señala como carácter diferencial de la sección *Bullockia*, en

contraste con la sección *Bursera*. Los catáfilos van de oblongos a triangulares y miden de 3 a 15 mm de largo, son tomentosos en ambas caras y deciduos. Están dispuestos a manera de rosetas en los brotes tiernos localizados sobre los extremos de las ramas, alrededor de los conjuntos de hojas normales.

Las flores masculinas son numerosas y se encuentran en panículas que miden hasta 8 cm de largo y 4 cm de ancho, hirsuto-tomentosas, presentan pedicelos hasta de 4 mm de largo, bracteolas subuladas, de aproximadamente 2 mm de largo; flores tetrámeras, lóbulos del cáliz linear-triangules, de 2 a 4 mm de largo, hirsuto-pubérulos, pétalos blanquecinos, oblongos, de 2.5 a 4 mm de largo, hirsuto-pubérulos por fuera, más o menos cuculados; estambres todos aproximadamente al mismo nivel o bien 4 más largos alternando con cuatro más cortos, filamentos de 1.2 a 1.8 mm de largo, anteras ovado-oblongas, de 0.6 a 0.8 mm de largo, las inflorescencias femeninas similares a las masculinas, pero sólo de 1 a 2 cm de largo, sus flores también similares, anteras de los estaminodios de 0.5 mm de largo, ovario bitocular, glabro; infrutescencias sobre pedúnculos hasta de 7 cm de largo, a menudo puntiaguda en el ápice, glabra, rodeada en la base por el cáliz persistente, el hueso recubierto casi totalmente por un pseudoarilo atarrajado o amarillento (de un lado un poco más grande que el otro). la parte descubierta negra. Las características de sus granos de polen atestiguan un síndrome de polinización principalmente entomófila (Rzedowski y Kruse, 1979), sus polinizadores y dispersores son insectos pequeños como abejas y moscas, aunque hay reportes de polinización por lepidópteros (A. Búrquez, com. pers.).

Esta especie es componente del bosque tropical caducifolio y de la vegetación secundaria derivada del mismo, a veces penetrando en encinares contiguos; es frecuente en "malpais" o corrientes de lava basáltica en el norte de Michoacán, donde a menudo es de porte arbustivo. *B. cuneata* está cercanamente relacionada con *Bursera copallifera*, y parece ocupar el piso altitudinal inmediatamente superior. Se distribuye en los bordes más altos de la depresión del Balsas (entre los 1000 y los 1800 m) formando parte de las asociaciones características de climas más frescos del bosque tropical caducifolio que en varios casos se encuentran traslapadas con los encinares. Sus áreas de distribución parecen conformar así un anillo en los bordes de la depresión del Balsas. Algunas veces también ha sido colectada en las partes bajas de la depresión aunque parece ser que las poblaciones que ahí existen presentan menor abundancia y sólo se les encuentra en ciertas regiones (Toledo, 1982), en la Sierra Madre del Sur y el eje Volcánico Transversal, y llega más allá del Valle de México, en los estados de Guanajuato, Hidalgo, Estado de México, Distrito Federal, Michoacán, Morelos y Guerrero. Se ha colectado entre los 1300 m y los 2200 m de altitud (Figura 2).

En México, las especies de *Bursera* comienzan a florecer al final de la época de secas (abril a junio), justo antes o al mismo tiempo que la aparición de las nuevas hojas. *Bursera cuneata* florece de mayo a julio y permanece con follaje de mayo a noviembre (Mc Vaugh y Rzedowski, 1965).

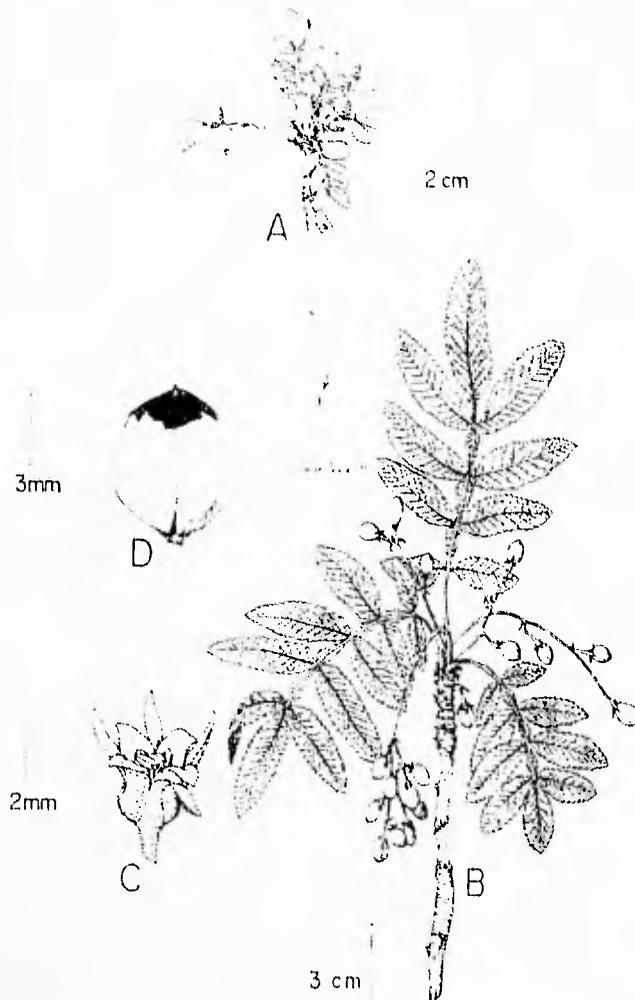


Figura 1. *Bursera cuneata* (Schlecht.) Engl.: A. rama con hojas jóvenes e inflorescencias; B. rama con infrutescencias; C. flor masculina, D. hueso. Ilustrado por Rodrigo Talavera (Tomado de Rzedowsky y Guevara, 1992).

MATERIAL Y METODOS

Colecta

Se colectó tejido foliar de al menos 30 individuos en tres poblaciones distintas: dos de ellas pertenecientes al Valle de México, una en la Reserva ecológica del Pedregal de San Angel, D.F., y otra en el Chichinautzin, Morelos, una tercera se colectó en el estado de Guerrero, en la Reserva ecológica de Omiltemi, que es la única localidad conocida de la especie en el estado de Guerrero (Jimenez et al , 1993) (Tabla 1)

Los individuos colectados eran adultos en la mayoría de los casos aunque también se colectaron individuos juveniles, cuyo sexo no fue identificado en las poblaciones donde no hubo suficientes adultos.

Procesado de las muestras

Las muestras se utilizaron para el análisis electroforético siguiendo la técnica descrita en Garay (1991), obteniendo el genotipo de cada enzima para cada uno de los individuos pertenecientes a cada población.

Los tejidos foliares fueron macerados con gotas de un buffer de extracción de *Abies* (ver apéndice), que fue seleccionado después de hacer varias pruebas con otros distintos buffers especiales que se recomiendan para la extracción de proteínas en plantas con un alto contenido de compuestos secundarios. El macerado fue absorbido en pedacitos de papel para cromatografía (Whatman de número 17) aproximadamente de medio centimetro de ancho y un centimetro de largo (wicks) Generalmente de cada hoja

se obtuvieron entre 5 y 6 wicks, estos se guardaron en tubos Eppendorf en un ultracongelador (Reveco, a -70°C) para su posterior uso

Montado de los geles

Las muestras obtenidas fueron cargadas en geles de almidón de papa hidrolizado para electroforesis al 12 %. En cada gel se cargaron alrededor de 30 wicks (cada uno representando a un individuo de la población), y en ambos extremos del gel se colocó un wick con un indicador (colorante, ver Apéndice) El corrimiento del gel se hizo bajo un amperaje o voltaje específico, dependiendo de las características de los buffers utilizados para la charola (una solución ionizada que conduce la corriente eléctrica a través del gel), y para la preparación del gel (ver Apéndice).

Sistemas electroforéticos

Generalmente se utiliza un buffer para hacer el gel y otro para los recipientes del electrodo. En este trabajo se probaron siete diferentes sistemas, de los cuales finalmente sólo se utilizaron tres, y un total de dieciocho enzimas de las cuales únicamente seis fueron utilizadas para el análisis por presentar una resolución clara y consistente en su lectura (ver Tabla 2). Se hicieron tres geles para cada sistema de buffer

Tinción

Cuando el indicador del gel recorrió una distancia de aproximadamente 8 cm a partir del origen, el gel se cortó sagitalmente, obteniéndose 3 rebanadas de uno de los geles (sistema R; Apéndice), para ensayar 3 enzimas, dos rebanadas de otro gel (sistema PP; Apéndice)

para ensayar 2 enzimas, y 1 rebanada de otro gel (sistema MC, Apéndice) para ensayar 1 enzima. Cada rebanada se colocó en una caja de tinción, a la que se le agregaron los reactivos específicos para la tinción de cada enzima (ver Apéndice)

Al sumergirse el gel en la solución para la tinción, los sustratos y otros compuestos requeridos difunden por el gel y reaccionan con la enzima bajo estudio. La detección de esta enzima se basa en la precipitación de indicadores solubles que tiñen el gel en las zonas de actividad enzimática (Wendel y Weeden, 1989)

Una vez puesta la solución de tinción sobre cada rebanada del gel, éstos se incubaron en la oscuridad y a 37 °C o a temperatura ambiente, dependiendo de la enzima (Apéndice). Posteriormente los geles teñidos se fijaron en una solución de alcohol al 50% durante 12 horas en el refrigerador.

Interpretación de los geles

Los geles teñidos presentan un patrón de bandas. De éste patrón se puede obtener el genotipo de cada enzima para cada individuo.

En un locus, el número de bandas que se observan depende de si los individuos son homocigos o heterocigos, y de la estructura cuaternaria de la enzima. Si la enzima es monomérica, los individuos homocigos presentan una banda y los heterocigos dos, si es dimerica los heterocigos presentan tres bandas y si es tetramérica cinco (ver Wendel y Weeden, 1989).

Para realizar la lectura de las bandas se numeraron los loci y los alelos; se asignó el número 1 al locus más alejado del origen, con mayor movilidad electroforética, el número 2 al siguiente y así sucesivamente. De la misma manera, la banda de un locus que estuviera más alejado del origen se tomó como el alelo 1. Previamente se constató que para todas las poblaciones los patrones de bandeo de las enzimas utilizadas fueran iguales.

Análisis de datos

Se obtuvieron las frecuencias alélicas para 7 loci (seis enzimas) y se realizó una prueba de G para analizar la heterogeneidad de las frecuencias alélicas (Sokal y Rolf, 1981)

Para estimar la variación genética en las diferentes poblaciones, se obtuvieron las siguientes medidas:

-Proporción de loci polimórficos (P): $P = x/m$, donde x es el número de loci polimórficos en una muestra de m loci (Hedrick, 1983). Un locus se consideró polimórfico, si la frecuencia del alelo más común no excedía 0.95. P toma valores entre 0 y 1. Si el valor es de 0 no existe variación genética, hasta llegar a 1, donde todos los genes analizados son polimórficos.

-Heterocigosis promedio esperada, (H): la heterocigosis esperada si la población está en el equilibrio de Hardy-Weinberg. Para un locus con n alelos puede calcularse como (Hedrick, 1983):

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

donde p_i es la frecuencia de individuos homocigos para ese locus. Posteriormente se obtuvo una heterocigosis promedio por población con las heterocigosis esperadas para todos los loci estudiados. Este índice puede tomar valores de 0 cuando no existe variación a 1 cuando todos los loci tienen variación.

Para hacer una descripción de la estructura genética dentro y entre las poblaciones se estimaron el índice de fijación F y los estadísticos F de Wright (F_b , F_t y F_{st})

-El índice de fijación F de Wright examina si las frecuencias alélicas de un locus se desvían de las esperadas. Esto se hace calculando la desviación de la frecuencia observada, de la frecuencia de heterocigos esperada bajo Hardy-Weinberg (Hedrick, 1983):

$$F = 2pq - (H / 2pq) = 1 - (H / 2pq)$$

donde H es la proporción de heterocigos observados y $2pq$ es la proporción de heterocigos esperados. Si su valor es de 0 entonces la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg. Los valores positivos indican una deficiencia de heterocigos, mientras que los negativos indican un exceso.

Los estadísticos F de Wright describen el arreglo de la variación genética en una población subdividida.

- F_{st} es una medida de la diferenciación genética entre subpoblaciones y toma valores de 0 a 1. Se puede calcular como: (Nei, 1987; Hedrick, 1983).

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

donde H_s es la heterocigosis promedio esperada sobre todos los loci a nivel subpoblación y H_t es la heterocigosis promedio esperada sobre todos los loci a nivel de la población total (Hedrick, 1983).

$-F_{is}$ y F_{it} son medidas de la desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg dentro de las subpoblaciones y en la población total respectivamente, los valores positivos de estos índices indican una deficiencia de heterocigos y valores negativos indican un exceso (Hedrick, 1983).

F_{is} y F_{it} se pueden obtener mediante las siguientes fórmulas:

$$F_{is} = (H_s - H_o) / H_s = 1 - (H_o / H_s)$$

$$F_{it} = (H_t - H_o) / H_t = 1 - (H_o / H_t)$$

donde H_o heterocigosis promedio observada sobre todos los loci, a nivel subpoblación; H_s es la heterocigosis promedio esperada sobre todos los loci a nivel subpoblación y H_t es la heterocigosis promedio esperada sobre todos los loci a nivel de toda la población (Hedrick, 1983).

Los estadísticos F de Wright pueden sugerir los posibles procesos evolutivos que están causando la diferenciación genética de las poblaciones.

Estos estadísticos fueron calculados con el programa Biosys (Swofford y Selander, 1989) que permite analizar las proporciones de heterocigotos a tres niveles de

complejidad, dentro de cada subpoblación (F_{is}), entre subpoblaciones (F_{st}) y en la población completa (F_{it}).

También se calcularon los estadísticos equivalentes: F (F_{it}), ϕ (F_{st}) y f (F_{is}) (Weir y Cockerham, 1984). Los estimados de Weir y Cockerham por vez primera, asignan peso, al número de individuos y al número de localidades muestreadas. Por ello los estimadores que se generan no tienen sesgo. El modelo parte de la premisa de que un número r de poblaciones del mismo tamaño han descendido en forma independiente de una sola población ancestral que estaba en equilibrio de Hardy-Weinberg y de ligamiento. En consecuencia, las poblaciones se mantienen bajo las mismas condiciones y las diferencias observadas tienen que ver con el muestreo genético entre generaciones y el estadístico de los individuos. Así, los estadísticos diferirán de los parámetros por múltiplos de las frecuencias alélicas esperadas. Básicamente, la ventaja que presenta es que se corrige el sesgo que puede haber al trabajar con tamaños poblacionales pequeños. El cálculo de estos estimadores se hizo con un programa de computación (Weir 1990, adaptado por A. Chaos y E. Alvarez-Buylla)

Para saber la probabilidad de que F , F_{it} y F_{is} , fueran estadísticamente diferentes de cero, se aproximaron al estimador $F^2 N (K - 1)$, distribuido como chi-cuadrada con $K (K - 1) / 2$ grados de libertad, donde N es el tamaño de la muestra y K es el número de alelos (Eguiarte, 1990). De la misma manera la significancia de los valores de F_{is} se estimó como $2N F_{is} (K - 1)$ distribuido como chi-cuadrada con $(K - 1) (s - 1)$ grados de libertad, donde

N es el tamaño de la muestra, K el número de alelos y s el número de subpoblaciones (Workman y Niswander, 1970).

-Se obtuvo una estimación indirecta del flujo génico (Nm) utilizando la fórmula de Crow y Aoki (1984), que toma en cuenta el número de subpoblaciones

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

donde N es el tamaño de la población, m es la fracción de N remplazada por migrantes y $a = (n / (n - 1))^2$, donde n es el número de subpoblaciones. Cuando n es grande, la ecuación anterior es igual a la utilizada por Wright (Crow y Aoki, 1984)

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

La fórmula de Crow y Aoki establece dos propiedades muy relevantes de la F : que es casi independiente de la tasa de mutación y del número de subpoblaciones usadas. Slatkin y Barton (1989) demuestran también que es poco afectada por distintos tipos de selección y consideran a éste como uno de los mejores métodos para estimar el flujo génico indirectamente. Las distintas fórmulas para evaluar la F también pueden afectar la estimación de la Nm . El método de Nei (1987) tiende a sobreestimar la F y por lo tanto subestima la Nm , mientras que el método de Weir y Cockerham (1984) sobrestiman el flujo génico si el valor de Nm es muy grande.

-A partir de las frecuencias alélicas se calculó otra medida indirecta de flujo génico (\hat{M}) entre pares de poblaciones, bajo un modelo de islas (Slatkin, 1993):

$$= (1 - F_{st}) / 4 F_{st}$$

El cálculo de \hat{M} puede hacerse también con G_{st} (Nei, 1973). Sin embargo la definición de esta medida no considera las diferencias en el tamaño muestral y en algunos casos puede llegar a subestimar los niveles de flujo génico.

- Finalmente se calculó el flujo génico con un tercer método indirecto: el de los alelos únicos o privados (Slatkin, 1985). Este método utiliza las frecuencias de los alelos raros que se encuentran sólo en una de las poblaciones que se muestrean, $p(l)$, y se basa en la idea intuitiva de que si hay mucho flujo, los alelos raros van a estar en frecuencias alélicas muy bajas (dadas que por el mismo flujo, los alelos comunes los comparten), por lo tanto entre más alta sea la frecuencia promedio de los alelos raros, menos flujo génico. Para valores intermedios de flujo génico la relación entre $p(l)$ y Nm es aproximadamente (Slatkin, 1985) :

$$\ln(p(l)) = a \ln(Nm) + b$$

donde $p(l)$ es la frecuencia alélica promedio de los alelos que sólo están en una población, $a = -0.505$ y $b = -2.440$.

A pesar de que el método de los alelos privados es en teoría tan confiable como la F_{st} , este método es más sensible a errores de muestreo (Slatkin, 1994). Un alelo que se encuentra en sólo una población puede estar presente en otras poblaciones cercanas que no fueron muestreadas dando como resultado alelos aparentemente exclusivos.

Si el valor de Nm es cercano a uno, cualquiera de los métodos indirectos proporciona estimaciones precisas de Nm mientras que para valores de Nm muy pequeños los tres métodos sobrestiman el flujo génico por un factor de 2 (Slatkin, 1994).

-Se obtuvo una matriz de distancia e identidad genética. La identidad genética I de Nei se obtiene como (Hedrick, 1983; Nei, 1987)

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

donde $J_{xy} = \sum p_{i,x} p_{i,y}$, que es la probabilidad de escoger un par de alelos idénticos, uno de la población x y otro de la población y (Hartl y Clark, 1989). $J_x = \sum p_i^2 \cdot x$ y $J_y = \sum p_i^2 \cdot y$ que son las probabilidades de escoger un par idéntico dentro de cada población (Hartl y Clark, 1989)

La distancia genética D se puede obtener como (Hedrick, 1983; Nei, 1987)

$$D = -\ln(I)$$

Las identidades y distancias genéticas se obtienen para pares de poblaciones. La identidad I toma valores desde 0 si las dos poblaciones no comparten alelos, hasta 1 si tienen frecuencias alélicas idénticas. La distancia D tiene valores desde 0 si las frecuencias alélicas de las poblaciones son idénticas hasta infinito si las poblaciones no comparten alelos (Hedrick, 1983).

-Se hizo un árbol filogenético para conocer las relaciones entre las tres poblaciones estudiadas. Este árbol es un fenograma que se construyó con datos de identidades

genéticas entre poblaciones, por el método de UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean, Sokal y Michener, 1958)

RESULTADOS.

En total se utilizaron 7 loci para el estudio: ACPH-1, EST-1 (sistema Mitton; Apéndice), CPX-1, LAP-1, PGI-1 (sistema R, Apéndice), GOT-1 y GOT-2 (sistema Morfolina; Apéndice). En las figuras 2a y 2b se presentan los patrones de bandeo (zimogramas) de los 7 loci.

Variación genética.

De los siete loci ensayados, cinco fueron polimórficos (EST-1, CPX-1, PGI-1, LAP-1 y ACPH-1) en la población del Chichinautzin; cuatro en la población del Pedregal (EST-1, PGI-1, LAP-1 y ACPH-1); y seis en la población de Omiltemi (EST-1, CPX-1, PGI-1, LAP-1, ACPH-1 y GOT-2), (ver Tabla 4).

En la Tabla 3 se muestra el nivel de variación genética intrapoblacional, en donde el mayor número de alelos por locus se encontró en la población del Chichinautzin ($A = 2.4$), así como también la mayor heterocigosis promedio observada ($H_o = 0.247$) y niveles de variación intermedios entre el Pedregal y Omiltemi en cuanto a índice de polimorfismo al 95 % ($P = 71.4$). En la población del Pedregal se encontró el menor índice de polimorfismo al 95 % (57.1) y el menor índice de heterocigosis observada (0.196) y esperada (0.247). La población de Omiltemi fue la que presentó el mayor índice de polimorfismo (85.7) y la heterocigosis promedio esperada más alta (0.355), pero su heterocigosis observada tuvo un valor intermedio (0.220) a los registrados para el Pedregal y la población del Chichinautzin. Sin embargo, no hubo diferencias significativas

entre las heterocigosis observadas de las poblaciones, así como tampoco entre la heterocigosis observada y esperada de cada población.

Frecuencias alélicas.

En la Tabla 4, se observa que el número de alelos en los loci polimórficos para la población del Chichinautzin fue de tres en todos los loci. En la población del Pedregal observamos el mismo patrón a excepción de EST-1 que sólo presentó dos alelos; y finalmente en el caso de Omiltemi todos los loci polimórficos presentaron un total de dos alelos menos la enzima PGI-1 que presentó un total de tres alelos.

En general, se observa que hay varios alelos que presentaron frecuencias relativamente bajas, este es el caso del alelo 3 para la enzima PGI-1 en todas las poblaciones, del alelo 3 para la enzima LAP-1, y del alelo 3 de la ACPH-1 en la población del Chichinautzin. En el Chichinautzin los alelos que presentaron frecuencias relativamente bajas son: el alelo tres de la EST-1, los alelos 2 y 3 de la CPX-1 y el alelo tres de las enzimas LAP-1 y ACPH-1 (ver Tabla 4). La única enzima cuyas frecuencias alélicas son iguales se presenta en la LAP-1 de la población de Omiltemi (ver Tabla 4). Es de interés hacer notar que el locus GOT-1 fue monomórfico en las tres poblaciones estudiadas, mientras que el locus GOT-2 fue monomórfico en dos de las poblaciones y polimórfico en la población de Omiltemi, siendo el alelo 2 de GOT-2 exclusivo de esta población y con una frecuencia elevada.

Con el fin de conocer la heterogeneidad de las frecuencias alélicas por locus y conocer si las diferencias encontradas se deben realmente a diferencias entre las tres

poblaciones o a diferencias entre sólo dos de ellas se realizó una prueba de G (Sokal y Rohlf, 1981) (Tabla 4). Se encontró que las enzimas EST-1, PGI-1, ACPH-1 y GOT-2 son iguales entre el Pedregal y el Chichinautzin, y significativamente diferentes con Omiltemi, (Tabla 4). En el caso de la enzima LAP-1 y CPX-1, todas las poblaciones son diferentes entre si, mientras que para la enzima GOT-1 no hay diferencias entre las poblaciones, ya que es monomórfica (Tabla 4).

Frecuencias genotípicas.

Al analizar con una chi-cuadrada las frecuencias genotípicas de cada locus, para cada población, y evaluar la desviación respecto a lo esperado en el equilibrio de Hardy-Weinberg, se encontró que todos los loci, excepto PGI-1, están fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg en la población de Omiltemi (Tabla 5). En contraste, todos los loci están en equilibrio de Hardy-Weinberg en el Pedregal (excepto ACPH-1), y en el Chichinautzin (excepto EST-1) (ver Tabla 5).

En todos los loci cuyas frecuencias están fuera del equilibrio, se observó un exceso de homocigotos, con excepción de ACPH-1 en Omiltemi, Gro., en el cual se observó un exceso de heterocigotos (Tabla 5).

Estadísticos F de Wright y estimación del flujo génico

En la Tabla 6 se puede ver que los valores estimados de los coeficientes F (a través del programa Biosys) resultaron similares a los obtenidos con el algoritmo de Weir y Cockerham. Los valores calculados con el método de Biosys de F_{ik} que resultaron

positivos y significativos son los de los loci EST-1, CPX-1 y GOT-2, lo mismo sucede con los valores de la F_{it} . Sin embargo, el único valor significativo de la F_{it} es el de GOT-2. Los valores de F_{it} van desde -0.002 hasta 0.450, con un promedio igual a 0.251. Las F_{it} presentaron un valor promedio igual a 0.340 y el intervalo estuvo entre 0.017 y 0.742. Finalmente, las F_{st} presentaron una media de 0.119 y el intervalo de valores fue de 0.001 a 0.579 (Tabla 6).

Los resultados del análisis a través de los estadísticos propuestos por Weir y Cockerham (1984) fueron todos significativos a excepción del locus ACPH-1 en el caso de la F , (i.e. F_{it}) del locus PGI-1 en el caso de theta (θ ; i.e., F_{st}) y del locus ACPH-1 en el caso de la f (i.e. F_{it}) (ver Tabla 6). Los valores de los errores estándar al 95 % se emplearon para calcular los intervalos de confianza y así evaluar si éstos eran o no distintos de cero (Figura 4).

Las f estuvieron entre 0.0072 y 0.4517, con una media de 0.2590, las F se ubicaron entre 0.0599 y 0.4472, con un valor promedio de 0.3628 y las θ presentaron valores desde -0.0039 hasta 0.0687 con una media igual a 0.1397. Estos resultados indican que las poblaciones están diferenciadas y que existe endogamia.

El valor de Nm calculado (usando la corrección de Crow y Aoki) a partir de la F_{st} promedio estimada con el método de Weir es de 0.68, mientras que el valor de Nm calculado a partir de la F_{st} promedio (estimada con el método de Wright) es de 0.82; el valor de Nm calculado a partir del método de los alelos únicos es de 0.1175. Este último valor resulta ser menor que los estimados a partir de la F_{st} promedio pero es del mismo

orden de magnitud y menor que 1, lo cual indica que las poblaciones están aisladas y están divergiendo por deriva génica. En la Tabla 7 se muestran los valores de flujo génico entre pares de poblaciones estimados a través de \hat{M} . Se observa que el flujo génico es bajo entre Omiltemi y las otras dos poblaciones estudiadas y alto entre el Chichinautzin y el Pedregal.

Distancias e identidades genéticas de Nei.

En concordancia con los resultados anteriores, la mayor identidad genética de Nei (ver Tabla 8) se encontró entre las poblaciones del Chichinautzin y del Pedregal (0.997), mientras que la menor se encontró entre las poblaciones del Pedregal y Omiltemi (0.879), la distancia entre la población del Chichinautzin y Omiltemi es intermedia. Estos resultados se ilustran de manera gráfica en el fenograma construido por el método de UPGMA (Figura 5) en donde se agrupan en una rama las poblaciones del Chichinautzin y el Pedregal y en otra distinta está situada la población de Omiltemi.

Tabla 1. Sitios de colecta de *B. cuneata*.

LOCALIDAD	ALTURA	PRECIPITACION PLUVIAL	TEMPERATURA PROMEDIO	TIPO DE VEGETACION
Pedregal, D.F.	2240 msnm	700-950 mm	14-15 °C	Matorral xerófilo
Chichinautzin, Mor.	2150 msnm	1286 mm	16.8 °C	Matorral abierto
Omitemi, Gro.	1900-2500 msnm	250 mm	18 °C	Bosque de encino perturbado

**Tabla 2. Enzimas probadas en cada sistema de buffer
(ver Apéndice).**

Enzimas	Sistema
ADH IDH G-6PD MDH PGM SOD	CHELIAK H (Cheliak y Pitel 1984)
ACPH G-6PD PGM SDH	D DE MAIZ (Stuber et al. 1988)
GDH IDH MDH SDH SOD	2-TRIS CITRATOS (Miles et al. 1977)
DIA EST GOT	8- (Hamrick)
CPX* (m) LAP* (m) MNR PGI* (d) RUB	R (May 1992)
ACPH* (d o m) EST* (d o m) ME MNR	PP (Mitton)
GOT* (d)	MC Morfolina (Wyatt 1989)

^ Enzimas y sistemas utilizados para el análisis en este trabajo.

(m) = Monómero (d) = Dímero

Tabla 3. Variación genética en 7 loci para las 3 poblaciones estudiadas de *Bursera cuneta* (errores estándar entre paréntesis).

Población	# prom. de individuos por locus	# prom. de alelos por locus	% de loci polimorficos *	heterocigosis observada	heterocigosis esperada (H-W**)
Chichinautzin	35.9 (.1)	2.4 (.4)	71.4	.247 (.069)	.297 (.081)
Pedregal	35.0 (.0)	2.0 (.4)	57.1	.196 (.088)	.247 (.090)
Omiterni	28.4 (.6)	2.0 (.2)	85.7	.220 (.095)	.355 (.070)
Promedio total	33.1	2.1	71.4	.221	.299

* Un locus es considerado polimórfico si la frecuencia del alelo más común no excede .95

** Estimador insesgado (ver Nei, 1978)

Tabla 4. Frecuencias alélicas observadas para las tres poblaciones de *Bursera cuneata* (ver texto).

LOCUS	Chichinautzin. Mor.	Pedregal. D. F.	Omitemi. Gue.	G	Significancia
EST-1				519.1	P < 0.001
(N)	36	35	30		
1	0.597	0.686	0.567		
2	0.375	0.314	0.433		
3	0.028	0.000	0.000		
CPX-1				26.04	P < 0.001
(N)	36	35	30		
1	0.833	1.000	0.833		
2	0.097	0.000	0.167		
3	0.069	0.000	0.000		
PGI-1				15.56	P < 0.01
(N)	36	35	29		
1	0.222	0.243	0.086		
2	0.681	0.671	0.845		
3	0.097	0.086	0.069		
LAP-1				100.5	P < 0.0001
(N)	35	35	29		
1	0.229	0.229	0.500		
2	0.757	0.686	0.500		
3	0.014	0.086	0.000		
ACPH1				17.24	P < 0.01
(N)	36	35	29		
1	0.222	0.086	0.362		
2	0.736	0.814	0.638		
3	0.042	0.100	0.000		
GOT-1					
(N)	36	35	26		
1	1.000	1.000	1.000		
GOT-2				117.54	P < 0.001
(N)	36	35	26		
1	1.000	1.000	0.327		
2	0.000	0.000	0.673		

Tabla 5. Índices de fijación (errores estandar entre paréntesis, obtenidos con un método de remuestreo (Jackknife); Weir, 1990) para 6 loci en las poblaciones estudiadas de *Bursera cuneata*.

LOCUS	CHICHINAUTZIN	PEDREGAL	OMILTEMI
EST-1	0.502 ***	0.072	0.729 ***
CPX-1	-0.144	-----	1.000 ***
PGI-1	0.070	0.349 *	-0.132
LAP-1	0.237	-0.215	0.793 ***
ACPII-1	-0.024	0.732 ***	-0.568 ***
GOT-2	-----	-----	0.388 **
PROMEDIO	0.1282 (0.0000097)	0.2345 (0.1162)	0.3683 * (0.1104)

Chi-cuadrada * $P < .05$

** $P < .01$

*** $P < .005$

----- monomórfico

Tabla 6. Estadísticos F de Wright (errores estándar entre paréntesis, obtenidos con un método de remuestreo (Jacknife); Weir, 1990) para las poblaciones de *Bursera cuneata*.

LOCUS	BIOSYS			WEIR Y COCKERHAM		
	F_{st}	F_{is}	F_{it}	F	f'	ϕ
EST-1	0.456 *	0.450 *	0.001	0.4472*	0.4517*	-0.0039
CPX-1	0.449 *	0.414 *	0.059	0.3424*	0.2957*	0.0340*
PGI-1	0.157	0.134	0.027	0.1809*	0.1778*	0.0074
LAP-1	0.330	0.286	0.062	0.3295*	0.2566*	0.0687*
ACPH-1	0.017	-0.032	0.047	0.0599	0.0072	0.0527*
GOT-2	0.742 *	0.388 *	0.579 *			
PROMEDIO	0.340* (0.044)	0.251 (0.033)	0.119 * (0.04)	0.3628*	0.2590*	0.1397*

Los asteriscos muestran la significancia calculada con una prueba de Chi-cuadrada para los valores obtenidos con Biosys y con un método de Jacknife para los estadísticos calculados con el algoritmo de Weir y Cockerham.

* $P < 0.05$

Tabla 7. Número de migrantes por generación entre pares de poblaciones de *B. cuneata* calculados a partir de ϕ promedio (ver Tabla 6).

Población	Pedregal	Chichinautzin	Omitemi
Pedregal		24.10	0.85
Chichinautzin			1.02

Tabla 8. Identidades I (sobre la diagonal) y distancias D (bajo la diagonal) genéticas incesgadas de Nei (Nei, 1978), para pares de poblaciones de *Bursera cuneata*.

Poblaciones	1	2	3
1 Chichinautzin	****	0.997	0.888
2 Pedregal	0.003	****	0.879
3 Omiltemi	0.118	0.128	****



Figura 2. Distribución de los sitios de colecta.

- ▲ Chichinautzin
- Omiltemi
- Pedregal

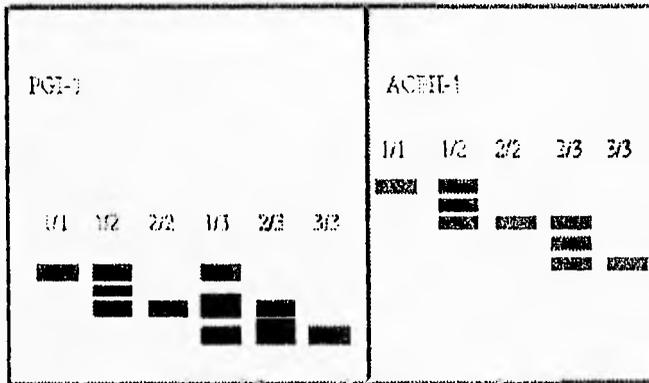
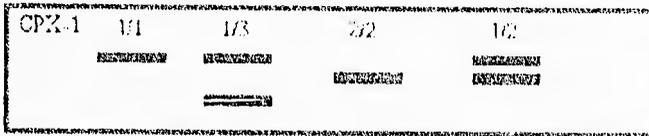
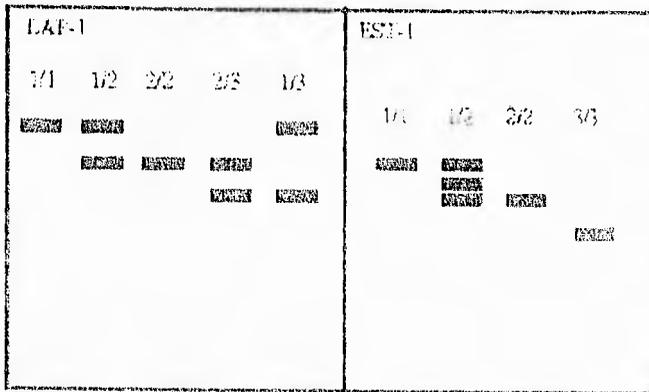


Figura 3a. Esquema de los patrones de bandeo que presentaron las enzimas polimórficas.

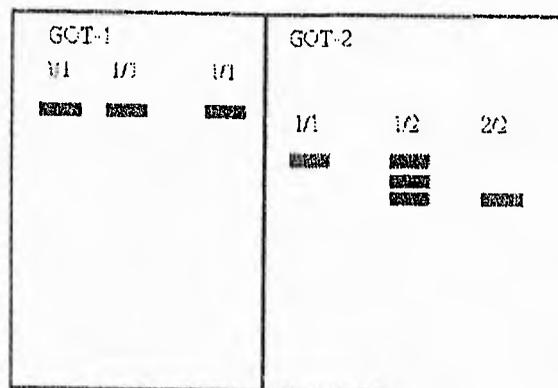


Figura 3b. Esquema de los patrones de bandeo que presentó la enzima GOT (GOT-1 locus monomórfico, GOT-2 locus polimórfico).

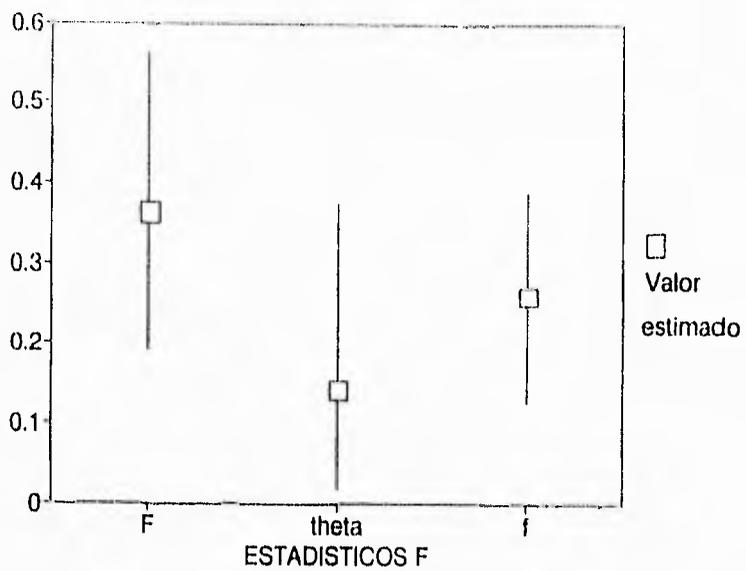


Figura 4. Estadísticos F de Wright en *Bursera cuneata* calculados con el programa de Weir, 1984. Los límites de confianza fueron obtenidos a través de un método de remuestreo de "Bootstrap".

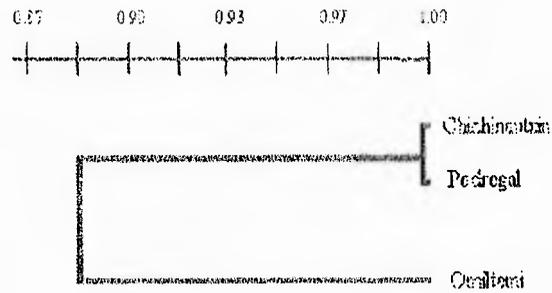


Figura 5. Fenograma de las poblaciones de *B. cuneata* construido con datos de identidad genética en UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean, Felsestein, 1988).

DISCUSION.

Se ha descrito en la literatura que las plamas, especialmente los árboles, muestran una alta variación genética (Hamrick y Godt, 1990). Al comparar la variación genética de *B. cuneata* con plantas con características de historia de vida semejantes como árboles tropicales dioicos se encontró que los valores son similares (Eguiarte, 1990)

Asimismo, se ha reportado que uno de los factores más importantes en determinar la estructura genética es el sistema de apareamiento, ya que aquellas especies que se entrecruzan, presentan niveles de variación mayores que las especies que se autofecundan, lo cual sería el caso de *B. cuneata* que es una especie dioica. El sistema de apareamiento pareciera estar jugando un papel determinante en los patrones de variación genética encontrados. Los valores de heterocigosis obtenidos para *B. cuneata* corroboran que hay entrecruzamiento lo cual permite, por un lado, el mantenimiento de cierta variación genética y, por el otro, evita la expresión de alelos recesivos deletéreos (Wright, 1978)

Frecuencias alélicas.

Comparando las frecuencias alélicas entre las poblaciones estudiadas, se observa que la mayor diferenciación se debe a la población de Omiltemi. Al realizar las pruebas de G pareadas entre las poblaciones de Chichinautzín y Pedregal únicamente resultaron significativamente distintas las frecuencias alélicas de los locus CPX-1 y LAP-1, sin embargo, si la prueba de la heterogeneidad se realizaba tomando en cuenta a las tres poblaciones las diferencias resultaron significativas para todos los loci ensayados exceptuando a GOT-1 que fue monomórfico en todas las poblaciones.

Estos resultados pueden deberse a que la población de Omiltemi al encontrarse más alejada geográficamente se ha diferenciado más de las otras dos poblaciones. Inclusive hay alelos que esta población presenta y que las otras poblaciones no los tienen.

Diferenciación genética.

Las distancias e identidades genéticas de las poblaciones de *B. cuneata* muestran que están más cercanas entre sí las poblaciones de Pedregal y Chichinautzin, lo cual concuerda con la distancia geográfica que las separa, asimismo, las ramas del árbol (UPGMA) son muy cortas. Los valores encontrados para *B. cuneata* no están muy alejados de los reportados en la literatura para distancias genéticas entre poblaciones de la misma especie, sin embargo este valor es mayor (0.083) que el reportado por Linhart et al. (1981) que encontraron una distancia promedio de 0.015 entre poblaciones de *Pinus ponderosa*, y el encontrado por Eguiarte (1990) de 0.024 en adultos de *Astrocarium mexicanum*.

Para *B. cuneata* existe un patrón de aislamiento por distancia, ya que las poblaciones que presentan identidades genéticas más altas son las poblaciones que se encuentran más cercanas entre sí en lo que a distancia geográfica se refiere. Cuando en las poblaciones se presenta aislamiento por distancia, el flujo génico disminuye al aumentar la distancia física que separa a las poblaciones (Slatkin, 1993). En este caso es muy claro si comparamos el flujo génico existente entre el Pedregal y el Chichinautzin (24.10), con el existente entre cualquiera de estas dos poblaciones con la población de Omiltemi. Al aumentar el flujo génico se incrementa la variabilidad genética, esto se refleja en la

heterocigosis, y disminuye (al menos en las poblaciones pequeñas) la probabilidad de fijación de alelos por deriva génica.

Flujo génico.

En *Bursera cuneata* la Nm calculada a partir de la ϕ de Weir es de 0.68, la calculada a partir de la F promedio de Wright es de 0.82, y la calculada con el método de los alelos exclusivos es de 0.1175; todos los valores resultan ser menores que uno, lo que indica que las poblaciones están aisladas y divergiendo por deriva génica (Hartl y Clark, 1989)

Los métodos indirectos para calcular el flujo génico indican si el flujo génico es más fuerte o más débil que la deriva génica. Si no existe flujo génico, la deriva génica conducirá también a diferencias locales en las frecuencias alélicas (Slatkin, 1985); en el caso de la población de Omiltemi, el flujo génico que existe con las otras dos poblaciones estudiadas es muy pequeño por lo cual la fuerza que está actuando y fijando las frecuencias alélicas es seguramente la deriva génica

El flujo génico es un componente muy importante de la estructura poblacional ya que determina hasta que grado una población local de una especie es una unidad evolutiva independiente. Si hay mucho flujo génica las poblaciones evolucionan conjuntamente y si hay poco, cada población evoluciona de manera independiente. Ahora, ¿cuánto flujo génico se necesita para impedir la evolución independiente en diferentes poblaciones locales?, depende de que otras fuerzas estén actuando. Si Nm es mucho mayor que uno, el flujo génico sobrepasa los efectos de la deriva y evita la diferenciación local, y si es mucho

menor que 1 la deriva génica actúa de manera independiente en cada población (Slatkin, 1994).

Antes de concluir que Nm indica los valores de flujo génico actuales hay que considerar posibles fuentes de sesgo que pueden estar subestimando el valor de los estimados calculados (Slatkin, 1985). En el caso particular del método de los alelos exclusivos, es importante incrementar el número de loci muestreados para tener una buena estimación de Nm , ya que esto incrementa el número de alelos usados para estimar p (l). Otra fuerza potencial de sesgo es la selección natural que favorece alelos que confieren adaptaciones a poblaciones locales, lo cual ocasiona un alto número de alelos privados con una alta frecuencia y como consecuencia un alto sesgo en la estimación de Nm .

Índice de fijación F y frecuencias fenotípicas.

En cuanto a los índices de fijación F , se encontró que, en términos generales las poblaciones del Pedregal y del Chichinautzin están en equilibrio de Hardy-Weinberg, con excepción del locus $ESF-1$ en la población del Chichinautzin y del locus $ACPH-1$ en el Pedregal, en donde son positivos y significativos (diferentes de cero); lo que sugeriría que hay más individuos homocigos de los que se esperan si hubiera apareamientos al azar; esto podría indicar que hay algún efecto de endogamia en la población. En el caso de la población de Omiltemi, el único locus que se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg es $PGI-1$, todos los demás loci resultaron ser positivos y significativos, con la excepción del índice de fijación del locus $ACPH-1$ que resultó negativo y significativo lo cual indica un exceso de individuos heterocigos. Los índices de fijación negativos pueden generarse

por apareamientos preferenciales negativos (*assortative mating*, Hedrick, 1983), o por la existencia de selección a favor de los individuos más heterocigos.

Un exceso en el número de homocigos puede deberse a una gran variedad de causas: efecto Wahlund, apareamiento preferencial positivo (entre genotipos similares), selección de homocigos, estructura familiar con vecinos restringidos causando apareamientos entre individuos relacionados (El-Kassaby et al 1987)

Los índices de fijación reportados en la literatura para árboles tropicales son valores bajos o negativos sugiriendo que hay poca endogamia (Sytsma y Schaal, 1985, O'Malley y Bawa, 1987; O'Malley et al, 1988). Sin embargo, en este estudio, tanto las F como los índices de fijación encontrados sugieren que hay un nivel de endogamia importante, hecho que resulta notable pues al ser *B. cuneata* una especie dioica la endogamia es el resultado de la cruce entre parientes. La F resulta ser mayor que la que se obtiene en una cruce entre hermanos enteros o entre un progenitor y un hijo ($F \approx 0.251$ y $f \approx 0.259$).

Estadísticos F de Wright.

Los valores de F son mayores a la media encontrada (0.07) en arbustos, árboles y coníferas (Eguiarte, 1990). El hecho de que la F sea distinta de cero nos sugiere que una fracción de la variación está repartida entre las poblaciones, por lo tanto hay una estructura genética en las poblaciones que se genera por migración o por flujo génico. En

este caso en particular, la diferenciación se debe a la presencia-ausencia de algunos alelos en las poblaciones y a las diferencias en las frecuencias alélicas

La F promedio de las tres poblaciones fue significativa (0.119). Esto sugiere que existe diferenciación genética entre las poblaciones y que el flujo génico existente entre las poblaciones no es alto. El valor obtenido de F para el locus GOT-2 es particularmente alto y significativo (0.579); esto se explica al comparar las frecuencias alélicas (Tabla 4), ya que en la población de Omiltemi existe un alelo con una frecuencia relativamente alta que además no se encuentra en ninguna de las otras dos poblaciones estudiadas (donde GOT-2 resulta ser monomórfico).

Los valores de F encontrados se deben a la diferenciación interpoblacional (F_{st}) y a la endogamia. En la Tabla 6, al comparar a las tres poblaciones juntas hay tres loci que tienen índices F positivos y significativos, y el promedio también es significativo. Los valores positivos y significativos de F indicarían que hay un exceso de homocigos en la población total que pueden ser debidos a la deriva génica y/o endogamia.

Genética de la conservación de especies tropicales.

Desde el punto de vista genético y evolutivo, los altos niveles de variación genética que presentan muchas plantas, incluyendo a la mayoría de los árboles tropicales, representan un problema para su conservación (Eguiarte, 1990). Para preservar la variación genética de una especie (polimorfismo/heterocigosis), se van a requerir conservar o coleccionar mayores números de individuos, especialmente si se quiere tener representados a los alelos poco comunes (Frankel y Soulé, 1981) y varias poblaciones. Es importante también que

este caso en particular, la diferenciación se debe a la presencia-ausencia de algunos alelos en las poblaciones y a las diferencias en las frecuencias alélicas

La F promedio de las tres poblaciones fue significativa (0.119). Esto sugiere que existe diferenciación genética entre las poblaciones y que el flujo génico existente entre las poblaciones no es alto. El valor obtenido de F para el locus GOT-2 es particularmente alto y significativo (0.579); esto se explica al comparar las frecuencias alélicas (Tabla 4), ya que en la población de Omilienti existe un alelo con una frecuencia relativamente alta que además no se encuentra en ninguna de las otras dos poblaciones estudiadas (donde GOT-2 resulta ser monomórfico).

Los valores de F encontrados se deben a la diferenciación interpoblacional (F_{st}) y a la endogamia. En la Tabla 6, al comparar a las tres poblaciones juntas hay tres loci que tienen índices F positivos y significativos, y el promedio también es significativo. Los valores positivos y significativos de F indicarían que hay un exceso de homocigos en la población total que pueden ser debidos a la deriva génica y/o endogamia.

Genética de la conservación de especies tropicales.

Desde el punto de vista genético y evolutivo, los altos niveles de variación genética que presentan muchas plantas, incluyendo a la mayoría de los árboles tropicales, representan un problema para su conservación (Eguiarte, 1990). Para preservar la variación genética de una especie (polimorfismo/heterocigosis), se van a requerir conservar o coleccionar mayores números de individuos, especialmente si se quiere tener representados a los alelos poco comunes (Frankel y Soulé, 1981) y varias poblaciones. Es importante también que

las reservas ecológicas sean grandes para mantener la alta variación genética intrapoblacional y para evitar la endogamia y la deriva génica (Eguiarte et al., 1992)

Las estrategias de conservación *ex situ*, basadas en la recolección de semillas y germoplasma, así como la preservación de bancos génicos, jardines botánicos, etc., resultan poco convenientes para la conservación de la diversidad genética de las especies de árboles tropicales, dado el alto número de semillas y padres que se necesita coleccionar para preservar al menos parte de la variación genética presente en la población (Brown y Clegg, 1983). El problema es mayor por el alto número de especies distintas, y los problemas que implica preservar, mantener la viabilidad y germinar las semillas de los árboles tropicales (Vázquez-Yanes y Toledo, 1990). Solamente las estrategias de conservación *in situ* parecen tener un valor real para la conservación de los árboles tropicales (Eguiarte et al., 1992).

Aspectos técnicos.

Finalmente, un problema importante para el estudio de la genética de árboles en general, y de árboles tropicales en particular, es el referente a la colecta y mantenimiento de tejido adecuado para realizar la electroforesis (Loveless y Hamrick, 1987). Además de éste problema, los árboles tropicales se caracterizan por presentar compuestos secundarios que dificultan el corrimiento y la tinción de las enzimas (Gan et al., 1977; Loveless y hamrick, 1987; Garay, 1991).

La interacción de los compuestos secundarios con las proteínas constituye uno de los principales obstáculos para la extracción de las enzimas de tejidos vegetales. Para

poder llevar a cabo la extracción evitando el daño enzimático es necesario utilizar un homogenizador químico (Garay, 1991)

Los resultados obtenidos de una electroforesis pueden depender del buffer que se utilice para extraer las proteínas, ya que éste puede afectar la medición de las tres variables más importantes en estudios de genética de poblaciones con base en la electroforesis de enzimas: el número de loci detectables, el número de éstos que aparecen como polimórficos y el número de alelos por loci (Gottlieb, 1982; Kephart, 1990). La experimentación previa con diferentes buffer de extracción al iniciar un estudio de genética de poblaciones puede desenmascarar posibles problemas y sesgos en la estimación de la variación genética.

Al ser *Bursera cuneata* un árbol resinoso que presenta diferentes compuestos secundarios (terpenos), se tuvieron que experimentar distintos buffer de extracción hasta lograr una resolución clara de la lectura de las enzimas. Ya que en la literatura hay muy pocos trabajos que reportan haber realizado electroforesis con Burseraceae en general, en particular la presente tesis es un trabajo pionero en el montaje de los sistemas de tinción de las enzimas; sin embargo, es necesario seguir en un futuro experimentando en este campo ya que de las 18 enzimas que se probaron durante el trabajo experimental únicamente en seis se logró una lectura consistente

Se ha reportado que el estadio del ciclo de vida y el grado de desarrollo foliar afectan la expresión enzimática, por ello es recomendable estandarizar el material foliar que se colecta. En un trabajo realizado con *Cecropia obtusifolia* (Garay, 1991), las plántulas y los organismos juveniles presentaron mayores problemas de extracción

enzimática debido a que tienen una mayor concentración o variedad de fenoles de la que tienen los organismos adultos. En este trabajo el material foliar utilizado fue escogido sin ningún criterio en particular, pues al ser esta especie caducifolia la longevidad de las hojas es similar

CONCLUSIONES.

Los niveles de variación genética encontrados en las poblaciones de *Bursera cuneata* son similares a los reportados para árboles tropicales dioicos. *Bursera cuneata* tiene una heterocigosis esperada que está dentro del rango de las plantas que se entrecruzan y que son dispersadas por animales, siendo Omiltemi la población que presenta la mayor variabilidad genética.

Los valores de los índices de fijación sugieren que, en términos generales, las poblaciones del Pedregal y el Chichinautzín están en equilibrio de Hardy-Weinberg, sin embargo es notable la ausencia de un alelo en estas dos poblaciones que se encuentra presente en la población de Omiltemi.

Los valores de F_{is} sugieren que existe endogamia lo cual, al ser *Bursera cuneata* una especie dioica, deviera ser el resultado de la cruce entre parientes.

Todos los métodos indirectos para calcular el flujo génico utilizados en este estudio produjeron estimaciones menores que 1, del número de migrantes por generación, lo que indica que las poblaciones están aisladas y divergiendo por deriva génica.

La F es distinta de cero e indica que una fracción de la variación genética está repartida entre las poblaciones. Las tres poblaciones estudiadas están estructuradas, es decir son diferentes entre ellas.

Para *Bursera cuneata* existe un patrón de diferenciación genética con distancia geográfica.

La diferenciación genética entre las poblaciones es el resultado de (1) Cambios en las frecuencias de los genes (alelos), y (2) Pérdida de alelos (GOT-2,2). Este proceso

pudo haberse generado a partir de la colonización de hábitat nuevos por *B. cuneata*. La evidencia geológica indica que Chichinautzin y Pedregal son sitios mucho más jóvenes que Oniltemi.

BIBLIOGRAFIA.

Alvarez-Buylla, E. R. y A. A. Garay. 1994. Population genetic structure of *Cecropia obtusifolia*, a tropical pioneer tree species. *Evolution* 48 (2): 437-453.

Bawa, K. S. 1992. Mating Systems, Genetic Differentiation and Speciation in Tropical Rain Forest Plants. *Biotropica* 24 (2b): 250-255.

Brown, A. H. D. 1978. Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. *Theoretical and Applied Genetics* 52: 145-157.

Brown, B. A. y M. T. Clegg. 1983. Isozyme assessment of plant genetic resources. *Isozymes: Curr. Top. Biol. Med. Res* 11: 285-295.

Chase, M., H. Bushier y K. S. Bawa. 1995. Populations genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical Tree. I. Genetic variation in natural populations. *American Journal of Botany* 82 (4): 468-475.

Cheliak, W. M. y J. A. Pitel. 1984. *Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species*. Information report PI-X-42. Detawawa National Forestry Institute.

Conkle, M. T., P. D. Hodskiss, L. B. Numally y S. C. Hunter. 1982. Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual. *Gen. Tech. Rep. PSW-64*, Berkeley, CA.

Crow, J. F. y K. Aoki. 1984. Group Selection for a Polygenic Behavioral Trait: Estimating the Degree of Population Subdivision. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 81: 6073-6077.

Crow, J. S. y M. Kimura. 1970. *An Introduction to Population Genetics Theory*. Harper and Row Pub. London.

Eguiarte, L. E. 1986. Una guía para principiantes a la genética de poblaciones. *Ciencias, revista de difusión. Número especial 1* 30-38.

- Eguiarte, L. E. 1990. Genética de poblaciones de *Astrocaryum mexicanum* Liebm. en los Tuxtlas, Veracruz. *Tesis de doctorado*. Centro de Ecología/UACPYP del CCH, UNAM. México.
- Eguiarte, L. E. y D. Piñero. 1990. Genética de la conservación: Leones vemos, genes no sabemos. *Ciencias, revista de difusión. Número especial 4*: 34-47.
- Eguiarte, L. E., N. Pérez-Nasser y D. Piñero. 1992. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. *Heredity* 69: 217-228.
- Ehrlich, P. 1988. The loss of diversity. En: Wilson, E. C. y Peter, F. M. (eds.) *Biodiversity*. National Academic Press: Washington, DC. pp 21-27.
- 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.
- Felsenstein, J. 1988. Phylogenies from molecular sequences: Inference and reliability. *Annu. Rev. Genet.* 22: 521-565.
- Frankel, O. H. y M. E. Soulé. 1981. *Conservation and Evolution*. Cambridge University Press. Cambridge. 327 pp.
- Gan, Y. Y., F. W. Robertson, P. S. Ashton, E. Soepadmo y D. W. Lee. 1977. Genetic variation in wild populations of rain-forest trees. *Nature*. 269: 323-325.
- Garay, A. 1991. Montaje de un sistema de loci polimórficos para una especie arborea neotropical *Cecropia obtusifolia*. *Tesis de licenciatura*. UNAM. México.
- Godt, M. J. W. y J. L. Hamrick. 1993. Genetic diversity and population structure in *Tradescantia mirsulicaulis* (Commelinaceae). *American Journal of Botany* 80 (8): 959-966.

- Gottlieb, L. 1982. Conservation and duplication of isozymes in plants. *Science* 216 (23): 373-380
- Hakim-Elahi, A. 1976. Temporal changes in the population structure of the slender wild oat (*Avena barbata*) as measured by allozyme polymorphisms. *Ph. D. Dissertation*, University of California, Davis
- Hamrick, J. L. y M. D. Loveless. 1986. Isozyme variation in tropical trees: procedures and preliminary results. *Biotropica*. 18: 201-207
- Hamrick, J. L. y M. D. Loveless. 1989. The genetic structure of tropical tree populations: associations with reproductive biology. En: Bock, J. H. y Linhart, Y. B. (eds.) *The evolutionary ecology of plants*. Westview press: Boulder. pp 129-146
- Hamrick, J. L. y M. J. W. Godt. 1990. Allozyme diversity in plant species. En: Brown, A. D. H., Clegg, M. T., Kahler, A. L. y Weir, B. S. (eds) *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources*. Sinauer: Sunderland, Massachusetts. pp 43-63.
- Hamrick, J. L. , M. J. W. Godt, D. A. Murawski y M. D. Loveless. 1991. Correlations between species traits and allozyme diversity: implications for conservation biology. En: Falk, D. A. and Holsinger, K. E. (eds.) *Genetics and Conservation of Rare Plants*. Oxford University Press: New York. pp 75-86
- Hamrick, J. L., Y. B. Linhart y J. B. Mitton 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 10: 173-200.
- Hartl, D. L. y A. G. Clark. 1989. *Principles of population genetics*. 2nd. ed. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Hedrick, P. W. 1983. *Genetics of populations*. Science Books Int. Boston.

- Jiménez, J. J. Contreras, R. González, R. Ocampo, G. Lozano y S. Reynoso. 1993. Plantas Vasculares. En: *Historia natural del parque ecológico estatal Omiltemi, Chilpancingo, Guerrero, México*. 127-250.
- Karron, J.D. 1987. A comparison of levels of genetic polymorphism and self compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners. *Evolutionary Ecology* 1: 47-58.
- Kephart, S. 1990. Starch gel electrophoresis of plant isozymes: a comparative analysis of techniques. *American Journal of Botany* 77 (5): 693-712.
- Les, D. H., J. A. Reinartz, y E. J. Esselman. 1991. Genetic consequences of rarity in *Aster furcatus* (Asteraceae), a threatened, self-incompatible plant. *Evolution* 45: 1641-1650.
- Lewontin, R. C. 1974. *The Genetic Bases of Evolutionary Change*. Columbia University press. New York.
- 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 determinant of genetic structure in plant population. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15: 65-95.
- Loveless, M. D. y J. L. Hamrick. 1987. Distribución de la variación en especies de árboles tropicales. *Revista de Biología Tropical Supl. 1*: 165-175.
- May, B. 1992. Starch gel electrophoresis of allozymes. En: A. R. Hoebel (ed.) *Molecular genetic analysis of populations. A practical approach*. IRL Press Oxford University Press.
- Mc Vaugh, R. y J. Rzedowski. 1965. Synopsis of the genus *Bursera* L. western Mexico, with notes on the material of *Bursera* collected by Sessé and Mociño. *Kew Bulletin* 18: 317-381.

- Mitton, J. B., Y. B., Linhart, J. L., Hamrick y J. S. Beckman. 1977. Observations on the genetic structure and mating systems of ponderosa pine in the Colorado Front Range. *Theoretical Applied Genetics* 51: 5-13.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 3321-3323.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, USA.
- O'Malley, D. M., y K. S. Bawa. 1987. Mating systems of a tropical rain forest tree species. *American Journal of Botany* 74: 1143-1149.
- O'Malley, D. M., D. P. Buckley, G. T. Prance y K. S. Bawa. 1988. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. and Bonpl.: Lecythydaceae) 2: Mating system. *Theoretical and Applied Genetics* 76: 929-932.
- Oyama, K. 1993. Conservation Biology of Tropical Trees: Demographic and genetic considerations. *Evolutionary trends in plants I*: 17-32.
- Pérez-Nasser, N., L. E. Eguiarte y D. Piñero. 1993. Mating system and genetic structure of the distylous tropical tree *Psychotria faxlucens* (Rubiaceae). *American Journal of Botany* 80: 45-52.
- Rick, C.M., E. Kesicki, J. F. Fobes y M. Holle. 1976. Genetic and biosystematic studies on two new sibling species of *Lycopersicon* from Interandean Peru. *Theoretical and Applied Genetics* 47: 55-68.
- Rzedoski, J. y H. Kruse. 1979. Algunas tendencias evolutivas en *Bursera* (Burseraceae). *Taxon* 28 (1, 2/3): 103-116.
- Rzedowski, J. y F. Guevara-Féfer. 1992. *Flora del Bajío y de regiones adyacentes Fascículo 3*. Instituto de Ecología, A. C. Centro Regional del Bajío. Pátzcuaro, Michoacán. México.

Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 236: 787-792.

Slatkin, M. 1985. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution* 39 (1): 53-65.

Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47: 264-279.

Slatkin, M. 1994. Gene Flow and Population Structure. Ed: L. A. Real (ed). *Ecological Genetics*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.

Slatkin, M. y N. H. Barton. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43: 1349-1368

Sokal, R. R. y C. D. Michener. 1958. A statistical method of evaluating systematic relationships. Univ. Kansas. *Sci. Bull.* 28: 1409-1438

Sokal, R. R. y F. J. Rohlf. 1981. *Biometry*. W. H. Freeman, San Francisco

Swofford, D. L. y R. B. Selander. 1989. BYOSIS-1: a computer program for the analysis of allelic variation in population genetic and biochemical systematics. Release 1.7. Illinois. Natural History Survey, Champaign, Illinois.

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

Toledo, C. 1982. El género *Bursera* (Burseraceae) en el estado de Guerrero (México). *Tesis de licenciatura*. UNAM. México.

Vázquez-Yanes, C y A. J. R. Toledo. 1990 Bases ecofisiológicas de la conservación de semillas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 49: 61-69.

Weir, B. S. 1990. *Genetic data analysis*. Sinauer, Sunderland, Mass

- Weir, B. S. y C. C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38 (6): 1358-1370.
- Wendel, J. F. y N. F. Weeden. 1989. Visualization and Interpretation of Plant Isozymes. En: D. E. Soltis and P. S. Soltis (eds.). *Isozymes in Plant Biology*, Discorides Press, Portland, Oregon; pp. 5-45.
- Werth, C. R. 1985. Implementing an isozyme laboratory at a field station. *Virg. Jour. Sci.* 36: 53-77.
- Workman, P. L. y J. D. Niswander. 1970. Populations Studies on Southwestern Indian Tribes. II. Local Genetic Differentiation in the Papago. *American Journal of Human Genetics* 22: 24-29.
- Wright, S. 1978. *Evolution and the genetics of population*. Vol. 4. Variability within and among populations. University of Chicago press, Chicago.
- Wyatt, R. 1989. A general protocol of starch gel electrophoresis. (Manuscrito).
- Wyatt, R. 1992. Conservation of rare and endangered bryophytes: input from population genetics. *Biological Conservation* 59: 99-107.
- Yen, F. Ch. H. y D. M. O'Malley. 1980. Enzyme variation in natural populations of Douglas-Fir, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco from British Columbia. I. Genetic Variation Patterns in Coastal Populations. *Silvae Genetica* 29, 3-4: 83-92.

1 APENDICE

Buffer de extracción para *Abies*

El buffer de extracción se prepara mezclando tres partes del buffer YO con una parte del buffer Veg II.

YO (Yen et al., 1980) (para preparar 100 ml)

10 ml solución Tris-ácido cítrico pH 7.0

0.05 g NADP

0.05 g NAD

0.018 g ácido ascórbico

0.034 g EDTA

0.10 g albúmina bovina

0.33 ml 2-mercaptoethanol

Llevarlo a 100 ml con agua destilada

Veg II (Cheliak y Pitel, 1984)

0.31 g ácido bórico

2 ml Tergitol 15-S-9

2 g PEG 8000

7 g PVP 40

1 g PVP 360

0.88 g ácido ascórbico

0.02 g NAD

0.1 g albúmina bovina

0.005 g piridoxal 5-fosfato

0.27 g sacarosa

0.19 g cisteina-HCL

0.66 ml 2-mercaptoethanol

Llevarlo a 100 ml con agua destilada y ajustar el pH a 7.1 con NaOH

Preparación de la solución Tris-ácido cítrico pH 7.0

1.57 g Trizma base

0.83 g ácido cítrico

Llevarlo a 100 ml con agua destilada

Recetas utilizadas para preparar los sistemas del buffer:

(Calculadas para preparar un litro)

Sistema Morfolina (MC) (Wyatt 1989).

Buffer de charola:

0.04 M Acido cítrico monohidratado 8.4 g

Llevar a un litro con agua destilada

Ajustar el pH a 6.1 con N-(3-aminopropil) morfólin.

Buffer del gel

1 parte del buffer de charola

19 partes de agua destilada

Ajustar el pH a 6.1.

Sistema Mitton PP (Mitton et al., 1977)

Buffer de la charola:

0.031 M Hidróxido de Sodio (NaOH) 1.25 g

0.295 M Acido bórico 18.25 g

Llevar a un litro con agua destilada

Ajustar el pH a 7.5 con NaOH o con Acido bórico.

Buffer del gel

0.015 M Trizma Base 1.8 g

0.295 M Ac. Cítrico (monoh.) 0.7 g

Llevar a un litro con agua destilada

Ajustar el pH a 7.6 con NaOH o con Ac. cítrico

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Sistema R (May 1992)**Buffer de la charola**

Hidróxido de litio 2.51 g

Acido bórico 18.54 g

Llevar a un litro con agua destilada

Ajustar el pH a 8.1

Buffer del gel

Trizma Base 3.63 g

Acido cítrico .96 g

Agregar 10 ml del buffer de la charola

Llevar a un litro con agua destilada

Ajustar el pH a 8.5

Otras enzimas fueron ensayadas para el análisis electroforético, pero no se utilizaron ya que algunas presentaban poca o ninguna actividad y otras no eran consistentes en su lectura:

ADH Alcohol deshidrogenasa E.C.1.1.1.1

DIA Diaforasa E.C.1.6.99

G-6PD Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa E.C.1.1.1.49

GDH Glutamato deshidrogenasa E.C.1.4.1.3

IDH Isocitrato deshidrogenasa E.C.1.1.1.41

MDH Malato deshidrogenasa E.C.1.1.1.37

ME Enzima málica E.C.1.1.1.40

MNR Menadion reductasa E.C.1.6.99.2

PGM Fosfoglucosa-mutasa E.C.5.4.2.2

RUB Rubisco E.C.4.1.1.39

SDH Shikimato deshidrogenasa E.C.1.1.1.25

SOD Superóxido dismutasa E.C.1.15.1.1

Indicador en el corrimiento de los geles.

El colorante utilizado en el corrimiento de los geles fue un preparado de amido black con agua destilada, metanol y ácido acético en la proporción 5:5:1.

Recetas de tinción de las isoenzimas montadas.

ACPH Fosfatasa ácida E. C. 3. 2. 3. 2 (Hakim-Elahi, 1976)

Buffer 1M de Na Ac pH 5.0	5 ml
Agua destilada	50 ml
α -Naphthyl acid phosphate (monosodium)	100 mg
Fast Garnet GBC salt	.125 gr.

Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente.

CPX Peroxidasa catódica E. C. 1. 11. 1. 7 (Hakim-Elahi, 1976)

Dimetilformamida	7 ml
Agua destilada	90 ml
Peróxido de Hidrógeno al 3 %	1 ml
Cloruro de Calcio al 1 %	2 ml
1 M Acetato de Sodio pH 5.0	5 ml
3-amino-9-ethylcarbazole	100 mg

Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente.

Buffer 1M de Acetato de Sodio pH 5.0

Acetato de Sodio trihidratado 136.1

Agua destilada 1000 ml

Ajustar el pH con Acido Acético.

EST Esterasa E. C. 3. 1. 1.- (Hakim-Elahi, 1976)

Fast Blue RR Sal 50 mg

a-Naphthyl acetato 25 mg

Disolver muy bien en 2 ml de acetona y añadir:

Buffer de fosfatos 1 M pH 6 5 ml

Agua destilada 45 ml

Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente.

GOT Glutamato oxaloacetato transaminasa E. C. 2. 6. 1. 1 (Wyatt, 1989)

Tris-HCl 0.2 M pH 7.0 50 ml

Substrato GOT pH 7.0 5 ml

Pyridoxal 5 fosfato 0.04g

Fast Blue BB Sal 0.150g

Incubar en la obscuridad a 37 grados centígrados.

Substrato GOT

Acido L-aspártico 4g

Acido a-Ketoglutarico 2g

Agua destilada 100 ml

Ajustar el pH con NaOH

LAP Leucil aminopeptidasa E. C. 3. 4. 11. 1 (Werth, 1985)

Buffer Tris-maleato 0.2 M pH 5.2 50 ml

L-lucina-b-natlamida-HCl al 2.5% 1 ml

Incubar en la obscuridad a 37 grados centígrados durante 30 minutos y posteriormente añadir 100 mg de Fast Black K Sal disueltos en 5 ml de agua destilada. Dejar incubando hasta que aparezcan las bandas.

PGI Fosfoglucoosa isomerasa E. C. 5. 3. 1 9 (Modificada de Conkle et al. 1982)

0.05 M Tris-HCl PH 8.0	50 ml
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (10 u/ml)	3 ml
1 M MgCl ₂	1 ml
b-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (TPN) al 1%	1 ml
(3-(4,5-dimethylthiazol-1,2-y1)-2,5 diphenyltetrazolium) (MTT) al 1%	1 ml
phenazine methosulfato (PMS) al 1%	0.5 ml
D-fructosa-6-fosfato, sal disódica	25 mg

Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente.