

82.
20j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

NIVELES Y PATRONES DE VARIACION
ISOENZIMATICA EN EL GENERO *Abies* DEL NORTE
DE MEXICO

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 :

ANDRES FEDERICO KEIMAN FREIRE

DIRECTOR DE TESIS: GLENN R. FURNIER WHITELAW



MEXICO, D. F.

1997

**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 Ratule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: "Niveles y Patrones de Variación Isoenzimática en el Género Abies del Norte de México"

realizado por Andrés Federico Keiman Freire

con número de cuenta 9077079-7 , pasante de la carrera de Biología.

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Dr. Glenn R. Furnier Whitelaw

Glenn R. Furnier

Propietario Dr. Luis E. Eguiarte Fruns

Luis E. Eguiarte

Propietario Dr. Eduardo Morales Guillaumin

Eduardo Morales

Suplente Dra. América N. Castañeda Sortibrán

América N. Castañeda

Suplente Dr. Daniel Piñero Dalmau

Daniel Piñero

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

[Signature]
M.C. Alejandro Martínez Mena



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

Entre todas las raíces que me llenan
la más terrible y firme es la vida.

D. Mir

Son cada vez más grandes las cadenas,
son cada vez más grandes las serpientes,
más grande y más cruel su poderío,
más grande sus anillos envolventes,
más grande el corazón, más grande el mío

M. Hernández

A papá, a mamá y a Carolina.
A la memoria de mis abuelos, Julio y Asunción y a
mi tío Toto.

ÍNDICE

RESUMEN	2
INTRODUCCION	3
El papel de la genética de poblaciones	3
La técnica de electroforesis y el estudio de isoenzimas	4
Diversidad y distribución del género <i>Abies</i>	5
Descripción taxonómica	6
El estudio de los <i>Abies</i> en México	8
OBJETIVOS	12
METODOLOGÍA	13
Colecta	13
Electroforesis	13
Análisis estadístico	16
RESULTADOS	19
Variación genética	19
Índices de fijación	21
Diferenciación genética	23
Distancias genéticas	24
Aislamiento por distancia	26
DISCUSIÓN	30
BIBLIOGRAFÍA	36
APÉNDICES	41
Apéndice 1 Sistemas de electroforesis	41
Buffer de extracción	41
Enzimas	42
Apéndice 2 Frecuencias alélicas	44

RESUMEN

El género *Abies* en México tiene alrededor de ocho especies, de las cuales cuatro se encuentran en el Norte del país, *Abies concolor*, *A. durangensis*, *A. durangensis* var. *coahuilensis* y *A. vejari*. Para este estudio realicé un análisis de isoenzimas, el cual ha sido un método utilizado frecuentemente para examinar la estructura genética y filogenia en plantas por su rapidez y sencillez. Determiné la estructura genética para cinco poblaciones de *A. concolor*, cinco de *A. durangensis*, tres de *A. durangensis* var. *coahuilensis*, cinco de *A. vejari* y una población de *A. lasiocarpa* (empleada como grupo externo). El 29.9 % de los 16 loci examinados resultaron polimórficos. Los niveles de variación genética ($H_0 = 0.063$) resultaron ser comparablemente bajos con respecto a otras especies del género *Abies* y demás coníferas. Por el contrario la diferenciación entre poblaciones fue alta ($F_{ST} = 0.205$). El fenograma (UPGMA) basado en las distancias genéticas de Nei ($D_T = 0.028$) no nos presenta un claro patrón en el que se puedan agrupar a las distintas especies. Es probable que la existencia de sistemas montañosos separados por grandes extensiones de tierra causen un aislamiento geográfico entre las distintas poblaciones de *Abies*, o que la existencia de errores en la clasificación actual pueden llegar a producir una diferenciación genética entre estas poblaciones. Todo esto nos hace pensar que las poblaciones de *Abies* fueron afectadas en un pasado no muy lejano por eventos de cuellos de botellas o principio de fundador, provocando una reducción en los tamaños efectivos de las poblaciones. Sin embargo en la actualidad parecería que dichas poblaciones se han recuperado y que lo que estamos percibiendo son los efectos de la deriva génica y/o la endogamia. Por esto se hace imperativo conservar la mayor cantidad posible de poblaciones.

INTRODUCCIÓN

Los patrones de diversidad genética que vemos actualmente se deben a la historia evolutiva de las especies. Los estudios de la variación y diferenciación genética nos permiten entonces saber que procesos evolutivos están actuando sobre las especies y poblaciones y cuanta diversidad genética tenemos en ellas. Estos estudios nos han revelado que la diversidad está asociada a ciertos patrones ecológicos, eventos históricos y a las características de vida de los organismos (Hamrick y Godt 1990, Hamrick *et al.* 1992, Parker y Hamrick 1996, Leonardi *et al.* 1996). Estos estudios nos han revelado un número insospechado de fenómenos genéticos y llevado a plantear preguntas y aplicaciones nuevas para la genética de poblaciones (Clegg 1990), como la estimación de las relaciones filogenéticas entre las especies y poblaciones y el diseño de planes de conservación y manejo de recursos genéticos (Meffe y Carroll 1994, Frankel *et al.* 1995, Hillis y Moritz 1995).

El papel de la genética de poblaciones

La genética de poblaciones es la herramienta que nos permite conocer cuales son los niveles de variación genética dentro de las poblaciones y de diferenciación entre ellas. Además, nos da las armas para explicar esta variación en función de los procesos evolutivos que están actuando sobre las poblaciones en estudio. En otras palabras, es el estudio de como las leyes mendelianas y otros principios genéticos se aplican a poblaciones naturales, ya que la evolución es esencialmente producto de los cambios graduales en la composición genética de éstas (Hartl y Clark 1989). Para realizar estos estudios se analizan las frecuencias alélicas y genotípicas, a partir del modelo de equilibrio de Hardy-Weinberg (Roughgarden 1979, Hartl y Clark 1989, Eguiarte 1990), el cual predice la relación entre las frecuencias alélicas y genotípicas en ausencia de cualquier fuerza evolutiva.

Inicialmente el objetivo de la genética de poblaciones era incorporar las ideas de la selección natural de Darwin y Wallace con las teorías de la genética mendeliana. Pero en la actualidad el estudio de la genética de poblaciones se aplica en múltiples disciplinas como la conservación de la diversidad biológica (Soulé y Mills 1992, Ellstrand y Elam 1993, Meffe y Carroll 1994), la cruce de animales de zoológicos (Laikre y Ryman 1991), el estudio de especies introducidas y colonizadoras (Aguirre-Planter 1994), el estudio de sistemas de apareamiento (Schroeder 1989b, Clegg 1990) y el estudio de la diversidad genética en general. Estos estudios juegan un papel fundamental en las teorías de la evolución porque permiten comprender procesos evolutivos como la selección natural, mutaciones, flujo génico, deriva génica y endogamia (Clegg 1990), además de ser un importante factor en la problemática de definición taxonómica.

La técnica de electroforesis y el estudio de isoenzimas.

La técnica más difundida en el estudio de la variabilidad genética es la electroforesis de isoenzimas. La electroforesis es el movimiento de moléculas a través de un gel bajo la influencia de corriente eléctrica. Estas moléculas van a correr a diferentes velocidades debido a su polaridad y peso. La dirección en que corren, en general, es del ánodo al cátodo (Conkle *et al.* 1982, Cheliak y Pitel 1984; Hillis y Moritz 1995, Acquaah 1992). Generalmente el gel es de almidón. Por lo común se emplea una concentración de 10-12%, esta depende de las propiedades de las enzimas del organismo que estamos analizando. También los buffers van a cambiar según las isoenzimas que corramos. En la actualidad existen una enorme cantidad de recetas para montar el sistema de electroforesis en geles de almidón (Cheliak y Pitel 1984, Conkle *et al.* 1982).

Es una técnica sencilla que desde 1966 con los estudios clásicos de Lewontin, Hubby y Harris ha permitido avanzar la comprensión sobre como intervienen los procesos evolutivos en las poblaciones (Hillis y Moritz 1995, May 1992). A partir de que las isoenzimas en plantas fueron reportadas por primera vez, en 1969 por R. Scogin (Eguarte 1990), el desarrollo de las técnicas electroforéticas han proveído un método directo para estimar la diversidad genética dentro y entre poblaciones de estos organismos (Hamrick *et al.* 1992). Siendo ampliamente difundidas de ese

entonces a la fecha, pudiendo encontrar una gran cantidad de trabajos sobre la variabilidad genética en enzimas y no solo en plantas, sino en cualquier organismo que nos queramos imaginar.

Este fenómeno se debe a que tienen múltiples ventajas, entre ellas el tener resultados de manera rápida y relativamente barata en comparación con otros marcadores moleculares y presentan, además una alta heredabilidad (Adams 1983) Otra cualidad importante es la de poderse obtener en una gran variedad de tejidos, como son hojas adultas y juveniles, yemas de crecimiento, polen y semillas (Brown y Moran 1981, Adams 1983) Las isoenzimas usualmente se expresan codominantemente y segregan en proporciones mendelianas (Conkle y Adams 1977, Adams 1983), por lo que pueden ser estudiadas con facilidad por el modelo de equilibrio de Hardy-Weinberg. Los estudios realizados en isoenzimas han contribuido esencialmente en el conocimiento de muchos grupos de plantas y animales, incluyendo las coníferas (Conkle 1974, Mitton 1983, Mitton 1992).

Diversidad y distribución del género *Abies*.

El género *Abies*, comúnmente conocido en México como oyamel, abeto o pinabete, pertenece a la familia Pinaceae. Fue establecido por Miller en el año de 1754 con *A. alba* como especie tipo (Schroeder 1989a). En ese entonces Miller los clasificó junto a otros géneros como *Picea* y *Tsuga*, considerándolos a todos dentro de un mismo taxón. Es hasta el siglo diecinueve cuando Spach (1842) realizó la primer tentativa de crear una clasificación genérica, proponiendo una división de cinco secciones: Sección *Picea*, Sección *Piceaster*, Sección *Peuce*, Sección *Peuceoides* y Sección *Micropeuce* (Farjon y Rushforth 1989). Desde el momento en que el género *Abies* fue establecido como tal, existieron diversas propuestas para llevar una clasificación. Hubo quienes se limitaron estrictamente a hacer referencia por las áreas que ocupaban o por sus caracteres primarios para la realización de un esquema. Hoy en día la clasificación se ha detallado más y se fundamenta en los caracteres vegetativos y reproductivos (conos), además de hacer referencia a la ecología y geografía que los rodean. Es obviamente una forma más objetiva de clasificarlo y por supuesto complace mucho más a una mayoría de los investigadores que se dedican al estudio de este género (Farjon y Rushforth 1989).

En la actualidad la discusión con respecto a estas otras coníferas hermanas a los *Abies* ha sido resuelta, definiéndose a cada uno como géneros independientes entre sí (Farjon y Rushforth 1989). Sin embargo, los problemas de clasificación dentro del género *Abies* todavía subsisten, ya que su morfología es muy poco variable entre ellos y para colmo existen datos de hibridación, hasta en especies consideradas como muy distintas (Liu 1971; St. Clair y Critchfield 1988). Pero a pesar de estas dificultades se ha podido hacer una clasificación y hoy en día se reconocen aproximadamente entre unas 40 y 60 especies de *Abies* en todo el mundo (Liu 1971, Farjon y Rushforth 1989; McVaugh 1992)

En general los abetos son árboles que conforman de manera trascendental el paisaje de los bosques de las regiones boreales y de grandes altitudes del Hemisferio Norte de nuestro planeta. En la mayoría de los casos los abetos están asociados siempre con una o dos especies de coníferas en el mismo área, como son *Picea*, *Tsuga*, *Pseudotsuga*, *Larix*, *Juniperus* y *Pinus* (Liu 1971)

Descripción taxonómica.

La siguiente descripción de los *Abies* fue realizada principalmente por Martínez (1948 y 1963) y Liu (1971). Son árboles corpulentos, siempre verdes, resinosos, de copa simétrica y aguda. Son plantas diploides cuyo número cromosómico es de $2n = 24$. El tronco es erguido y simple, llega a medir de 30 a 40 metros de altura, pero se han registrado individuos de mayor longitud, con un ancho de 40 a 150 cm de diámetro. En general las ramas comienzan a poca altura y pueden ser horizontales o algo levantadas

La corteza en los árboles adultos es oscura, gruesa y hendida, con placas escamosas e irregulares. Mientras que, en los árboles jóvenes se presenta de forma grisácea y más o menos lisa. Las ramillas, estructura del tallo donde se encuentran las hojas, son siempre opuestas y frecuentemente disticas, su color en lo general es moreno rojizo llegando a veces a un tinte violáceo. La superficie más o menos hirsuta, rara vez glabra

Las hojas son persistentes y lineares, sésiles, rectas o algo falcadas, muy delgadas en algunas especies o relativamente gruesas. Por regla general son tiesas y algo coníceas y en su mayoría desprenden aroma. Las dimensiones varían considerablemente de unos 18 a unos 70 mm. Su color

oscila de un verde claro a uno oscuro, siendo en la cara superior relativamente brillosas y en la inferior opacas y glaucas, a veces de forma muy marcada.

Es importante en la determinación de especies considerar la base, el limbo y el ápice de la hoja. La base en la mayoría de la especies es más o menos torcida, por lo cual las hojas se colocan o dirigen a colocarse en un mismo plano, si esto no sucede entonces se ven orientadas en todas direcciones. El limbo es aplanado y lleva una hendidura en la cara superior que corresponde con una cresta, dependiendo de los casos puede ser saliente o no en la inferior. Ambas se desvanecen en el ápice. En el envés de la hoja se pueden observar estomas a ambos lados de la cresta, los cuales aparecen como puntos blanquecinos. En el haz es muy variable su presencia. El ápice es bastante variable según la especie, pudiendo ser agudo y a veces algo córneo, truncado, redondeado, obtuso o hendido. Como es un carácter constante se toma como un elemento importante en la clasificación dentro del género.

La disposición de las hojas en las ramillas se puede denominar de distintas maneras, si se extienden en un plano de uno y otro lado de las ramillas se denominan dísticas o pectinadas y cuando es en varios planos formando una V más o menos abierta se les llama subdísticas. No hay una forma definida de llamarlas cuando se orientan en todas direcciones. Las especies de *Abies* presentan cada una de estas orientaciones.

En los *Abies* generalmente los canales resiníferos son dos y están situados en la cara inferior, cerca de las extremidades, ya sea sobre la epidermis o la subepidermis. Aparte de estos dos canales que son constantes en todas las especies, pueden presentar otros que comúnmente son mayores en tamaño a los dos anteriores. Las yemas son globulosas u ovoides, situadas lateralmente y siempre protegidas por una capa más o menos gruesa de resina.

Los *Abies* son plantas monoicas. Los estróbilos masculinos se producen en la parte inferior del árbol. Los estróbilos femeninos (cono) se encuentran en la parte superior y constan de un eje erguido y persistente, con las escamas caducas. Tanto unas como otras se forman en la misma estación, pero permanecen en botón hasta la primavera siguiente. Los estróbilos masculinos son más numerosos, desarrollándose en la cara inferior de las ramillas y largamente ovaladas, de color purpúreo o amarillento, protegidos por una envoltura escamosa. Alcanzan una talla de 5 a 20 mm de largo y de 4 a 8 mm de ancho. El grano de polen contiene de dos a tres células protaliales. La célula

la *stalk*, célula del cuerpo y el tubo nuclear están embebidos en una vacuola protoplasmática, que está compuesta por numerosos granos de almidón.

Los estróbilos femeninos son oblongos (7-16 cm) y siempre se producen en las últimas ramillas de la punta del árbol. Son erectos y pueden estar solitarios o en grupos de dos a tres. Las escamas se agrupan en torno de un eje y llevan en su base a los óvulos, generalmente dos. Su color es moreno oscuro con matices violáceos o amarillento. El cono maduro es muy variable según la especie y pierde las brácteas rápidamente, quedando desnudo el axis (eje central donde se sostienen las escamas del cono).

La semilla es irregularmente oval-acuminada, frecuentemente angulosa o vagamente triangular, envuelta incompletamente en un capa resistente papirácea y lustrosa. Abajo de esta hay una capa membranosa que tiene vejigas llenas de resina aromática. En su parte superior tiene un ala, la cual es delgada y frágil.

El estudio de los *Abies* en México

En lugares como Canadá, Estados Unidos, Japón y países de Europa se conoce ampliamente la distribución y biología de los abetos, a diferencia de países como China y México, donde su estudio es prácticamente desconocido (Liu 1971), lo que no le resta la importancia biológica que pudieran tener. Por ejemplo, los bosques mexicanos de tipo boreal tienen una gran riqueza de especies, pero sólo cubren entre el 0.16% y 0.5% del área del país (Leopold 1950, Flores *et al.* 1971; Rzedowski 1986). Los bosques de *Abies* se desarrollan a grandes alturas que oscilan entre los 1,700 y 3,500 metros sobre el nivel del mar, por esta razón es que su distribución en las sierras es dispersa y localizada, provocando así un aislamiento por distancia entre las poblaciones. Esto les da una distribución como islas. Por otro lado son importantes como refugio para otras especies como es el clásico ejemplo de la mariposa Monarca en los estados de México y Michoacán o del venado Cola Blanca en los estados del Norte de la República (Hoth 1995; Snook 1995; Anderson y Brower 1996), por lo que conocer más su biología y realizar estudios de conservación se hacen relevante.

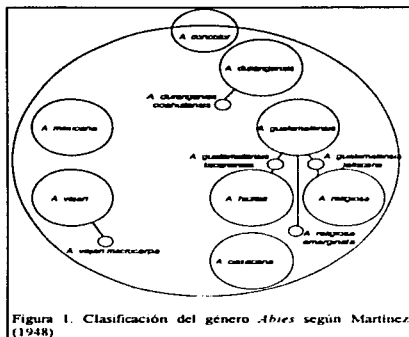


Figura 1. Clasificación del género *Abies* según Martínez (1948)

La primera clasificación que se realiza en México para el género *Abies* fue publicada por Maximino Martínez en el año de 1948. Martínez propuso un total de ocho especies y cinco variedades en todo el país, de las cuales seis son endémicas. Cuatro de las ocho especies y dos de las cinco variedades se encuentran en el Norte (figura 1). En contra parte Liu (1971), propuso para el Norte solo tres especies y dos variedades (*A. concolor*, *A. durangensis*, *A. vejarii*, *A. durangensis* var. *coahuilensis* y *A. vejarii* var. *mexicana*, que según Martínez (1948) es variedad

macrocarpa). Finalmente de manera más reciente en 1994, Debreczy *et al.* describieron una nueva especie en Durango, a la cual llama *A. neodurangensis*, sin modificar ninguna de las dos anteriores clasificaciones. Él también describió en México por primera vez la existencia de poblaciones de *A. concolor* var. *lowiana* en Chihuahua (tabla 1).

Uno de los factores que pueden hacer difícil la tarea de clasificar a estos árboles, podría ser la existencia de flujo génico entre las poblaciones. El flujo génico es el movimiento de genes entre poblaciones, y puede jugar un rol importante en la estructura genética de las mismas (Ellstrand 1992). Las consecuencias de este proceso evolutivo son la de homogeneizar entre sí las poblaciones reduciendo así la diferenciación entre éstas. Este flujo en plantas se da a larga distancia a través del polen (Hamrick *et al.* 1992, Ellstrand 1992).

Tabla 1. Caracteres taxonómicos de las especies del género *Abies* que habitan en el Norte de México según Martínez (1948).

<i>A. durangensis</i> Martínez	<ul style="list-style-type: none"> • Ramillas subglabras o hirsutas. • Haces vasculares separados y con abundantes células de refuerzo • Canales resiníferos sobre la subepidermis. • Bráctea incluida y siempre pequeña, brevemente acuminada en el ápice, llegando hasta un tercio o un medio de la escama
<i>A. durangensis</i> var <i>coahuilensis</i> , (Johnston) Martínez. Comb. nova.	<ul style="list-style-type: none"> • Ramillas hirsutas • Haces vasculares muy aproximados y con pocas células de esfuerzo • Canales resiníferos sobre la epidermis • Bráctea incluida, pero mayor, redondeada o truncada en el ápice, llegando frecuentemente más allá de la mitad de la escama o hasta cerca del borde
<i>A. vejari</i> , Martínez.	<ul style="list-style-type: none"> • Hojas más o menos hendidas en la cara superior • Bráctea excerta y gradualmente cuneada, no estrangulada con punta larga y aguda. • Ramillas glabras y haces vasculares aproximados
<i>A. vejari</i> var. <i>macrocarpa</i> , Martínez.	<ul style="list-style-type: none"> • Hojas aplanadas en la cara superior o con cresta en ambas caras • Bráctea incluida, estrangulada y con punta corta • Ramillas finamente hirsutas y haces vasculares separados
<i>A. mexicana</i> , Martínez.	<ul style="list-style-type: none"> • Bráctea incluida • Hojas orientadas en todas direcciones y con el ápice no emarginado, obtuso o agudo, a veces redondeado
<i>A. concolor</i> , (Gord. et Glend) Hopcs	<ul style="list-style-type: none"> • Estomas numerosos en ambas caras • Bráctea incluida • Hojas dísticas o subdísticas

Por medio de estudios paleobotánicos se ha podido determinar que el origen de los *Abies* en Norteamérica ocurrió a principios o antes de la mitad del Eoceno del periodo Terciario, aproximadamente hace unos 50 millones de años (Liu 1971). Varios autores proponen que poblaron las zonas bajas de los desiertos del Norte de México (Critchfield 1984, Thompson *et al.* 1993, Webb III *et al.* 1993, Graumlich y Brubaker 1995), sin embargo donde se encuentran discrepancias es como y cuando se dio la separación y constitución de las poblaciones actuales. Este fenómeno se debe principalmente a que es difícil encontrar plantas fósiles bien conservadas. A pesar de este in-

conveniente, algunos investigadores creen que el aislamiento entre las poblaciones podría haberse efectuado de forma relativamente reciente, por lo que sería otra causa explicativa del porqué es difícil diferenciarlos de una manera clara (Graumlich y Brubaker 1995).

Como ya mencioné anteriormente, la tasa de hibridación entre las diferentes especies de *Abies* es muy alta (Liu 1971, St. Clair y Critchfield 1988), lo que aclararía también las razones de la difícil tarea de determinar una especie de otra y que la clasificación no sea más objetiva. Aparte de los puntos anteriores, en nuestro país el problema se agranda, pues tenemos que dicha identificación se hace más complicada, debido a que la morfología entre las especies puede causar confusión, pues los caracteres se sobrelapan y no quedan lo suficientemente claros. Es por esta razón que la taxonomía de los *Abies* mexicanos es tan confusa, además de lo poco estudiados que están. Por eso es relevante hacer otros estudios para definir mejor la taxonomía del género en el país. Esta información podría ser muy útil en el diseño de planes de conservación de los bosques de *Abies* y por consiguiente también defender a otras especies que habitan en ellos, como la mariposa Monarca.

Como sabemos, las circunstancias de nuestro tiempo no nos permiten conservar todas las áreas naturales que nosotros quisiéramos. Por lo que saber que tan diferentes son las poblaciones entre sí, nos facilita determinar cuales áreas son más "importantes" que otras. El calcular la variabilidad genética de una especie, en este caso la del género *Abies*, nos resuelve el problema de definir cuales poblaciones deben mantenerse lo menos perturbadas posible.

Esto nos lleva a preguntarnos entonces ¿cuál es el nivel de variabilidad dentro estas poblaciones?, ¿qué tan distintas son las poblaciones?, ¿cómo se distribuye la variación entre las poblaciones de la misma y diferente especie? Para contestarnos estas preguntas nos ayudamos de la genética de poblaciones. Las isoenzimas son una herramienta importante que nos permiten definir la variabilidad genética de las poblaciones (Lewis y Cech 1969; Conkle *et al.* 1982; Pitel y Cheliak 1984; Conkle 1992).

OBJETIVOS

- Estimar los niveles de variación en las poblaciones de las especies de *Abies concolor*, *A. durangensis*, *A. durangensis* var. *coahuilensis* y *A. vejari* del Norte de México
- Estimar el grado de diferenciación genética entre poblaciones y especies
- Contribuir en el esclarecimiento sobre la problemática taxonómica del género
 - Estimar el nivel de diferenciación entre *A. durangensis* var. *coahuilensis* y *A. durangensis* para analizar si se pueden definir como dos especies distintas.
 - Definir si *A. concolor* puede ser considerado como el taxón con mayor número de caracteres ancestrales dentro de los *Abies* del Norte de México como propuso M. Martínez en 1948.

METODOLOGÍA

Colecta

El total de poblaciones muestreadas entre las cinco especies fue de 19; cinco de *A. concolor*, cinco de *A. durangensis*, tres de *A. durangensis* var. *coahuilensis*, cinco de *A. vejari* y una de *A. lasiocarpa*, esta última para usarse como grupo basal (tabla 2) Las localidades generalmente tienen por común estar en zonas altas, sin embargo las condiciones del suelo, la geografía y la vegetación circundantes son relativamente variables. Los sitios de estudio se encuentran en zonas ejidales, comunales o reservas, con excepción de las de *A. durangensis* var. *coahuilensis* que eran propiedad privada (figura 2). La colecta fue realizada en Abril, Mayo, Noviembre y Diciembre de 1995.

Se colectaron un promedio de 39 individuos por localidad, cortando una rama de 20 centímetros de largo para cada individuo y se guardaron en bolsas de plástico Ziploc. Las hojas no estuvieron más de una semana en el campo, esto con el fin de que no se echaran a perder las muestras. En algunos casos con las mismas bolsas de plástico introducimos hielo para conservar una temperatura baja.

Electroforesis

La extracción de las enzimas se efectuó a partir de las yemas de crecimiento de las ramas, por haber en estas precisamente una alta actividad enzimática. Una vez desnuda la yema se puede guardar en un microtubo con un buffer de extracción, compuesto de una parte del buffer de Yeh y O'Malley (1980) y tres partes del buffer Veg II de Pitel y Cheliak (1984), a una temperatura de -20° C por un lapso de cuatro a cinco meses.

El método que empleamos para determinar la diversidad enzimática fue el de electroforesis horizontal en geles de almidón (Conkle *et al.* 1982, Cheliak y Pitel 1984, Hillis y Moritz 1995). Se emplearon dos sistemas de buffers y se extrajo un total de 11 enzimas, obteniéndose

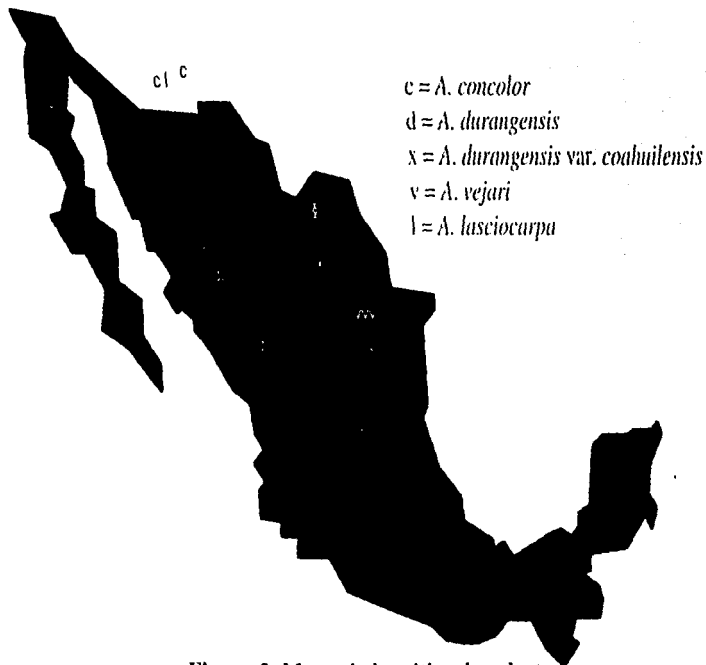


Figura 2. Mapa de los sitios de colecta

Tabla 2. Ubicación de las poblaciones del género *Abies* en el Norte de México que se utilizaron para este estudio isoenzimático.

CLAVE	ESPECIE	LOCALIDAD	MUNICIPIOS	ALTURA
C23	<i>concolor</i>	San Pedro Martir	Ensenada, BCN	3069
DC24	<i>durangensis</i> var <i>coahuilensis</i>	Sierra la Madera	Cuatrociénegas, Coah	2280
DC25	<i>durangensis</i> var <i>coahuilensis</i>	Rincón de Maria	Muzquiz, Coah	1710
DC26	<i>durangensis</i> var <i>coahuilensis</i>	Sierra del Carmen	Muzquiz, Coah	2430
V27	<i>vejaris</i>	Jame	Arteaga, Coah	2850
V28	<i>vejaris</i>	Mesa de las Tablas	Arteaga, Coah	2880
V29	<i>vejaris</i>	Los Lirios	Arteaga, Coah	2700
V30	<i>vejaris</i>	Cerro del Potosí	Galeana, NL	2100
D31	<i>durangensis</i>	Pinos Altos	Ocampo, Coah	2190
C32	<i>concolor</i>	Pinos Altos	Ocampo, Coah	2400
C33	<i>concolor</i>	Arroyo de las Garrochas	Madera, Chih	2730
D34	<i>durangensis</i>	Creal	Bocoma, Chih	2430
D35	<i>durangensis</i>	Cerro Las Iglesias	Balleza, Chih	3030
C36	<i>concolor</i>	Mount Graham	Graham, Az	2670
C37	<i>concolor</i>	Mount Lemmon	Pine, Az	2970
L38	<i>lasiocarpa</i>	Mount Lemmon	Pine, Az	2970
D39	<i>durangensis</i>	Paraje Sta Bárbara	El Salto, Dur	2910
D40	<i>durangensis</i>	Los Bancos	El Salto, Dur	2970
V50	<i>vejaris</i>	Zaragoza	Zaragoza, NL	2610

la resolución de 16 loci en gels con una concentración del 10% de almidón (Sigma). Los sistemas que se corrieron son los siguientes: el sistema H (Cheliak y Pitel, 1984), con las enzimas ácido fosfatasa (ACPh), fosfoglucomutasa (PGM), isocitrato deshidrogenasa (IDH), menadiona reductasa (MNR) y shikimato deshidrogenasa (SDH), y el sistema R (Ridgeway *et al.* 1970, Weber 1980) con las enzimas fosfoglucoasa isomerasa (PGI, dos loci), glutamato deshidrogenasa (GDH), leucina aminopeptidasa (LAP, dos loci), peroxidasa anódica (APX, dos loci), peptidasa (PEP, tres loci) y rubisco (RUB) (Apéndice 1). Los diferentes loci fueron numerados secuencialmente para cada enzima, asignando el número más bajo para el que emigrara con mayor velocidad. Los alelos para cada locus también fueron definidos de manera similar.

Análisis estadístico

Las cuatro medidas standard de la variación genética fueron calculadas para todas las especies y poblaciones con el programa de cómputo Biosys 1 (Swofford y Selander 1981). Estas medidas de diversidad genética incluyen la proporción de loci polimórficos (P), la cual se calculó a partir de un número x de loci polimórficos en una muestra de m loci (Hedrick 1983):

$$P = x / m$$

Un locus fue clasificado como polimórfico si tuvo más de un alelo. Esta medida toma los valores de cero a uno, interpretándose como cero la falta de variación y uno que todos los loci fueron polimórficos.

La heterocigosis promedio esperada (H_e), que puede calcularse en el equilibrio de Hardy-Weinberg para un locus con n alelos como

$$H_e = (1 - \sum p_i^2)$$

donde p, son las frecuencias alélicas para dicho locus. También se obtuvo la heterocigosis promedio para cada población con las heterocigosis esperadas para todos los loci estudiados (Hedrick 1983). Este índice también toma valores de cero a uno, considerando otra vez a los valores cercanos a cero como falta de variación y los próximos a uno como un alto nivel de variación. Por otro lado se obtuvieron las heterocigosis observadas (H_o) de cada uno de los loci y las poblaciones. Y finalmente la última medida de variación fue la media del número de alelos por locus (A), que se obtiene a partir de,

$$A = a / l$$

donde a es el número de alelos en una población y l es el número de loci en la misma (Hedrick 1983).

Para investigar si hubo una desviación de las frecuencias genotípicas esperadas por el equilibrio de Hardy-Weinberg, se estimaron los índices de fijación F (Wright 1969)

$$F = (1 - H_o) / H_e$$

donde H_o es la proporción de heterócigos observados y H_e es la proporción de heterócigos esperados. Si el valor de este índice es equivalente a cero, entonces definimos a la población dentro del equilibrio de Hardy-Weinberg, pero si los valores adquieren un signo estará fuera del equilibrio. Si este signo es positivo decimos que existe una deficiencia de heterócigos y si es negativo un exceso

de los mismos. Se probó si los F difirieron significativamente de cero por medio de una prueba χ^2 (Workman y Niswander 1970).

Adicionalmente se incluyen las medidas que nos describen los niveles de diferenciación genética entre las poblaciones y dentro y entre las especies. Primero se hizo pruebas de χ^2 para ver si habían deferencias en las frecuencias alélicas entre poblaciones (Workman y Niswander 1970). También se estimaron los estadísticos F (Wright, 1969) que miden, que tan diferentes son genéticamente las poblaciones entre sí. Para esto existen tres diferentes coeficientes de F, los cuales son designados a partir de la variación total de las poblaciones (T), de las subdivisiones (S) y de las individuales (I). Estos tres valores, F_{ST} , F_{IT} y F_{IS} , están relacionados entre sí (Hedrick 1983):

$$F_{ST} = (F_{IT} - F_{IS}) / (1 - F_{IS})$$

F_{ST} es una medida que nos indica la diferenciación genética entre las poblaciones y siempre da un valor positivo, en el caso que una estimación sea negativo se considera como cero. Podemos calcularlo de la siguiente manera:

$$F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T$$

donde H_S es el promedio de la heterocigosis esperada de todas las poblaciones y H_T es el promedio de la heterocigosis esperada dentro de cada una de las poblaciones en estudio (Hedrick 1983).

En tanto F_{IS} y F_{IT} son medidas de la desviación de las frecuencias genotípicas observadas de las esperadas con equilibrio de Hardy-Weinberg dentro de las poblaciones y en el total de todas estas, respectivamente. Al igual que en los índices de fijación F, los valores positivos indican una deficiencia de heterócigos y los negativos un exceso. Estas medidas se pueden obtener:

$$F_{IS} = (H_S - H_O) / H_S$$

$$F_{IT} = (H_T - H_O) / H_T$$

donde H_O es el promedio de la heterocigosis observada de las poblaciones, H_T es el promedio de la heterocigosis esperada de todas las poblaciones y H_S es el promedio de la heterocigosis esperada dentro de cada una de las poblaciones en estudio (Hedrick 1983).

Por otro lado se calculó una matriz de distancia genética de Nei (1978), que es:

$$D = -\ln(J_{XY} / (J_X J_Y)^{1/2})$$

donde J_{xy} es la probabilidad de escoger un par de alelos idénticos, uno de la población x y otro de la y , y J_x y J_y son las probabilidades de escoger un par idéntico dentro de cada población estudiada (Hartl y Clark 1989). La distancia genética puede tener valor de cero, si las frecuencias alélicas de las poblaciones son idénticas, hasta infinito si las poblaciones no tiene ningún alelo en común (Hedrick 1983). De esta distancias, se construyó un fenograma usando el algoritmo UPGMA (Sneath y Sokal 1973).

También se realizó un análisis para ver si la relación entre el flujo génico y la separación geográfica seguían un patrón de aislamiento por distancia. Este concepto fue introducido por Sewall Wright (1943) para describir la acumulación de diferencias genéticas locales bajo una dispersión geográfica restringida.

Se ha visto que en una población con dispersión restringida existe una simple relación entre la medida indirecta del flujo génico para pares de poblaciones (M) y la distancias geográficas, así como en poblaciones dentro o fuera del equilibrio y que esta relación es relativamente independiente de la tasa de mutación, cuando dicha tasa es pequeña (Slatkin 1993). Para esto primero se efectuó la estimación indirecta de los niveles de flujo génico (M) para pares de poblaciones según Slatkin (1993):

$$M = (1 - F_{ST}) / 4 F_{ST}$$

Donde F_{ST} es la diferenciación genética. El calcular dicha estimación nos permite hacer una regresión de los valores de M contra las distancias geográficas entre las poblaciones. Para hacer esta regresión calculamos los logaritmos en base diez de las distancias geográficas ($\log_{10} D$) y la estimación indirecta del flujo génico ($\log_{10} M$). Si se cumple el patrón de aislamiento por distancia, la pendiente de la regresión tendría que ser de -1.0 para una distribución lineal de las poblaciones y de -0.5 para el caso de dos dimensiones (Slatkin 1993).

Como sugiere Hellberg (1996) se usó el número de poblaciones menos dos como medida para los grados de libertad y así saber los niveles de significancia de los coeficientes de relación (r^2) y por lo tanto los de la prueba en general. Como explicamos en la introducción debido a la alta probabilidad de hibridación entre las especies del género *Abies* (Liu 1971; St. Clair y Critchfield 1988), en este estudio calculamos el flujo génico tanto para cada una de las especies como para el total de las poblaciones.

RESULTADOS

Variación genética

De los 16 loci ensayados en todas las poblaciones estudiadas 14 resultaron polimórficos, sin embargo, si se analiza por locus la mayoría presenta bajo polimorfismo. Los loci que resultaron monomórficos en todas las poblaciones fueron la GDH y la RUB (ver el Apéndice 2). Aparte de estos dos loci mencionados, por especies resultó que existieron cuatro loci monomórficos en *A. concolor*; IDH, LAP2, PGM y PEP3 ($P = 0.35$), tres en *A. durangensis*; ACPh, LAP1 y PEP1 ($P = 0.263$), siete en *A. durangensis* var. *coahuilensis*, ACPh, LAP1, PG11, PG12, PGM, PEP3 y MNR ($P = 0.312$) y siete en *A. vejari*; LAP1, LAP2, PGM, PEP1, PEP2, PEP3 y MNR ($P = 0.238$) (tabla 3). El valor más alto en la proporción de loci polimórficos (tabla 3) lo presentaron las poblaciones C36 y D40 y fue de 0.5, en tanto el más pequeño lo tuvieron las poblaciones V29, C32 y D39, adquiriendo el valor de 0.188. El promedio general de polimorfismo en todas las poblaciones fue de 0.299.

En la tabla (4) se muestra el análisis de la variabilidad por especies. En donde resultó que *A. concolor* fue la que tuvo una mayor variación genética con una $H_0 = 0.067$, y *A. durangensis* la menor con una $H_0 = 0.055$. De las dieciocho poblaciones analizadas en total, solo dos resultaron no ser diferentemente significativas, mientras que por especies todas resultaron ser significativas.

El promedio de la heterocigosis esperada (H_e) para todas las poblaciones fue de 0.099 y el promedio de las heterocigosis observadas (H_0) para todas las poblaciones fue de 0.063 (tabla 3). Las poblaciones que tuvieron los valores de heterocigosis esperada y observada más altos fueron la C36 ($H_e = 0.145$) y la V30 ($H_0 = 0.115$), mientras que los valores más pequeños se concentraron en una sola población que fue la C32, con una $H_e = 0.022$ y una $H_0 = 0.046$.

El promedio del número de alelos por locus (A) en todas las poblaciones fue de 1.33 y fue casi igual en todas las especies (1.35 en *A. concolor*, 1.32 en *A. durangensis*, 1.33 en *A. durangensis* var. *coahuilensis* y 1.28 en *A. vejari*). En el caso de los valores extremos, presentaron el

mismo comportamiento que en la proporción de loci polimórficos siendo los valores más altos los de las poblaciones C36 y D40 y los valores más bajos los de las poblaciones V29, C32 y D39, siendo de 1.5 y 1.2 respectivamente. El número de alelos en los loci polimórficos (ver el Apéndice 2) resultó ser de tres para APX1, APX2, PEP2 y SDI1 y de dos para el resto de las enzimas. No existe una presencia de alelos raros en alguna de las poblaciones.

Tabla 3. Variación genética de los 16 loci en todas las poblaciones del género *Aibes*. Donde, I es el promedio de individuos por locus, A es el promedio del número de alelos por locus, P es la proporción de loci polimórficos; H_o y H_e son el número heterocigos observado y esperado respectivamente (los errores estándar están en paréntesis).

Poblaciones	I	A	P	Heterocigos promedio	
				H_o	H_e *
C23	38.6 (2.5)	1.4 (0.2)	0.375	0.070 (0.026)	0.114 (0.039)
DC24	35.5 (2.2)	1.4 (0.1)	0.430	0.063 (0.020)	0.119 (0.040)
DC25	26.7 (3.1)	1.3 (0.1)	0.250	0.049 (0.023)	0.071 (0.034)
DC26	29.6 (2.7)	1.3 (0.2)	0.250	0.078 (0.040)	0.066 (0.033)
V273	4.3 (4.0)	1.3 (0.1)	0.180	0.064 (0.037)	0.071 (0.040)
V28	36.9 (3.4)	1.3 (0.1)	0.250	0.041 (0.020)	0.082 (0.041)
V29	34.3 (3.1)	1.2 (0.1)	0.188	0.036 (0.021)	0.076 (0.042)
V30	36.6 (3.4)	1.3 (0.1)	0.250	0.115 (0.053)	0.109 (0.050)
D31	36.5 (2.3)	1.2 (0.1)	0.180	0.046 (0.027)	0.076 (0.042)
C32	36.6 (2.3)	1.2 (0.1)	0.180	0.022 (0.018)	0.046 (0.028)
C33	37.6 (2.4)	1.4 (0.2)	0.375	0.078 (0.036)	0.127 (0.050)
D34	37.4 (2.4)	1.3 (0.1)	0.250	0.058 (0.030)	0.062 (0.029)
D35	37.6 (2.4)	1.3 (0.2)	0.250	0.045 (0.022)	0.090 (0.043)
C36	39.7 (0.2)	1.5 (0.1)	0.500	0.089 (0.037)	0.146 (0.043)
C37	34.6 (2.2)	1.4 (0.2)	0.313	0.076 (0.033)	0.125 (0.049)
D39	40.1 (0.3)	1.3 (0.1)	0.313	0.056 (0.025)	0.105 (0.044)
D40	20.9 (0.1)	1.5 (0.1)	0.500	0.068 (0.021)	0.203 (0.055)
V50	38.6 (0.5)	1.3 (0.1)	0.313	0.076 (0.040)	0.102 (0.046)
PROMEDIO GENERAL	35.12(2.19)	1.33 (0.13)	0.299	0.063 (0.029)	0.099 (0.042)

* Estimado no sesgado (ver Nei, 1978)

Tabla 4. Variación genética de los 16 loci en todas las especies del género *Aibes*. Donde, No. es el número de poblaciones por especie, A es el promedio del número de alelos por locus, P es la proporción de loci polimórficos; H_o y H_e son el número heterocigos observado y esperado respectivamente (los errores estándar están en paréntesis).

Especies	No	A	P	Heterocigos promedio	
				H_o	H_e *
<i>A. concolor</i>	5	1.35 (0.16)	0.35	0.067 (0.029)	0.112 (0.042)
<i>A. durangensis</i>	5	1.33 (0.12)	0.263	0.055 (0.025)	0.107 (0.107)
<i>A. Dur. var. Coah.</i>	3	1.28 (0.13)	0.312	0.063 (0.028)	0.085 (0.036)
<i>A. vejayi</i>	5	1.28 (0.10)	0.238	0.066 (0.034)	0.088 (0.044)

* Estimado no sesgado (ver Nei, 1978)

Índices de fijación

Setenta de los índices de fijación F por locus fueron positivos y 16 negativos (tabla 5). De los F positivos, 54 fueron significativamente diferentes de cero y de los F negativos, ninguno resultaron ser significativamente diferentes de cero. Por especie encontramos que *A. concolor* tiene 25 positivos y tres negativos (89.29%), en *A. durangensis* existen 21 loci positivos y tres loci negativos (87.5%), en *A. durangensis* var. *coahuilensis* las poblaciones presentaron seis loci negativos y nueve positivos (60%) y finalmente en *A. vejari* encontramos quince positivos y cuatro negativos (78.95%). Dado el número de pruebas (86) y un α de 0.05, esperaríamos un error de tipo I en el 5% de las pruebas (4). El hecho que 54 de las pruebas tienen $p < 0.05$, quiere decir que la mayoría de los loci polimórficos están fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg (77.14%).

Tabla 5. Prueba de χ^2 -cuadrada para la desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg en las 18 poblaciones de *Abies*.

Población	Locus	Clase	Chi-cuadrada ¹	Índice de fijación ²	p
C23	ACPh	2	0.872 (1) ¹	-0.152	0.350
	APX1	2	8.949 (1) ¹	0.473	0.003
	APX2	2	4.296 (1)	0.328	0.038
	PEP1	2	24.038 (1)	0.757	0.000
	PEP2	3	5.104 (2)	0.277	0.164 (0.108) ¹
	SDH	2	8.327 (1)	0.462	0.004
DC24	APX1	2	15.304 (1)	0.635	0.000
	APX2	2	9.993 (1)	0.513	0.002
	IDH	2	4.863 (1) ¹	0.358	0.027
	LAP2	2	7.396 (1) ¹	0.441	0.007
	PEP1	2	10.528 (1)	0.533	0.001
	PEP2	2	0.391 (1) ¹	-0.101	0.532
	SDH	2	8.038 (1) ¹	0.466	0.005
DC25	APX1	2	2.511 (1) ¹	0.285	0.113
	APX2	2	8.718 (1)	0.530	0.003
	LAP2	2	0.706 (1)	0.144	0.401
	PEP2	2	0.153 (1) ¹	-0.071	0.696
DC26	APX1	3	1.552 (1)	-0.186	0.670 (0.223) ¹
	APX2	2	2.509 (1)	-0.260	0.113
	LAP2	2	0.077 (1) ¹	-0.049	0.781
	SDH	2	0.628 (1) ¹	-0.138	0.428
		APX1	3	2.633 (2)	0.013
V27	APX2	2	0.433 (1)	0.102	0.512
	SDH	2	2.182 (1)	0.228	0.140
		ACPh	2	0.168 (1) ¹	-0.063
V28	APX1	2	20.801 (1)	0.712	0.000
	APX2	2	5.994 (1)	0.378	0.014
	SDH	2	14.371 (1)	0.592	0.000
		APX1	2	17.769 (1)	0.675
V29	APX1	2	4.505 (1)	0.344	0.034
	SDH	2	10.918 (1)	0.536	0.001
		ACPh	2	0.156 (1)	0.063
V30	APX1	2	2.804 (1)	-0.262	0.940
	APX2	2	0.284 (1)	0.082	0.594
	SDH	2	1.985 (1)	-0.217	0.159

D31	APX1	2	4.575(1)	0.357	0.032
	PGI2	2	13.452(1)	0.587	0.000
	SDH	2	3.092(1)	0.282	0.079
C32	APX1	2	27.719(1)	0.843	0.000
	PGI2	2	15.919(1) ¹	0.639	0.000
	SDH	2	4.037(1)	0.322	0.045
C33	ACPh	2	24.754(1) ¹	0.787	0.000
	APX1	2	1.800(1)	-0.212	0.180
	APX2	2	1.637(1)	0.202	0.201
	PGI2	2	12.990(1) ¹	0.908	0.000
	MNR	2	14.779(1) ¹	0.608	0.000
	SDH	3	11.265(2)	0.368	0.010(0.005) ²
D34	APX1	2	1.017(1) ¹	-0.159	0.313
	APX2	2	0.075(1)	-0.044	0.785
	LAP2	2	20.864(1) ¹	0.722	0.000
	SDH	2	0.526(1) ¹	-0.118	0.468
D35	APX1	2	8.711(1)	0.467	0.003
	APX2	3	11.965(2)	0.506	0.008(0.002) ²
	LAP2	2	11.250(1) ¹	0.530	0.001
	SDH	2	9.106(1)	0.477	0.003
C36	ACPh	2	8.975(1) ¹	0.474	0.003
	APX1	2	0.178(1)	-0.067	0.673
	APX2	2	5.739(1)	0.379	0.017
	LAP1	2	0.693(1)	0.133	0.405
	PGI1	2	30.611(1) ¹	0.875	0.000
	PEP1	2	14.400(1)	0.000	0.000
	PEP2	2	40.000(1) ¹	1.000	0.000
	SDH	2	6.016(1) ¹	0.403	0.014
C37	ACPh	2	15.437(1)	0.646	0.000
	APX1	2	13.456(1)	0.603	0.000
	APX2	2	0.048(1)	0.036	0.827
	MNR	2	45.000(1)	0.347	0.035
	SDH	3	8.236(2)	0.172	0.041(0.115) ²
D39	APX1	2	11.844(1)	0.544	0.001
	APX2	2	2.899(1)	0.276	0.089
	IDH	2	24.754(1) ¹	0.787	0.000
	PGI1	2	11.695(1)	0.534	0.001
	SDH	2	6.669(1)	0.414	0.010
D40	APX1	2	0.429(1) ¹	0.143	0.513
	APX2	2	7.843(1) ¹	0.511	0.005
	PGI1	2	9.309(1)	0.666	0.002
	PGM	2	12.343(1)	0.767	0.000
	PEP2	2	13.627(1)	0.806	0.000
	PEP3	2	12.343(1)	0.767	0.000
	MNR	2	13.627(1)	0.806	0.000
	SDH	2	4.121(1)	0.443	0.042
				0.519	0.001
V50	ACPh	2	10.486(1)	-0.071	0.651
	APX2	2	0.204(1)	-0.071	0.651
	IDH	2	38.000(1)	1.000	0.000
	PGI1	2	13.796(1)	0.619	0.000
	SDH	2	0.016(1)	0.022	0.898

¹ Grados de libertad² No se logró obtener un individuo esperado en cada genotipo³ Los valores que están dentro de menos de 0.05 los consideramos como fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg.⁴ Chi-cuadrada corregida (Hedrick 1983).

Diferenciación genética

En *Abies concolor* y *A. durangensis* las frecuencias alélicas difieren de manera significativa entre las poblaciones para cada locus. Para *A. durangensis* var. *coahuilensis* hay diferencias significativas en todos los loci salvo APX1 y APX2 y en *A. vejari* en todos salvo IDH. A pesar de que en cada una de las cuatro especies el total determina una diferencia significativa entre todas las poblaciones (tabla 6).

El promedio de la F_{ST} (0.205) indica una diferenciación bastante alta entre las poblaciones (tabla 7). De este 20.5 % todo se debe a diferencias entre poblaciones dentro de las especies y no a una diferenciación entre las especies. Los promedios de F_{IS} y F_{IT} fueron 0.360 y 0.491 respectivamente (tabla 7). La especie que presentó índices de diferenciación más alta fue la de *A. concolor* ($F_{ST} = 0.265$) y en tanto para la especie de *A. durangensis* var. *coahuilensis* ($F_{ST} = 0.034$) fue sumamente baja (tabla 8).

Tabla 6. Análisis de chi-cuadrada de las frecuencias alélicas de todos los loci para las poblaciones de las especies de *A. concolor*, *A. durangensis*, *A. durangensis* var. *coahuilensis* y *A. vejari*.

<i>A. concolor</i>				<i>A. durangensis</i>			
No. de locus	alelos	Chi-cuadrada	p	No. de locus	alelos	Chi-cuadrada	p
ACPh	2	33.788 (4)	0.00000	APX1	2	62.382 (4)	0.00000
APX1	2	125.145 (4)	0.00000	APX2	3	35.206 (8)	0.00002
APX2	2	110.696 (4)	0.00000	IDH	2	17.746 (4)	0.00138
LAP1	2	286.743 (4)	0.00000	LAP2	2	12.786 (4)	0.01237
PGI1	2	36.377 (4)	0.00000	PGI1	2	65.441 (4)	0.00000
PGI2	2	36.395 (4)	0.00000	PGI2	2	56.976 (4)	0.00000
PEP1	2	56.907 (4)	0.00000	PGH	2	94.563 (4)	0.00000
PEP2	3	44.569 (8)	0.00000	PEP2	2	195.841 (4)	0.00000
MNR	2	42.027 (4)	0.00000	PEP3	2	94.563 (4)	0.00000
IDH	3	152.832 (8)	0.00000	MNR	2	109.870 (4)	0.00000
				SDH	2	30.493 (4)	0.00000
Total		925.480 (48)	0.00000	Total		775.868 (48)	0.00000

<i>A. durangensis</i> var. <i>coahuilensis</i>				<i>A. vejari</i>			
No. de locus	alelos	Chi-cuadrada	p	No. de locus	alelos	Chi-cuadrada	p
APX1	3	6.435 (4)	0.16895	ACPh	2	87.929 (4)	0.00000
APX2	2	1.709 (2)	0.42543	APX1	3	52.839 (8)	0.00000
IDH	2	8.500 (2)	0.03427	APX2	2	27.402 (4)	0.00002
LAP2	2	6.846 (2)	0.03261	IDH	2	8.727 (4)	0.06829
PEP1	2	24.751 (2)	0.00000	PGI1	2	42.195 (4)	0.00000
PEP2	3	21.726 (4)	0.00023	SDH	2	23.497 (4)	0.00010
SDH	2	9.889 (2)	0.00712				
Total		79.856 (18)	0.00000	Total		242.589 (28)	0.00000

Grados de libertad entre paréntesis.

Tabla 7. Estadísticos F de Wright para todos los loci para todas las especies (Bioeys 1). El componente de la varianza está entre paréntesis.

Locus	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
ACPh	0.322 (0.02444)	0.471 (0.0302)	0.219 (0.0274)
APX1	0.284 (0.0960)	0.420 (-0.0170)	0.190 (0.0790)
APX2	0.241 (0.0611)	0.349 (-0.0069)	0.143 (0.0542)
ID11	0.643 (0.0007)	0.661 (-0.0001)	0.050 (0.0006)
LAP1	0.133 (0.0674)	0.791 (-0.0055)	0.759 (0.0618)
LAP2	0.365 (0.0023)	0.429 (0.0027)	0.101 (0.0051)
PG11	0.657 (0.0140)	0.721 (-0.0005)	0.185 (0.0135)
PG2	0.718 (0.0067)	0.757 (-0.0007)	0.140 (0.0060)
PGN4	0.767 (0.0088)	0.831 (-0.0008)	0.274 (0.0080)
PEP1	0.628 (0.0105)	0.695 (0.0005)	0.180 (0.0110)
PEP2	0.497 (0.0409)	0.668 (-0.0056)	0.339 (0.0353)
PEP3	0.767 (0.0088)	0.831 (-0.0008)	0.274 (0.0080)
MNR	0.628 (0.0245)	0.734 (-0.0028)	0.284 (0.0218)
SDH	0.303 (0.0500)	0.402 (0.0010)	0.142 (0.0010)
Promedio	0.360 (0.4162)	0.491 (-0.0112)	0.205 (0.3830)

Tabla 8. Estadísticos F de Wright para todos los loci para cada una las especies (Bioeys 1). El componente de la varianza está entre paréntesis.

Especies (No de poblaciones)	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
<i>A. concolor</i> (5)	0.391 (0.0542)	0.552 (0.0312)	0.265 (0.0274)
<i>A. durangensis</i> (5)	0.482 (0.0960)	0.581 (0.0653)	0.192 (0.0790)
<i>A. durangensis</i> var <i>coahuilensis</i> (3)	0.249 (0.0244)	0.274 (0.0063)	0.034 (0.0611)
<i>A. wejari</i> (5)	0.237 (0.0010)	0.318 (0.0014)	0.106 (0.0383)

Distancias genéticas

El promedio de las distancias (D) genéticas de Nei, para todas las poblaciones, fue de 0.028 (tabla 9). El valor más alto corresponde a la distancia entre las poblaciones C36 y D40, que es de 0.134. Entre tanto el valor más pequeño correspondió a cero y lo presentaron todas las parejas de entre cinco poblaciones (DC26, V28, V29, D34, D35). Si analizamos las distancias por especies tenemos que *A. concolor* presenta el valor más alto (0.056), mientras que *A. durangensis* var. *coahuilensis* el más bajo (0.003). En *A. durangensis* y en *A. wejari* es de 0.034 y de 0.013, respectivamente.

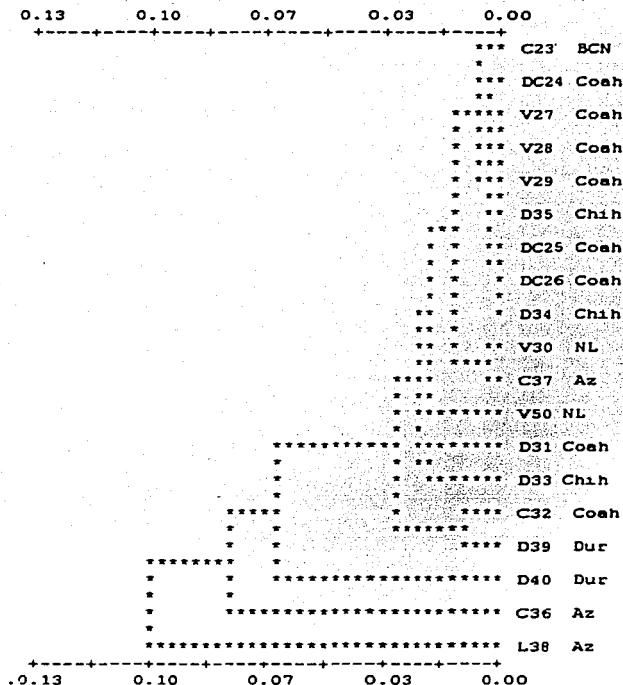


Figura 4. Fenograma de las poblaciones de las especies de *A. concolor*, *A. durangensis*, *A. durangensis* var *coahuilensis*, *A. vejam* y *A. laxicaarpa*, construido con datos de distancias genéticas en UPGMA (unweighted pair method with arithmetic mean)

Tabla 9 Matriz de distancias genéticas D sin sesgo de Nei (Nei, 1978), para 18 de las poblaciones de Abeas en el Norte de México; se considera *A. lasiocarpa*

Poblaciones	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1 C51	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
2 DC24	0.005	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
3 DC25	0.011	0.005	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
4 DC26	0.006	0.002	0.001	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
5 V27	0.011	0.005	0.011	0.002	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
6 V28	0.007	0.003	0.006	0.001	0.003	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
7 V29	0.010	0.002	0.007	0.001	0.001	0.040	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
8 V30	0.021	0.018	0.021	0.019	0.020	0.010	0.013	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
9 D31	0.015	0.020	0.027	0.014	0.012	0.017	0.017	0.042	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
10 C32	0.049	0.035	0.052	0.034	0.017	0.034	0.026	0.053	0.031	---	---	---	---	---	---	---	---	---
11 C33	0.026	0.032	0.040	0.029	0.030	0.025	0.028	0.039	0.019	0.062	---	---	---	---	---	---	---	---
12 D34	0.006	0.004	0.001	0.000	0.007	0.003	0.005	0.021	0.017	0.047	0.010	---	---	---	---	---	---	---
13 D35	0.010	0.002	0.006	0.001	0.001	0.000	0.000	0.014	0.015	0.027	0.026	0.004	---	---	---	---	---	---
14 C36	0.072	0.060	0.071	0.069	0.072	0.049	0.060	0.060	0.102	0.112	0.096	0.071	0.062	---	---	---	---	---
15 C37	0.014	0.010	0.014	0.009	0.008	0.004	0.003	0.004	0.027	0.026	0.026	0.012	0.006	0.006	---	---	---	---
16 D39	0.028	0.015	0.028	0.015	0.009	0.012	0.008	0.026	0.024	0.011	0.041	0.024	0.009	0.003	0.016	---	---	---
17 D40	0.045	0.056	0.060	0.054	0.048	0.058	0.059	0.084	0.059	0.084	0.069	0.055	0.060	0.134	0.060	0.060	---	---
18 V40	0.011	0.024	0.025	0.019	0.026	0.016	0.022	0.020	0.020	0.073	0.021	0.017	0.021	0.065	0.019	0.041	0.061	---

El fenograma basado en las distancias genéticas no demuestra un claro patrón en el que se puedan reunir a las especies, sino que mas bien existe un gran grupo con *A. lasiocarpa* cayendo como grupo externo (figura 4)

Aislamiento por distancia

La relación del flujo génico por pares de poblaciones (M) y las distancias geográficas entre si se muestran en las figuras 5 y 6. El valor de la pendiente en el análisis general de todas las poblaciones resultó ser negativa ($m = -0.0266$), mientras que la r^2 obtenida fue baja (0.0582). Los resultados del análisis de aislamiento por distancia sugieren que no existe una relación significativa entre las distancias geográficas y niveles de diferenciación genética entre las poblaciones analizando todas las poblaciones juntas y por especies con excepción de *A. wejari*, en la que la probabilidad de ser significativa estuvo en los límites (tabla 10)

Tabla 10. Datos obtenidos en las regresiones para el análisis de aislamiento por distancia. Donde m es la pendiente de la regresión, b la ordenada en el origen, r^2 es el coeficiente de relación y p la probabilidad de obtener una r^2 significativa (Slatkin 1993, 1994).

No de pares de poblaciones	m	b	r^2	p
<i>A. concolor</i> (10)	-0.3753	0.9487	0.1975	0.4444
<i>A. durangensis</i> (10)	-0.0265	0.3689	0.3215	0.567
<i>A. durangensis</i> var <i>coahuilensis</i> (3)	0.0571	0.8687	0.0198	0.1407
<i>A. weberi</i> (10)	-0.7748	2.1191	0.2873	0.536
Total (153)	-0.2638	1.8967	0.0582	0.2412

En otras palabras, la diferencias genéticas que existen entre las poblaciones no están dependiendo de las distancias geográficas que las separan, con lo cual en caso de existir flujo génico entre las poblaciones del Norte mexicano, éste sería muy reducido, o las poblaciones han sufrido un tiempo mayor de aislamiento genético entre sí.

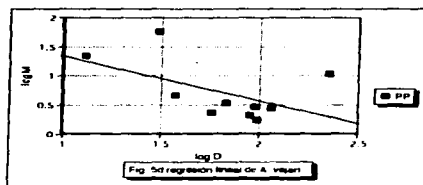
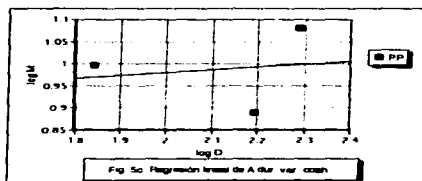
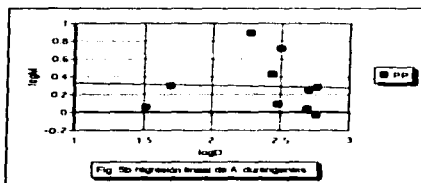
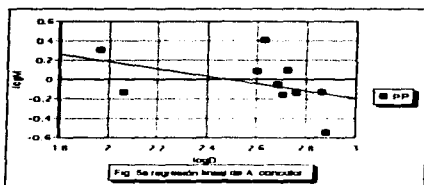


Figura 5. Gráficas de la regresión lineal para el aumento por distancia en las cuatro especies de Abeas. Donde PP son los datos de poblaciones.

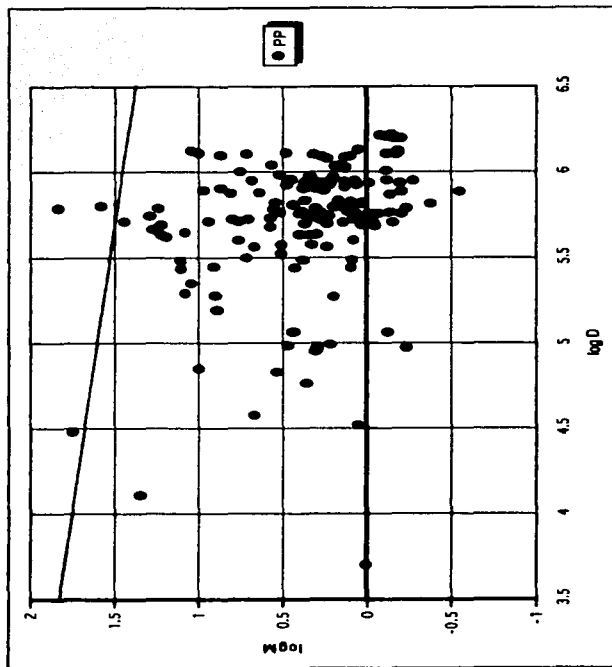


Figura 6. Crítica de la regresión lineal para el adelanto por distancia de las 18 poblaciones en estudio de Abies. Donde PP son los pares de poblaciones obtenidos.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

DISCUSIÓN

Con respecto a los niveles de variación genética reportados en la bibliografía de otros estudios de coníferas, el nuestro presenta promedios de heterocigosis y polimorfismo considerablemente bajos (tabla 11). Esto es realmente raro para un grupo dentro de las coníferas como el género *Abies*, donde en general tienen niveles de variación altos con respecto al resto de las plantas (Lundkvist y Rundin 1977; Conkle 1981; Guries y Ledig 1982; Mitton 1983; Hamrick y Godt 1990; Fady y Conkle 1993). Sin embargo, si existen excepciones de coníferas con poca variación genética y esta reducción en la variación genética se explica a través de procesos como la deriva génica y efectos de cuello de botella o por el principio de fundador (Fowler y Morris 1977; Copes 1981; Ledig y Conkle 1983; Yeh 1988; Perry *et al.* 1990; Shea y Fournier 1994; Parker y Hamrick 1996).

Tabla 11. Valores de la variación y la diferenciación genética para distintas especies de coníferas. Donde la P es la proporción de loci polimórficos, H es la heterocigosis obtenida en Hardy-Weinberg y la F_{ST} es el índice de diferenciación genética.

ESPECIE	P	H	F_{ST}	AUTOR
<i>Abies alba</i>	0.545	0.149		Fady y Conkle 1993
<i>Abies balsamifera</i>		0.313		Fady y Conkle 1993
<i>Abies balsamifera</i>	0.591	0.161		Fady y Conkle 1991
<i>Abies cephalonica</i>	0.727	0.161	0.086	Fady y Conkle 1991
<i>Abies concolor</i>	0.35	0.067	0.265	presente trabajo
<i>Abies durangensis</i>	0.263	0.055	0.192	presente trabajo
<i>Abies durangensis</i> var. <i>coahu.</i>	0.312	0.063	0.034	presente trabajo
<i>Abies fraseri</i>	0.308	0.258	0.002	Diebel y Feret 1991
<i>Abies vejarii</i>	0.238	0.066	0.106	presente trabajo
<i>Picea abies</i>	0.73	0.115	0.052	Lagercrantz y Ryman 1990
<i>Pinus attenuata</i>		0.125		Conkle 1981
<i>Pinus contorta</i>		0.185		Conkle 1981
<i>Pinus jeffreyi</i>	0.9	0.248		Fournier y Adams 1986
<i>Pinus lambertiana</i>	0.786	0.275		Conkle 1981
<i>Pinus longicarpa</i>	0.762	0.327	0.038	Hiebert y Hamrick 1983
<i>Pinus rigida</i>	0.138	0.138	0.024	Guries y Ledig 1982
<i>Pinus ponderosa</i>		0.289		Hamrick <i>et al.</i> 1989
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	0.526	0.163	0.08	El-Kassaby 1996
<i>Thuja occidentalis</i>	0.37	0.097	0.016	Perry <i>et al.</i> 1990
<i>Thuja plicata</i>	0.158	0.036	0.033	Yeh 1988

Los índices de fijación F por locus se encuentran fuera del equilibrio de Hardy-Weinberg por falta de heterocigos, lo que nos sugiere que las poblaciones podrían estar influenciadas por endogamia. Esto también es un fenómeno extraño en las coníferas (Mitchell-Olds y Guries 1986; Lagercrantz y Ryman 1990, Fady y Conkle 1992) Pero puede deberse a la existencia de tamaños de población efectivo (N_e) pequeños (Ellstrand y Elam 1993; Nunney 1995).

En lo que respecta a los índices de diferenciación genética (F_{ST}) entre poblaciones, encontramos que es elevada en comparación a casi todas las especies de coníferas estudiadas (Govindaraju 1988, Hamrick *et al.* 1989, Hamrick y Godt 1990, El-Kassaby 1996) Sin embargo, toda esta diferenciación genética existe principalmente a un nivel de poblaciones y es prácticamente nula entre las distintas especies del género. Los resultados de diferenciación genética tienen sustento también en las chi-cuadradas y sobre todo en el fenograma de distancias genéticas, en donde no quedan agrupadas de acuerdo a un patrón cada una de las especies del género *Abies*. Esto se puede demostrar con lo que está ocurriendo con las poblaciones de *A. durangensis* var. *coahuilensis* en Rincón de María (DC25) y Sierra del Carmen (DC26), ambas de Coahuila. Dichas poblaciones guardan una mayor relación con la de *A. durangensis* en Creel, Chihuahua, cuya diferencia genética es de 0.0013, que con la de su misma variedad, la de Sierra la Madera (DC24) Algo similar pasa con la especie de *A. vejari*, donde las poblaciones de Jame (V27), Mesa de las Tablas (V28) y Los Lirios (V29), todas de Arteaga, Coahuila tienen una alta identidad entre sí, pero se diferencian enormemente con respecto a las otras dos poblaciones.

Cuando analizamos el caso de la especie de *A. concolor* observamos que no existe relación alguna entre las poblaciones de esta especie, no pudiendo inferir como propone Martínez (1948) que éste sea un grupo basal y mucho menos ancestral en el género *Abies*. Pues aunque en el fenograma de la figura (4) la población de Mount Graham (C36) se ubicaría, excluyendo a *A. lasiocarpa*, en la parte más externa. A la vez, tenemos por ejemplo que la población de San Pedro Mártir (C23) esta incorporada en un grupo muy compactado y para nada cercano con el resto de las poblaciones de dicha especie. A pesar de que la población definida por Debrekzy *et al.* como *neodurangensis*, Paraje Sta. Bárbara (D39), en el Salto, Durango no quede agrupada de forma cercana con otra población de *A. durangensis*, no podemos decir que por los niveles de diferenciación que existen se pueda considerar como una especie aparte, pues como ya mencioné la mayor parte de dicha diferenciación se encuentra principalmente entre poblaciones y muy poca entre especies.

Por lo tanto, podemos definir al género *Abies* del Norte de México como un gran grupo sin poder definir claramente las especies, con *A. lasiocarpa* como una especie basal de dicho grupo

Finalmente la falta de una relación significativa entre los niveles de diferenciación genética y las distancias geográficas que separan a las poblaciones en los dos tipos de análisis, ya sea en todas las 18 poblaciones juntas o considerando la existencia de las cuatro especies, indican que no existe un patrón de aislamiento por distancia. El hecho de que no haya una relación significativa podría deberse a altos niveles de flujo génico que han homogeneizado todas las poblaciones, pero los niveles del cálculo indirecto de tal flujo génico (F_{ST}) sugieren que no es el caso.

También, aunque no se contraponen con la suposición de que el polen se puede desplazar a grandes distancias (Hamrick *et al.* 1992, Ellstrand 1992, Slatkin 1994) y que existen grandes posibilidades de hibridación entre especies (Liu 1971, St. Clair y Critchfield 1988), tenemos que ser conscientes que los ambientes que separan nuestras poblaciones en estudio son poco favorables para que dicho flujo sea realmente efectivo. Además, y esto es fundamental, los altos índices de diferenciación genética entre las poblaciones nos afirmarían la falta de relación que existe y confirmaría que es la deriva génica la que está actuando al azar dejando un patrón aleatorio de niveles de diferenciación entre pares de poblaciones.

Esperaríamos que en poblaciones pequeñas y aisladas la deriva génica y la endogamia estuvieran influyendo, ya que éstas actúan de manera importante sobre poblaciones de tamaños pequeños, reduciendo así los niveles de la variación genética dentro de las poblaciones e incrementando la diferenciación entre poblaciones (Hartl y Clark 1989, Ellstrand y Elam 1993, Mitton 1995). Estas darían una explicación más satisfactoria sobre el comportamiento de nuestros datos, ya que en la actualidad estaríamos viendo en las poblaciones de *Abies* mexicanos un efecto de aislamiento por distancia (Slatkin 1993). Sin embargo, los tamaños actuales de las poblaciones estudiadas parecerían ser lo suficientemente grandes para evitar una reducción en la variabilidad genética debido a la deriva. Además, los datos de resinas (Nava 1996) presentan el mismo patrón de agrupamiento que el demostrado en el fenograma de isoenzimas y éstas deben estar más influenciadas por la selección natural que contrarresta los efectos de la deriva génica (Hartl y Clark 1989).

Todo esto nos hace pensar que las poblaciones de *Abies* fueron afectadas en un pasado no muy lejano por eventos de cuello de botella o principio de fundador, los cuales pudieron provocar fluctuaciones en las poblaciones reduciendo sus tamaños efectivos. A su vez estas fluctuaciones,

como ya mencionamos, serían entonces las causantes de la pérdida en la variabilidad y un aumento en la diferenciación genética. Lo que actualmente podemos ver es que las poblaciones presentes se estén o hayan recuperado en sus tamaños y que nosotros estemos percibiendo simplemente los efectos causados por la deriva génica y/o la endogamia. Sin embargo lo cierto es que muy poco sabemos sobre la historia de los *Abies* mexicanos y en general de otras plantas de México que nos permitan explicar que presiones ambientales sufrieron, las cuales hayan sido las causantes de esta reducción en la variación genética. Por otro lado no se han realizado estudios más detallados sobre los tamaños efectivos (N_e) de las poblaciones en estudio, por lo que solo tenemos una aproximación de éstos

Un aspecto interesante es lo reportado en los estudios de otras especies de pinos y de manglares de México (Delgado 1996, Nuñez-Farfan *et al.* 1996, Martínez-Palacios *et al.* mans), donde también se han encontrado altos índices de diferenciación genética en comparación a los realizados en las zonas templadas (Hamrick y Godt 1990) Este fenómeno nos estaría previniendo de que podría existir un comportamiento distinto de como afectan los procesos evolutivos a las poblaciones y que a lo mejor no estarían actuando de la misma forma y por lo tanto habría que buscar nuevas explicaciones de como están interviniendo. Podríamos explicar que dichos procesos evolutivos no actúan de la misma manera que en las zonas templadas por la razón de que en las zonas cálidas las presiones climáticas son distintas y todavía se siguen presentando cambios en la estructura de las poblaciones. Una de las razones que explican estas diferencias son las constantes glaciaciones que han sufrido las regiones boreales a diferencia de las zonas más ecuatoriales, provocando poblaciones más continuas, jóvenes y/o con reducciones drásticas (Fowler y Lester 1970, Diebel y Feret 1991) Pero lo realmente cierto también, es que donde se ha efectuado un mayor desarrollo del estudio de la genética de poblaciones es en las zonas templadas y boreales de nuestro planeta y apenas muy recientemente se ha empezado a estudiar las zonas tropicales y subtropicales, por lo que todavía no se tiene muy claro por que existe tanta diversidad, por mencionar tan solo un ejemplo.

El hecho de estar agrupadas sin guardar un patrón claro todas las distintas especies de *Abies* del Norte de México nos estaría diciendo tal vez de la existencia de un factor importante, el cual podría estar influyendo para la comprensión de los procesos que actúan sobre las poblaciones en estudio. Dicho factor podría ser la existencia de errores en la descripción y clasificación taxonómi-

ca del género (Martínez 1948; Liu 1971; Farjon y Rushforth 1989) debido a tamaños de muestra pequeños y la sobrelapación de caracteres morfológicos, incluyéndose a poblaciones en una especie, cuando a lo mejor en realidad son distintas. Esto nos lleva a plantear dos posibilidades extremas. La primera es que todas las poblaciones conforman una sola especie. La segunda, en la que hablaríamos de considerar a cada población o grupo local de poblaciones casi como una unidad evolutiva independiente, es decir, estimar a cada población como una especie diferente de la otra. Sin embargo, es difícil pensar que por la poca distancia que guardan algunas de estas poblaciones el flujo génico no actúe evitando procesos de especiación.

La realidad puede ser uno de los extremos o algo intermedio, pues a diferencia de lo que si sucede con otros grupos taxonómicos, desde la propuesta de clasificación de Martínez en 1948, no se ha cuestionado y revisado al género con profundidad. Tenemos así que estudios de entrecruzamiento y análisis del DNA, además de aplicar estudios cladísticos más rigurosos, podrían resolver de una manera más eficiente las relaciones que existen entre las poblaciones. De esta forma se podrá concluir si la actual clasificación es la más correcta o es necesario redefinir a las distintas especies descritas dentro del género en el Norte del país.

No hay discusión referente a la importancia ecológica y económica que representan los *Abies* como parte del ecosistema (Hoth 1995, Snook 1995, Anderson y Brower 1996). Pero también la realidad del país es muy distinta de lo que nosotros quisiéramos a lo que se necesita. Es evidente que hablar cuales poblaciones se pueden o se deben conservar nos llevaría a una larga discusión, casi eterna, pues existen tal cantidad de puntos a favor y en contra de cada una de las posturas, que podríamos escribir un tratado. En nuestro estudio la alta diferenciación genética entre las poblaciones nos habla de que cada comunidad representa una riqueza evolutiva irrecuperable, independientemente de los bajos niveles de variación genética expuestos. Es claro de que a pesar de que en un futuro, con una mayor cantidad de estudios sobre el género, determinemos que los *Abies* del Norte mexicano y tal vez algunos del Sur de los Estados Unidos son una sola especie o no, la importancia que representan como refugio para otros seres vivos no se modifica y es primordial, por lo tanto el destimar esfuerzos para mantener lo menos alterado posible estos hábitats. Como biólogos tenemos que ser conscientes del problema que enfrentamos al tratar de comprender la biodiversidad y por supuesto de conservarla. Debemos ser sumamente cuidadosos en la

interpretación de los datos obtenidos y en los planes que se deben realizar a mediano y largo plazo.

A manera de conclusión las poblaciones de *Abies* mexicanos, en mi opinión personal y por lo que se lleva hasta ahora del proyecto, sufrieron presiones en su historia evolutiva que provocaron una disminución en los tamaños poblacionales, motivando la actuación de fuerzas evolutivas como la deriva génica y/o la endogamia. Sin embargo al no poder saber con precisión cuales fueron los eventos que llevaron a la reducción en la variabilidad y aumento en la diferenciación entre poblaciones, nos es más difícil discernir de una manera más específica cuales son los procesos que las están afectando. Aunado a esto, tenemos además la presencia de las perturbaciones humanas, que sin lugar a dudas, han sido las causantes de los cambios más radicales en el ambiente, alterando los ciclos químicos e hidrológicos, provocando la extinción prematura de muchas especies y transformando en general el clima global del planeta (Meffe y Carroll 1994, Frankham 1995). En otras palabras, en nuestras manos tenemos un campo totalmente virgen para desarrollar, cuya comprensión nos arrojará fascinantes descubrimientos.

Es por estas razones que se hace imprescindible seguir con los estudios que se han hecho hasta ahora y realizar nuevos, como entrecruzamiento, demografía, fenología, taxonomía, etc., de tal manera que podamos aproximarnos un poco más para saber que es lo que las están afectando y tener claro que independientemente de todos estos estudios se tienen que tratar de mantener lo más intacto los hábitats de nuestros países, pues es de manifiesto que todavía nos queda todo un mundo nuevo por descubrir y comprender. Pues se hace imperativa la necesidad de conservar los recursos naturales, no solamente como un factor económico, sino también como una condición requerida para la sobrevivencia y bienestar de todos, y como un elemento clave para el posterior desarrollo de las generaciones futuras.

BIBLIOGRAFÍA

- ACQUA AH, G. 1992. Practical Protein Electrophoresis for Genetic Research Dioscorides Press. EUA.
- ADAMS, W.T. 1983. Application of isozymes in tree breeding. En: S.D. Tanksley y T.J. Orton (eds.), Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part B. Elsevier Science Publishers B.V. Holanda 381-400 pp.
- AGUIRRE-PLANTER, E. 1994. Análisis Comparativo de la Estructura Genética de Poblaciones Nativas de Perú e Introducidas a México y Españas de *Schinus Molle* L. (Anacardiaceae). Tesis de Licenciatura. Fac. de Ciencias, UNAM México.
- ANDERSON, J.B. y L.P. Brower 1996. Freeze-protection of overwintering monarch butterflies in Mexico: critical role of the forest as a blanket and an umbrella. Ecological Entomology 21: 984-993.
- BROWN A.H.D. y G.F. Moran 1981. Isozymes and the genetic resources of forest trees. En: M.T. Conkle (ed.), Proceedings of the Symposium on Isozyme of North American Forest Trees and Forest Insects. Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station. EUA 1-10 pp.
- CLEGG, M.T. 1990. Molecular diversity in plant populations. En A.H.D. Brown, M.T. Clegg, A.L. Kahler B.S. Weir (eds.), Plant Population Genetics, Breeding and Genetics Resources. Sinauer Ass. EUA 98-115 pp.
- CONKLE, M.T. 1974. Enzyme polymorphism in forest trees. En C.P.P. Reid y G.H. Fechner (eds.), Proceedings of the Third North American Forest Biology Workshop. Colorado State Univ. EUA 95-105 pp.
- CONKLE, M.T. y W.T. Adams 1977. Use of isoenzyme techniques in forest genetics research. En: Proceedings 14th Southern Forest Tree Improv. Conf., University of Florida. EUA 219-227 pp.
- CONKLE M.T. 1981. Isozyme variation and linkage in six conifers species. En: M.T. Conkle (ed.), Proceedings of the Symposium on Isozyme of North American Forest Trees and Forest Insects. Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station. EUA 11-17 pp.
- CONKLE, M.T., P.D. Hodgskiss, L.B. Nunnally, y S.C. Hunter 1982. Starch gel electrophoresis of conifer seeds, a laboratory manual. Gen Tech Rep PSW-64. Berkeley, CA. Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, Forest Service, U.S. Department of Agriculture. EUA.
- CONKLE, M.T. 1992. Genetic diversity-seeing the through the trees. En: W.T. Adams, S.H. Strauss, D.L. Copes, y A.R. Griffin (eds.), Population Genetics of Forest Trees. Proceedings of the International Symposium on Population Genetics of Forest Trees, EUA 5-22 pp.
- COPEL D.L. 1981. Isoenzyme uniformity in Western red cedar (*Thuja plicata*) seedlings from Oregon and Washington. Can. J. For. Res. 11:451-453.

- CHELIAK, W.M. y J.A. Pitel 1984. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species Petawawa National Forestry Institute, Canadian Forestry Service, Agriculture Canada.
- CRITCHFIELD, W.B. 1984. Impact of the Pleistocene on the structure of North American Conifers. En: R.M. Lanner (ed), Proceedings of the Eighth North American Forest Biology Workshop. Utah State University, EUA 70-118 pp.
- DEBRECZY, Z., V. Zsigmond y E. Guizar 1994. Conifer taxa discovered in Mexico in 1991/92 and 1994 IDRI-NewsBrief No 6 September: 3-4.
- DIEBEL, K.E. y P.P. Feret 1991. Isozyme variation within the Fraser fir (*Abies fraseri* (Pursh) Poir.) population on Mount Rogers, Virginia. Lack of Microgeographic differentiation. Silvae genetica 40(2) 79-85
- 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.
- EL-KASSABY, Y.A. 1996. Genetic variation in low elevation Douglas-fir of British Columbia and its relevance to gene conservation. Biodiversity and Conservation 5 779-794.
- ELLSTRAND, N.C. 1992. Gene flow among seed plant populations. En W.T. Adams, S.H. Strauss, D.L. Copes, y A.R. Griffin (eds), Population Genetics of Forest Trees. Proceedings of the International Symposium on Population Genetics of Forest Trees. EUA 241-256 pp.
- ELLSTRAND, N.C. y D.R. Elam 1993. Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation. Annu. Rev. Ecol. Syst. 24 217-242
- ELSEIVER 1972. Enzyme Nomenclature. International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry Holanda
- FADY, B. y M.T. Conkle 1993. Allozyme variation and possible phylogenetic implications in *Abies cephalonica* Loudon and some related eastern mediterranean firs. Silvae Genetica 42(6): 351-359.
- FARJON, A. y K.D. Rusforth 1989. A classification of *Abies* Miller (Pinaceae). Notes RBG Edinb. 46(1): 59-79.
- FLORES M. *et al.* 1971. Memoria del mapa de tipos de vegetación de la República mexicana. SRH, México
- FOWLER D.P. y D.T. Lester 1970. The genetics of Red Pine USDA Forest Service Research Paper WO-8
- FOWLER D.P. y R.W. Morris 1977. Genetic diversity red pine (*Pinus resinosa*). evidence for low genetic heterozygosity. Can. J. For. Res. 7: 343-347.
- FRANKHAM, R. 1995. Conservation genetics. Annu. Rev. Genetics 29: 305-327
- FRANKEL, O.H., A.H.D. Brown y J.J. Burdon 1995. The Conservation in Plant Biodiversity. Cambridge Univ. Press, G B
- FURNIER, G.R. y W.T. Adams 1986. Geographical patterns of allozyme variation in Jeffrey pine. Amer. J. Bot. 73(7) 1009-1015
- GOVINDARAJU D.R. 1988. Relationship between dispersal ability and levels of gene flow in plants. Oikos 52: 31-35.
- GRAUMLICH, L.J. y L.B. Brubaker 1995. Long-term records of growth and distribution of conifers: Integration of paleoecology and physiological ecology. En W.K. Smith y T.M. Hinkley (eds), Ecophysiology of Coniferous Forests. Academic Press, EUA 37-62 pp

- GURIES R.P. y F.T. Ledig 1982. Genetic diversity population structure in pitch pine (*Pinus rigida* Mill.). *Evolution* 36(2): 387-402.
- HAMRICK J.L., H.M. Blanton y K.J. Hamrick 1989. Genetic structure of geographically marginal populations of Ponderosa pine. *American Journal of Botany* 76: 1559-1568
- HAMRICK J.L. y M.J.W. Godt 1990. Allozyme diversity in plant species. En A.H.D. Brown, *et al.* (eds), *Plant Population Genetics, Breeding, and Genetic Resources*. Sinauer Associates, EUA 43-63 pp.
- HAMRICK J.L., M.J.W. Godt y S.L. Sherman-Broyles 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. En W.T. Adams, S.H. Strauss, D.L. Copes, y A.R. Griffin (eds), *Population Genetics of Forest Trees*. Proceedings of the International Symposium on Population Genetics of Forest Trees, EUA 95-124 pp.
- HARTL, D.L. y A.G. Clark 1989. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Inc. segunda edición EUA.
- HEDRICK D.W. 1983. *Genetics of Populations*. Science Books Int. EUA.
- HELLBERG, M.E. 1996. Dependence of gene flow on geographic distance in two solitary corals with different larval dispersal capacities. *Evolution* 50: 1167-1175.
- HIEBERT R.D. y J.L. Hamrick 1983. Patterns and levels of genetic variation in Great Basin Bristlecone pine, *Pinus longaeva*. *Evolution* 37(2): 302-310.
- HILLIS D.M. y C. Moritz 1995. *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, Inc., EUA.
- HOTH J. 1995. Mariposa monarca, mitos y otras realidades aladas. *Ciencias* 37: 19-28.
- LAGERCANTZ U. y N. Ryman 1990. Genetic structure of Norway spruce (*Picea abies*): concordance of morphological and allozymic variation. *Evolution* 44(1): 38-53.
- LAIKRE, L. y N. Ryman 1991. Inbreeding depression in a Captive Wolf (*Canis lupus*) population. *Conservation* 5: 33-51.
- LEDIG F.T. y M.T. Conkle 1983. Gene diversity and genetic structure in a narrow endemic, Torrey Pine (*Pinus torreyana* Parry ex Carr). *Evolution* 37(1): 79-85.
- LEONARDI S., S. Raddi y M. Borghetti 1996. Spatial autocorrelation of allozyme traits in a Norway spruce (*Picea abies*) population. *Can. J. For. Res.* 26: 63-71.
- LEOPOLD, A.S. 1950. Vegetation zones of Mexico. *Ecology* 31(4): 507-518.
- LEWIS, R.A. y F.C. Cech 1969. Electrophoresis separation of general protein and isoenzymes of black cherryseed (*Prunus serotina* Ehrh.). *Proc. South. For. Tree Improv. Conf.* 10:140-148.
- LIU, T.S. 1971. *A Monograph of the Genus Abies*. Department of Forestry, College of Agriculture, National, Taiwan University, Taipei, Taiwan.
- LUNDKVIST K. y D. Rundin 1977. Genetic variation in eleven populations of *Picea abies* as determined by isozyme analysis. *Hereditas* 85: 67-74.
- MARTÍNEZ M. 1948. Los *Abies* Mexicanos. *An. Inst. Biol. Mex.* 19(1):11-104.
- MARTÍNEZ M. 1963. *Las Pináceas mexicanas*. 3a edición. Secretaría de Agricultura y ganadería. pp. 75-159.
- MARTÍNEZ-PALACIOS, A., L.E. Eguiarte y G.R. Furnier (mans.) *Conservation Biology of Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert, México. I. Genetic diversity, structure and differentiation between populations.
- MAY, B. 1992. *Starch gel electrophoresis of allozymes*. En: A.R. Hoelzel (ed.), *Molecular Genetic Analysis of Populations A Practical Approach*. Oxford University Press, EUA 1-27 pp.

- McVAUGH, R. 1992. Flora Novo-Galiciana. A descriptive account of the vascular plant of Western Mexico. Gymnosperms and Pteridophytes Volumen 17. Univ of Michigan Herbarium and Arbor, EUA.
- MEFFE, G.K. y C.R. Carroll 1994 Principles of Conservation Biology Sinauer Associates, Inc., EUA. 600 pp.
- MITTON, J.B. 1983 Conifers En S.D. Tanksley y T.J. Orton (Eds.), Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part B Elsevier Science Publishers B.V., Holanda 443-472 pp.
- MITTON, J.B. 1992 The dynamic mating systems of conifers En W.T. Adams, S.H. Strauss, D.L. Copes, y A.R. Griffin (eds.), Population Genetics of Forest Trees Proceedings of the International Symposium on Population Genetics of Forest Trees. EUA 197-216 pp.
- MITTON, J.B. 1995 Genetics and the physiological ecology of conifers En W.K. Smith y T.M. Hinkley (eds.), Ecophysiology of Coniferous Forests. Academic Press, EUA 1-36 pp.
- MITCHELL-OLDS, T. y R.P. Guries 1986 Genetic load and heterozygosity in the Pinaceae. Can. J. Genet. Cytol. 28 942-946
- NAVA, Y.G. 1996 Niveles y Patrones de Variación Química en Resinas de las Hojas del Género *Abies* del Norte de México Tesis de Licenciatura. Fac. de Ciencias, UNAM México.
- NEI, M. 1978 Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics 89 583-590
- NUNNEY, L. 1995 Measuring the ratio of effective population size to adult numbers using genetic and ecological data. Evolution 49(2) 389-392
- NUÑEZ-FARFAN, J., C.A. Dominguez, R. Dirzo, L.E. Eguiarte, M. Quijano y A. Comejo 1996. Estudio Genético de las Poblaciones de *Rhizophora mangle* en México Reporte del proyecto B214, CONABIO, México
- PARKER, K.C. y J.L. Hamrick 1996 Genetic variation in sand pine (*Pinus clausa*) Can. J. For. Res. 26. 244-254
- PERRY, D.J., P. Knowles y F.C. Yeh 1990 Allozyme variation of *Thuja occidentalis* L. in Northwestern Ontario. Biochemical Systematics and Ecology 18(2-3) 111-115
- PITEL, J.A. y W.H. Cheliak 1984 Effect of Extraction Buffers on Characterization of Isoenzymes from Vegetative Tissues of five Conifer Species. A user's manual. Petawa National Forestry Institute. Canadian Forestry Service Department of Agriculture, EUA 40 pp.
- RIDGEWAY, G.J., S.V. Sherburne y R.D. Lewis 1970 Polymorphism in the esterase of Atlantic herring trans. Amer. Fish. Soc. 99 147-151
- ROUGHGARDEN, J. 1979 Theory of Populations. Genetics and Evolutionary Ecology. An Introduction Mcmillan Publishing co. Inc., EUA
- RZEDOWSKI, J. 1986 Vegetación de México Edit. Limusa, tercera reimpresión México.
- SCHROEDER, S. 1989a Isozyme polymorphisms in Silver fir (*Abies alba* Mill.). Sivae genetica 38(3-4) 130-133
- SCHROEDER, S. 1989b Outcrossing rates and seed characteristics in damaged natural populations of *Abies alba* Mill. Sivae genetica 38(5-6) 185-189
- SHEA K.L. y G.R. Furnier 1994. Genetic variation and spatial genetic structure in four balsam fir (*Abies balsamea*) populations. Supplement to the American Journal of Botany (Abstracts) 81(6): 174.
- SLATKIN, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. Evolution 47(1): 264-279.

- SLATKIN, M. 1994. Gene Flow and population structure En L. A. Real (de), Ecological Genetics. Princeton Univ. Press, EUA 3-17 pp
- SNEATH, D.H.A. y R.R. Sokal 1973. Numerical Taxonomy W.H Freeman, EUA
- SNOOK, L.K. 1995. Conservación del bosque Ciencias 40 50-51
- SOULE, M.E. y L.S. Mills 1992. Conservation genetics and conservation biology, a troubled marriage En O.T. Sandlund, K. Hindar y A.H.D. Brown (eds), Conservation of Biodiversity for Sustainable Development Scandinavian Univ Press, Noruega 55-69 pp
- SWOFFORD, D.L. y R.K. Selander 1981. BIOSYS-1 (release 1.7), a computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematic, user manual Illinois Natural Survey, EUA
- St. CLAIR, J.B. y W.B. Critchfield 1988. Hybridization of a Rocky Mountain fir (*Abies concolor*) and a Mexican fir (*Abies religiosa*) Can. J. For. Res. 18 640-643
- TANKSLEY, S.D. y T.J. Orton 1983. Isozymes in Plant Genetics and Breeding Part A Elsevier Science Publishers B.V. Holanda
- THOMPSON, R.S., C. Whitlock, P.J. Bartlein, S.P. Harrison y W.G. Spaulding 1993. Climatic changes in the Western United States since 18,000 yr. B.P. En H.E. Wright, Jr., J.E. Kutzbach, T. Webb III, W.F. Ruddiman, F.A. Street-Perrot y P.J. Bartlein (eds), Global Climates since the Last Clacial Maximum University of Minnesota, EUA 468-513
- WEBB III, T., W.F. Ruddiman, F.A. Street-Perrot, V. Markgraf, J.E. Kutzbach, P.J. Bartlein, H.E. Wright Jr. y W.L. Prell 1993. Climatic changes during the past 18,000 years: regional synthesis, mechanisms and causes En H.E. Wright, Jr., J.E. Kutzbach, T. Webb III, W.F. Ruddiman, F.A. Street-Perrot y P.J. Bartlein (eds), Global Climates since the Last Clacial Maximum University of Minnesota, EUA 514-535
- WEBER, J.C. 1980. Isoenzyme variation among ten populations of *Populus trichocarpa* (Torr y Gray) in the Pacific northwest, M.S. thesis submitted to the University of Washington, EUA
- WORKMAN, p1 y J.D. Niswander 1970. Population studies on Southwestern Indian Tribes II local genetic differentiation in the Papago Amer. J. Hum. Genet. 22 24-29
- WRIGHT, S. 1943. Isolation by distance Genetics 28 139-156
- WRIGHT, S. 1969. Evolution and the Genetics of Populations, vol. 2 The Theory of Gene frequencies Univ. of Chicago Press, EUA
- YEH, F.C. 1988. Isozyme Variation of *Thuja Plcata* (Cupressaceae) in British Columbia, Biochemical Systematic and Ecology 16(4) 373-377
- YEH, F.Ch.-H y D. O'Malley 1980. Enzyme variations in Natural Populations of Douglas-fir, *Pseudotsuga menziesii* (Hirb) Franco, from British Columbia I genetic variation patterns in Coastal Populations Silvae genetica 29(3-4) 83-92

APÉNDICES

Apéndice 1

Sistemas de electroforesis.

A) Sistema H (Chelnak y Pitel 1984)

Buffer de Electrodo (pH 7.0)

0.125 M Tris

Llevar al pH deseado con una solución 1 M de ácido cítrico.

Buffer del Gel (pH 7.0)

0.05 M ácido cítrico (Anhidro)

1.40 µM EDTA

Llevar al pH deseado con una solución 1 M de Tris. Luego diluir el stock 4:1.

B) Sistema R (Ridgeway 1970)

Buffer del Electrodo (pH 8.1)

0.06 M hidróxido de litio

0.3 M ácido bórico

Buffer del Gel (pH 8.5)

0.03 M Tris

0.005 M ácido cítrico

agregar 1% del buffer de Electrodo

Para hacer un gel de 400 ml, hay que poner 30 ml de buffer del gel y 270 de agua.

Buffer de extracción.

A) Buffer YO

10 ml

solución de Tris-ácido cítrico (Tris-ácido cítrico emplear 1.57 g de trizma

base, 0.83 g ácido cítrico. Llevarlo a 100 ml con agua destilada y ajustar el pH

a 7.0)

0.05 g

NADP

0.05 g

NAD

0.018 g

ácido ascórbico

0.034 g

EDTA

0.10 g

seroalbúmina de bovino

0.33 ml

2-mercaptoetanol

Llevarlo a 100 ml con agua destilada.

B) Buffer Veg-II

0.31 g

ácido bórico

2 ml

Tergitol 15-S-9

2g

PEG 8000

7 g

PVP 40

1 g

PVP 360

0.88 g

ácido ascórbico

0.02 g

NAD

0.1 g

seroalbúmina de bovino

0.005 g

piridoxal 5-fosfato

0.27

sacarosa

0.19

cistina-HCl

0.66 ml

2-mercaptoetanol

Llevarlo a 100 ml con agua destilada y ajustarlo el pH a 7.1 con hidróxido de sodio.

Enzimas.

Después de agregarle a los geles los reactivos para llevar a cabo la tinción de las enzimas, a todas se introdujeron a un horno de 36° C, hasta que vimos que los alieos estaban bien definidos (Eisevier 1972; Tanksley y Orton 1983).

A) Sistema H:

Acido fosfatasa (ACP, E.C.3.1.3.2) Cheliah y Pritel, 1984	
50 mg	Fans Garnet GHC Salí
150 mg	Sodio- α -naftil fosfato acido
50 ml	0.2 M Buffer de acetato de sodio pH 5.0
5 ml	MgCl ₂ al 1%

Fosfoglucomutasa (PGM, E.C.2.7.5.1) Soltis <i>et al.</i>, 1983.	
75 mg	Glucosa-1-fosfato (Sigma G-7000)
5 ml	1 M Tris-HCl pH 8.0
40 ml	Agua destilada
1 ml	MgCl ₂ al 10%
3 ml	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
1 ml	TPN (=NADP) al 10%
1 ml	MTT al 10%
0.3 ml	PMS al 10%

Isocitrato deshidrogenasa (IDH; E.C.1.1.1.42) Modificado de Soltis *et al.*, 1983

Vaso 1	
200 mg	Acido isocitrico (Sal Trisódica)
25 ml	0.2 M tris-HCl pH 8.0
1 ml	MgCl ₂ al 10%
1 ml	TPN (=NADP) al 10%
0.5 ml	MTT al 10%
0.2 ml	PMS al 10%

Vaso 2:	
0.36 gr	Agar
25 ml	0.2 M Tris-HCl pH 8.0

Calentar hasta que hierva y se disuelva bien el agar, entonces mezclar el vaso 2 con el vaso 1.

Menadiona reductasa (MNR; E.C.1.6.99.2) Conkle *et al.*, 1982.

25 mg	b-NADH (forma reducida)
10 mg	NBT
25 mg	Menadiona
75 ml	0.05 M Tris-HCl pH 7.0

Shikimato deshidrogenasa (SDH; E.C.1.1.1.25) Modificado de Werth, 1985

Vaso 1:	
40 mg	Acido shikímico
25 ml	0.2 M Tris-HCl pH 8.0
1 ml	MgCl ₂ al 10%
1 ml	TPN (=NADP) al 10%
1 ml	MTT al 10%
1 ml	PMSal 10%

Vaso 2:	
0.36 gr	Agar
25 ml	0.2 M Tris Hcl pH 8.0

B) Sistema R:

Fosfoglucosa isomerasa (PGI; E. C. 5.3.1.9) Modificado de Conkle *et al.*, 1982.

25 mg	D-Fructuosa-6-fosfato
50 ml	0.2 M Tris-HCl pH 8.0
3 ml	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
1 ml	1 M MgCl ₂ o al 10%
1 ml	TPN (=NADP) al 10%
1 ml	MTT al 10%
0.5 ml	PMS al 10%

Glutamato deshidrogenasa (GDH; E. C. 1.4.1.2) Modificado de Conkle *et al.*, 1982.

1 g	Acido L-glutámico (sal monosódica)
10 mg	NAD (=DPN)
10 ml	1 M Tris-HCl pH 8.0
40 ml	Agua destilada
1.5 ml	MTT al 10% o NBT al 10%
0.5 ml	PMS al 10%

Leucina aminopeptidasa (LAP; E. C. 3.4.11.1) Werth, 1985.

100 mg	Fast Black K Salt
50 ml	Buffer 0.2 M de Tris-maleato pH 5.2
1 ml	L-leucina- β -naftilamida HCl 2.5

Disolverlo muy bien en 5 ml de agua destilada justo en el momento antes de teñir.

Peptidasa (PEP; E. C. 3.4.13.11) Selander *et al.*, 1986

20 mg	O-Dianisidina
40 mg	Leucil-alanina
30 mg	Peroxidasa
20 mg	Snake venom (Sigma V-7000)
50 ml	0.2 M Tris-HCl pH 8.0
1 ml	MgCl ₂ al 1%

Peroxidasa anódica (APX; E. C. 1.11.1.7) Haakim-Elahi, 1976.

100 mg	J-Amino-9-etilcarbazol
7 ml	Dimetilformamida
90 ml	Agua destilada
1 ml	Peróxido de hidrógeno al 3%
2 ml	CaCl ₂ al 1%
5 ml	1 M acetato de sodio pH 5.0

Rubiaco (RUB; E. C. 4.1.1.39)

Vaso 1:	
10 mg	Naphthol Blue Black (NBB)
Vaso 2:	
10 ml	Acido acético
40 ml	Metanol
40 ml	Agua destilada

Agregar la solución del vaso 2 al vaso 1 con NBB. Agitar bien y volcarlo sobre le gel e incubar por una hora a temperatura ambiente. Quitar la solución del gel sin lavar y agregar una nueva sin NBB, realizar la misma operación dos veces más.

Frecuencias alélicas de la población C32 a la C37, D39, D40 y V50

Locus	Poblaciones								
	C32	C33	D34	D35	C36	C37	D39	D40	V50
ACPh									
1	39	40	40	40	40	37	38	21	39
2	1.000	0.938	1.000	1.000	0.950	0.743	1.000	1.000	0.692
3	0.000	0.063	0.000	0.000	0.050	0.257	0.000	0.000	0.308
APX1									
1	39	40	40	40	40	37	40	21	38
2	0.090	0.825	0.863	0.625	0.625	0.608	0.325	0.833	1.000
3	0.910	0.175	0.138	0.375	0.375	0.392	0.675	0.167	0.000
4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
APX2									
1	39	40	39	40	40	37	38	21	40
2	1.000	0.675	0.756	0.663	0.237	0.608	0.724	0.000	0.700
3	0.000	0.325	0.244	0.335	0.762	0.392	0.276	0.143	0.300
4	0.000	0.000	0.000	0.013	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
GDH									
1	38	40	-----	40	40	37	39	19	37
2	1.000	1.000	-----	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
IDH									
1	39	40	40	40	40	37	40	21	38
2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.938	1.000	0.974
3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.063	0.000	0.026
LAP1									
1	39	40	40	40	39	37	40	21	40
2	1.000	1.000	1.000	1.000	0.231	1.000	1.000	1.000	1.000
3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.769	0.000	0.000	0.000	0.000
LAP2									
1	-----	40	40	40	40	-----	41	21	40
2	-----	1.000	0.900	0.913	1.000	-----	1.000	1.000	1.000
3	-----	0.000	0.100	0.087	0.000	-----	0.000	0.000	0.000
PGI1									
1	39	40	40	40	40	37	41	21	36
2	1.000	1.000	1.000	1.000	0.887	1.000	0.805	0.690	0.875
3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.112	0.000	0.195	0.310	0.125
PGI2									
1	39	40	40	40	40	37	41	21	40
2	0.923	0.837	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
3	0.077	0.162	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
PGM									
1	39	40	40	40	40	37	41	21	40
2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.714	1.000
3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.286	0.000
PEP1									
1	39	40	40	40	40	37	41	21	40
2	1.000	1.000	1.000	1.000	0.750	1.000	1.000	1.000	1.000
3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.250	0.000	0.000	0.000	0.000
PEP2									
1	39	40	40	40	40	37	41	21	38
2	1.000	1.000	1.000	1.000	0.900	1.000	1.000	0.429	1.000
3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.100	0.000	0.000	0.571	0.000
4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
PEP3									
1	39	40	40	40	40	37	41	21	40
2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.714	1.000
3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.286	0.000
MNR									
1	39	40	40	-----	39	37	39	21	39
2	1.000	0.850	1.000	-----	1.000	0.824	1.000	0.571	1.000
3	0.000	0.150	0.000	-----	0.000	0.176	0.000	0.429	0.000
RUB									
1	39	40	40	40	40	37	41	21	40
2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
SDH									
1	39	40	38	40	37	33	39	21	33
2	0.705	0.188	0.895	0.788	0.838	0.788	0.731	0.690	0.545
3	0.295	0.375	0.105	0.213	0.162	0.136	0.269	0.310	0.455
4	0.000	0.438	0.000	0.000	0.000	0.076	0.000	0.000	0.000

La realización de este trabajo no hubiera sido posible primero, sin el apoyo económico de la CONABIO y del Instituto de Ecología de la UNAM. Segundo, sin la ayuda de muchas personas en el campo y en el laboratorio, a todas ellas gracias. Agradezco mucho el apoyo y sugerencias de mis asesores: al Dr. Glenn Furnier (quien además me brindó su amistad), al Dr. Luis Eguiarte, al Dr. Eduardo Morales (quien fue el que me invitó a este trabajo), a la Dra. América Castañeda y al Dr. Daniel Piñero. A mi familia: mamá, papá y Carolina, un gracias muy sincero. Finalmente, a los pacientes y amigos gracias por compartir conmigo su vida y experiencias.