



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

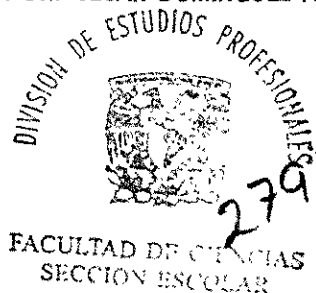
FACULTAD DE CIENCIAS

EL EFECTO DE LA ESTERILIDAD MASCULINA
SOBRE LA GENETICA DE POBLACIONES DE
ERYTHROXYLUM HAVANENSE, IMPLICACIONES
PARA LA EVOLUCION DE LA HETEROSTILIA

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 :
CESAR ANTONIO ABARCA GARCIA

DIRECTOR DE TESIS: DR. CESAR DOMINGUEZ PEREZ-TEJADA

MEXICO, D. F.



2000



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
AVENIDA DE
MEXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

El efecto de la esterilidad masculina sobre la genética de poblaciones de *Erythroxyllum havanense*, implicaciones para la evolución de la heterostilia

realizado por César Antonio Abarca García

con número de cuenta 9450283-9 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Dr. César Domínguez
Propietario Dr. Francisco Molina

Propietario Dr. Luis Eguiarte

Propietario Dr. Mauricio Quesada

Suplente Dr. Daniel Piñero

Suplente

Francisco E. Molina F.

Edna Suarez

Consejo Departamental de Biología

Dra. Edna Suarez

Indice.

Introducción	1
Especie De Estudio.....	6
Objetivos.....	10
Hipótesis.....	10
Sitio De Estudio	12
Metodología.....	14
RAPD's.....	15
Análisis De Datos.....	16
Frecuencias Alélicas.....	17
Resultados.....	20
Discusión.....	26
Conclusiones.....	31
Bibliografía.....	32
Apéndice I.....	38
Apéndice II.....	39
Apéndice III.....	40
Agradecimientos.....	42

Introducción.

Desde los primeros trabajos realizados por Darwin, la heterostilia ha sido usada como un modelo para estudiar la evolución de los sistemas reproductivos de las plantas con flores (Darwin 1887). La heterostilia, y en particular la distilia, está caracterizada por un polimorfismo genético en el cual las poblaciones de plantas están compuestas por dos morfos florales (Pin y Thrum) que difieren recíprocamente en la longitud de los estilos y los estambres (Dulberg 1992). Este polimorfismo, por lo general, está acompañado por un sistema de autoincompatibilidad esporofítico dialélico que previene la fertilización intraplanta e intramorfos (Richards y Barrett 1992). Además, es común encontrar diferencias en una serie de características morfológicas entre las que podemos hallar la forma, el tamaño y número de los granos de polen, o el área de la superficie estigmática, entre otras (Richards y Barrett 1992).

La discusión sobre la heterostilia, ha cobrado considerable atención y se ha centrado principalmente en las rutas evolutivas que podrían mantener o modificar este sistema reproductivo. La heterostilia puede ser evolutivamente estable, evolucionar hacia la homostilia, o bien hacia la dioecia (Figura 1., Loyd y Webb 1992; Loyd et al. 1990). La evolución hacia una condición homostilica implicaría la pérdida de uno de los morfos florales y la recuperación de la capacidad de autofecundación. En cambio, la evolución a la dioecia requiere de la especialización funcional de cada uno de los morfos florales, uno especializándose en la función masculina (generalmente el Thrum) y el otro, en la femenina (generalmente el Pin). De esta forma todos los individuos ganarían toda su adecuación a través de una de las dos vías sexuales (Barrett 1992; Loyd y Webb 1992). En teoría, la evolución de la homostilia a partir de una condición heterostilica, sería

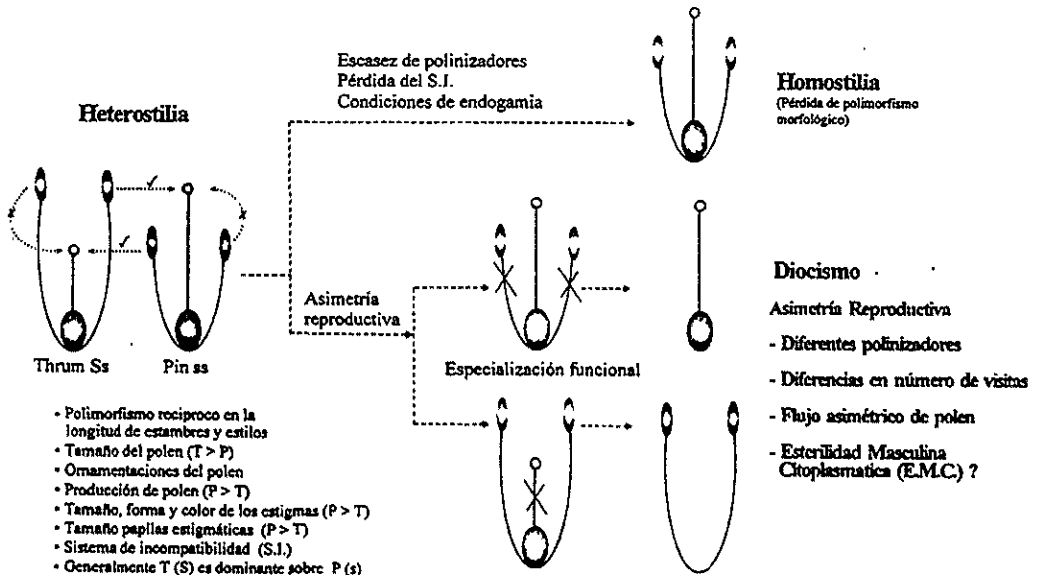


Fig.1. Rutas evolutivas de la heterostilia.

favorecida por altos niveles de autofecundación, eventos de colonización y escasez de polinizadores (Charlesworth y Charlesworth 1978). Por otra parte la transición evolutiva de la heterostilia a la dioecia debería ser favorecida cuando la transferencia de polen entre los morfos florales es asimétrica (Ornduff 1988; Beach y Bawa 1980; Casper 1992).

Cabe señalar que existe otra hipótesis que se basa en conflictos genéticos de carácter intragenómico, la cual sugiere que la transición evolutiva a la dioecia se genera por procesos de selección que se originan dentro de los individuos (Dominguez et al. 1997, Domínguez 1995). Estos procesos de selección surgen debido a que en las interacciones genéticas, los genes interactuantes pueden competir de acuerdo a diferentes patrones de herencia e intereses reproductivos (Domínguez 1995). Por ejemplo, en las angiospermas existe una compleja interacción que se lleva a cabo en el citoplasma entre genes nucleares y mitocondriales. Esta complejidad muchas veces es un factor que causa disyuntivas entre estas dos entidades del genoma, sobre todo cuando se encuentran en regiones en donde ambos organelos celulares controlan importantes características genéticas, como la determinación del sexo (Nakajima et al 1997). Algunas mutaciones que ocurren en el genoma mitocondrial y que se transmiten únicamente vía materna, producen esterilidad masculina citoplasmática (CMS), y tienen como consecuencia la inviabilidad del polen (Hurst 1992, Saumitou-Laprade 1994). Ejemplos de estos procesos se han documentado recientemente en los trabajos realizados en poblaciones de especies ginodioicas (*Plantago lanceolata* por Van Damme 1993, *Origanum vulgare* por Kheyr-Pour 1981 y *Thymus vulgaris* por Saumitou-Laprade 1994, Couvet et al. 1998). Poblaciones de plantas en donde se encuentran coexistiendo tanto plantas hembra (debido a la esterilidad del polen), como plantas hermafroditas. Demostrándose que la presencia de las plantas femeninas se debe a genes mitocondriales que esterilizan el polen y de plantas hermafroditas, debido a la acción de genes restauradores nucleares que

restablecen la función masculina. En estas poblaciones además las plantas hembras presentan una mayor producción de semillas que las hermafroditas, debido a que la selección natural podría estar favoreciendo alelos citoplasmáticos que incrementarían la cantidad de óvulos mediante la reasignación de recursos a la parte femenina como consecuencia de la disfunción masculina (Sakai y Weller 1999). Estos estudios han considerado que el ginodioicismo corresponde a un estado intermedio de evolución al dioicismo (Manicacci et al. 1998, Saumitou-Laprade 1994, Tarayre y Thompson 1997, Couvet et al. 1998). Esta evidencia sugiere que los conflictos de carácter intragenómico podrían jugar un papel importante en la evolución de sistemas reproductivos hermafroditas a dioicos.

Sin embargo, a pesar del esfuerzo tanto teórico como empírico que se ha realizado hasta el momento para tratar de comprender la evolución de la heterostilia, aún no se había explorado la posibilidad de la evolución a la dioecia desde la distilia a partir de una hipótesis basada en conflictos de carácter intragenómico. Por lo tanto, en este trabajo se explora esta posibilidad a partir de un estudio de genética de poblaciones con marcadores moleculares RAPDs, a través del cual se espera obtener información acerca de cómo opera la esterilidad masculina probablemente de origen citoplasmático sobre la estructura genética de las poblaciones del arbusto heterostílico *Erythroxylum havanense*.

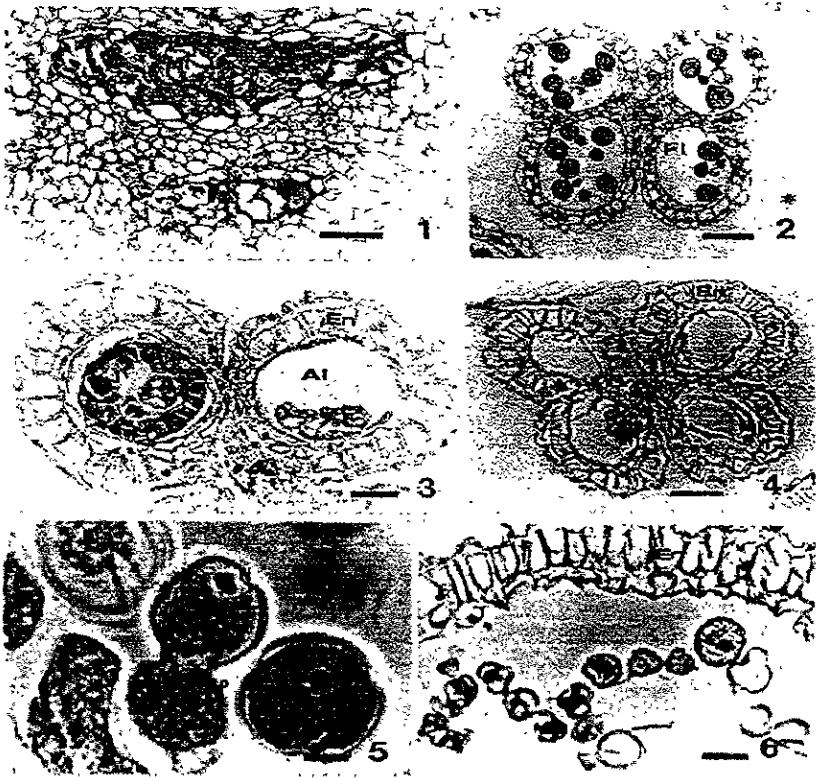
Además, cabe mencionar que los estudios de genética de poblaciones se han centrado más bien en describir la distribución geográfica de las especies o los mecanismos de dispersión de polen y semillas para explicar la estructura genética de diferentes poblaciones de plantas sin tomar en cuenta procesos intrínsecos de los individuos. Por ejemplo, muchos estudios (Brown 1978, Hamrick y Loveless 1986) han mostrado que los sistemas de apareamiento y los mecanismos de dispersión de semillas están fuertemente asociados con los niveles de variación genética dentro y entre las

poblaciones. Basados en estos datos, las poblaciones de árboles tropicales tienen menores niveles de variación aloenzimática (0.111, Hamrick y Loveless 1986) que las poblaciones de coníferas de zonas templadas (0.20, Hamrick y Loveless 1986), pero presentan un poco más de variación que las dicotiledonias de estas mismas zonas templadas (0.0113, Hamrick y Loveless 1986). También se ha encontrado de manera general que la mayoría de las plantas presentan entre moderados y altos niveles de variación, detectándose patrones claros, como que las plantas de vida larga presentan más variación genética que las de vida corta, que las plantas con distribuciones amplias y/o que son abundantes localmente también son las que presentan niveles más altos de variación genética, que las plantas con polinización cruzada tienen más variación que las especies que se autopolinizan (Brown 1979, Hamrick y Loveless 1986, Ledig 1986); y que la atracción de animales para la polinización y/o dispersión de semillas es crítica para el flujo de genes a través tanto de polen como de semillas. Particularmente para las especies autoincompatibles, la atracción es esencial para poder llevar a cabo la reproducción (Loiselle et al. 1995).

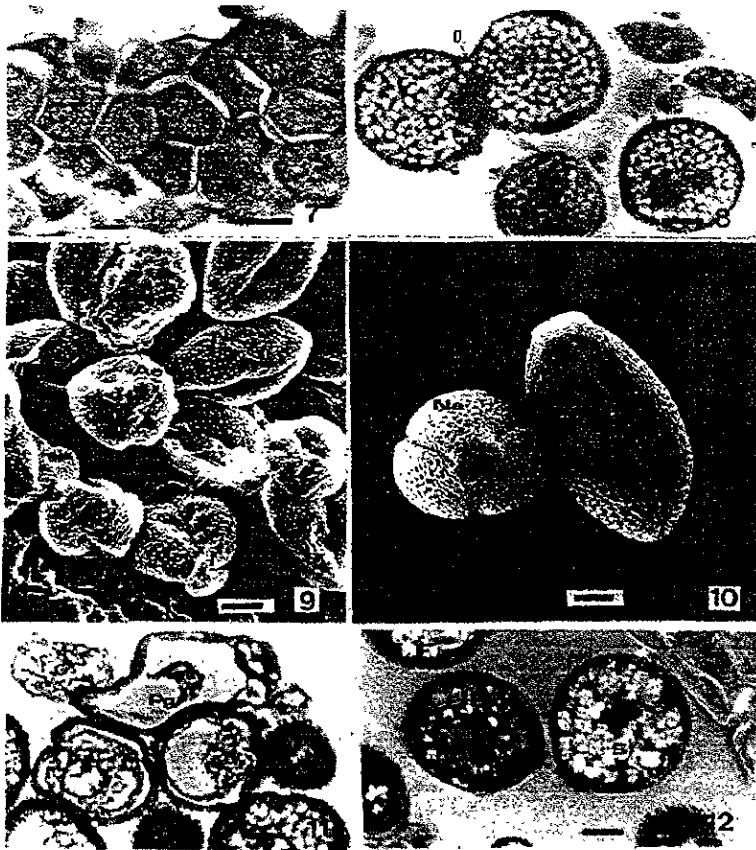
Especie de estudio.

Erythroxylum havanense es un arbusto distilico, perenne, caducifolio que presenta un patrón de floración sincrónico y masivo (Dominguez 1990) Los individuos no florecen hasta que han alcanzado siete u ocho años de edad. Estudios previos en condiciones naturales han mostrado que existe una asimetría en la producción de frutos entre ambos morfos florales, y que los individuos Thrum no sólo son más fecundos que los individuos Pin, sino que esta relación es casi del doble (Dominguez 1990, Dominguez et al 1997). Estas diferencias no se deben a factores ecológicos como una diferencia en el número o identidad de los polinizadores o a la transferencia asimétrica en el flujo del polen (Dominguez 1990, Dominguez et al 1997) Un estudio embriológico indicó que hay una evidente esterilidad masculina, ya que existe un desarrollo anormal en tres diferentes estadios del desarrollo del androceo: en el tejido esporógeno, en el tapetum y en las microsporas (Figuras 2-3, Dominguez et al. 1997). Además, otro estudio realizado en varias poblaciones de esta especie mostró que los niveles de esterilidad varían entre poblaciones, entre los morfos de cada población, y entre las plantas de cada morfo (Cuevas 2000).

En el caso de *E. havanense* se piensa que originalmente la esterilidad podría estar presente en ambos morfos florales. Para explicar entonces las diferencias entre los niveles de esterilidad entre ambos morfos florales se ha propuesto que también pudieron haber evolucionado genes restauradores nucleares (Dominguez et al 1997), que en este caso estuvieran asociados solo al haplotipo Pin. Puesto que los individuos Pin son generalmente homogaméticos (ss) (Lewis y Jones 1992, Barrett 1992) podrían tener



Figs.2.Estructuras reproductivas en *E. havanense*. a (1). Tejido esporógeno de la antera Thrum. b (2). Antera Pin c (3). Antera Thrum en estado de meiosis, mostrando un loculo normal y uno anormal sin tapetum d (4). Antera Thrum en estado de meiosis, con todos los loculos abortivos e (5). Granos de polen Thrum con el citoplasma fuera de los limites impuestos por la exina f (6). Granos de polen Thrum vacios.



Figs.3. Microsporas y granos de polen en *E. havanense*. a (7). Microsporas Thrum b (8). Diadas Thrum c (9). Granos de polen Thrum abortivos y normales en el mismo loculo d (10). Granos de polen Pin e (11). Granos de polen Thrum vacíos y amorfos f (12). Granos de polen Pin.

(Tomado de Dominguez et al. 1997)

dos copias de estos genes restauradores. Suponiendo que solo teniendo dos copias de estos genes restauradores nucleares fuera la única manera de restaurar la función masculina, entonces los individuos Thrum presentarían esterilidad masculina citoplasmática, debido a que solo tendrían una copia de los restauradores, ya que son heterogaméticos (Ss). Además el haplotipo Thrum es dominante sobre el Pin (Lewis y Jones 1992, Barrett 1992).

Objetivos.

Este trabajo tiene tres objetivos, ambos enfocados en entender la dinámica evolutiva del sistema reproductivo del arbusto distílico *E. havanense* (Erythroxylaceae).

- 1) Mediante marcadores moleculares RAPD's describir los niveles de variación genética dentro y entre poblaciones.
- 2) Encontrar un marcador molecular para la esterilidad masculina.
- 3) Interpretar los resultados en el contexto de la teoría de conflictos y su relación con la evolución de *E. havanense* hacia la dioecia.

Hipótesis.

Las hipótesis de este trabajo se basan en los datos obtenidos en otras especies con EMC y el conjunto de resultados encontrados en *E. havanense* que nos permiten inferir como opera la esterilidad masculina en una especie heterostilica.

En este trabajo se espera que exista una alta diferenciación genética entre las poblaciones de *E. havanense*, debido a que tanto los alelos que causan esterilidad masculina como los restauradores nucleares seguramente se originan de manera azarosa en cada una de las poblaciones, pudiendo inclusive estar presente en algunas y en otras no (Couvet et al 1986, Gigord et al 1998). Esta explicación también propone una posible variación entre los citotipos que causan esterilidad y los restauradores, pues ambos pudieron haber surgido independientemente entre las poblaciones. Si es de esta forma la presencia de esterilidad masculina citoplasmática en *E. havanense* ejercería una fuerte

presión selectiva que tuviera como resultado una alta diferenciación genética entre las poblaciones.

También se espera que la variabilidad genética dentro de cada población sea alta, debido a que el sistema esporofítico de autoincompatibilidad previene la autofecundación.

Sitio de estudio.

Esta investigación se llevó a cabo en la estación de biología de Chamela, reserva del Instituto de Biología de la UNAM, así como en zonas aledañas (Figura 4). La estación comprende un área de 1600 ha y se localiza en la costa del estado de Jalisco, México (19° 30' N, 105° 03' W). El relieve de la región se caracteriza por lomeríos de baja elevación (< 150 m). El clima pertenece a los cálidos-húmedos (A) y una característica muy importante es la precipitación estival de las lluvias, concentrándose el 80% de estas entre los meses de Julio y Octubre (Bullock 1986). La precipitación promedio anual es de 784 mm.

La estación seca se extiende de Noviembre a Mayo, aunque hay lluvias de intensidad variable en Diciembre y Enero. La temperatura promedio anual es de 24.9 °C y la del mes más frío de 18 °C.

La vegetación de los lomeríos y la de los arroyos dentro de la estación ha sido descrita por Lott et al. (1987) y corresponde a un bosque tropical caducifolio y bosque tropical subcaducifolio de acuerdo con la clasificación de Rzedowski (1978). Ambos sitios son muy distintos florística y estructuralmente (Lott et al. 1987), así como en su fenología.

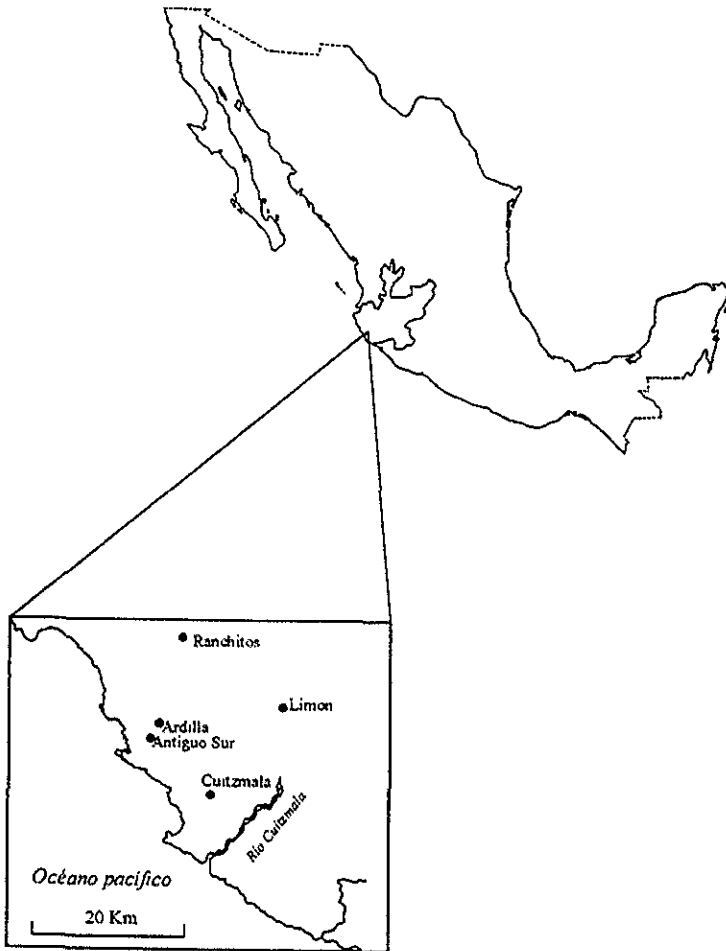


Figura 4. Mapa de la zona de estudio en el estado de Jalisco, México
(Modificado de Cuevas 2000).

Metodología.

La estructura genética de *E. havanense* se determinó a partir del estudio de cinco poblaciones de la región de Chamela, Jalisco: Limoncito, Ardilla, Antiguo Sur, Cuitzmala y Ranchitos (Figura 14). El número de plantas que se muestreó para cada población fue de 36, 36, 23, 22 y 27 respectivamente. Cada una de las muestras (hojas) fue etiquetada y transportada al laboratorio en un tanque que contenía nitrógeno líquido (-190 °C). Una vez en el laboratorio las muestras fueron guardadas en un congelador (Revco -70°C).

Posteriormente se extrajo el ADN de cada uno de los individuos usando el método de CTAB (Doyle y Doyle, 1987) y una técnica corta de extracción (ver apéndice). La concentración del ADN extraído fue cuantificada usando un fluorómetro Hoefer (Biopharmacia Dynaquant 200). Todas las muestras fueron ajustadas a una misma concentración de 25 ng/ml para las reacciones en el PCR. La reacción fue llevada a cabo en un volumen final de 25 µl en un termociclador Perkin-Elmer 480. La mezcla (master mix) para llevar a cabo la reacción contenía 18.25 µl de H₂O, 2.5 µl de PCR buffer (500mM KCL, 100mM Tris-HCL. pH 8.3, 15 mM MgCl₂, y 0.01% (w/v) gelatina), 0.25 µl de cada uno de los dNTP's, 0.25 µl de ADN taq polimerasa (Perkin-Elmer), y 0.2 µl de primer (Operon technologies). Los ciclos de amplificación consistieron de 1 min de inicio (36°C), 44 ciclos de 1 min de desnaturalización (94°C), 1 min de acoplamiento (36°C), y 2 min de extensión (72°C), con un periodo final de 10 min de extensión a 72°C. Finalmente los productos se dejan a 4°C durante 18 hrs. Los productos de la amplificación fueron separados en geles de agarosa al 1.5 % usando 1X de TBE buffer para correr el gel. Los geles fueron teñidos con 12 µl de bromuro de etidio, visualizados en un transiluminador de luz ultravioleta y fotografiados para su

análisis. Los primers de Operon Technologies que fueron utilizados para este estudio son: 5-B, 7-B, 10-A, 17-A y 11-B. Para el análisis de datos sólo las reacciones reproducibles fueron incluidas. Un total de 42 bandas fueron reproducibles.

RAPD's.

Los RAPD's (Random Amplified Polymorphic DNA) son una técnica genético-molecular que detecta polimorfismos que existen en el ADN genómico a partir de la amplificación enzimática de segmentos aleatorios del mismo (Erlich y Arnheim 1992). Los RAPD's son usados como marcadores moleculares a partir de una variación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Williams et al. 1990). Para que se lleve a cabo la reacción se tiene que extraer el ADN que se quiere amplificar. Se utiliza una enzima termoestable denominada Taq polimerasa, magnesio como cofactor, secuencias cortas de oligonucleótidos (primers) y nucleótidos libres. La reacción de amplificación se lleva a cabo mediante una serie de ciclos en los cuales existen cambios de temperatura que se realizan en un termociclador. Primero el ADN se desnaturaliza a 94 °C abriéndose la doble cadena, después desciende la temperatura a 37°C, lo que permite que los primers u oligonucleótidos se alinien a uno o más sitios homólogos a lo largo de la cadena de ADN. Para favorecer que estas alineaciones sean completamente homólogas se vuelve a elevar la temperatura a 54°C. Finalmente se mantiene la temperatura óptima para la enzima que es a 72 °C y comienza la fase de replicación (Grosberg et al 1996). Los segmentos que resultan de la amplificación son separados por medio de electroforesis en geles de agarosa, teñidos con bromuro de etidio, visualizados en luz ultravioleta y fotografiados (Darnell et al. 1992).

Esta técnica está basada en la probabilidad de que existan sitios complementarios a los oligonucleótidos a través del genoma. Las bandas se generan por la existencia de

varios sitios de acoplamiento para un oligonucleótido en particular. El polimorfismo, que se ve reflejado por las diferencias en el número de bandas entre los individuos, se debe a los cambios en las secuencias del ADN en los sitios de acoplamiento. Los RAPDs también pueden ser codominantes si los alelos involucran inserciones o deleciones de fragmentos en estos sitios (Williams et al. 1990). Las mutaciones que inhiben el alineamiento del oligonucleótido o que previenen la amplificación, son detectadas por la ausencia de fragmentos amplificables de ADN (Otero et al. 1997). A partir de los resultados obtenidos con esta técnica no es posible distinguir a los homocigos dominantes de los heterocigos para un fragmento en particular (Groseberg et al. 1996). Por lo tanto, los RAPD's se expresan como marcadores dominantes/recesivos debido a que lo que obtenemos es la presencia o ausencia de una secuencia amplificable de ADN durante la reacción en cadena de la polimerasa (Groseberg et al. 1996; Otero et al. 1997).

También se realizaron dos búsquedas bibliográficas. En la primera (ver Tabla 4), se buscó información sobre especies heterostilicas en donde se hubieran realizado estudios de genética de poblaciones. Los resultados encontrados se compararon con los resultados obtenidos para *E. havanense*. La segunda búsqueda (ver Tabla 5), se realizó con el objetivo de incorporar la bibliografía existente acerca de estudios en donde se usaron RAPD's para describir la estructura genética de poblaciones de plantas.

Análisis de datos.

A partir de los datos obtenidos se construyó una matriz de presencia-ausencia de bandas para cada individuo en todas las poblaciones. Para el análisis de los datos se partió de la suposición de que cada banda representa el fenotipo de un locus con dos

alelos. De esta forma se denominó como 1 la presencia de la banda y 0 para el caso opuesto.

Con esta matriz se calcularon las frecuencias alélicas y posteriormente todos los parámetros de genética de poblaciones posibles para RAPDs. Para el caso de la diversidad genética dentro de cada una de las poblaciones se calcularon las heterocigosis esperadas (H_e) y la heterocigosis total (H_t). Para estimar la diferenciación genética entre poblaciones F_{st} se utilizó el procedimiento de Weir y Cockerham (1984) y las distancias genéticas de Nei (1973). Las distancias genéticas se usaron para construir un fenograma mediante el método UPGMA (Hartl y Clark 1989).

La heterocigosis (H_e) o diversidad genética es el promedio esperado en equilibrio de Hardy-Weinberg (Nei 1973, Hedrick 1983). Es decir, la probabilidad de sacar al azar dos alelos diferentes para un locus dado dentro de cualquier población. Toma valores que van entre 0 (cuando no hay variación) a 1 (cuando se tiene un número infinito de alelos por loci). Este parámetro calcula la proporción de diversidad genética compartida entre las poblaciones, en cambio la H_t nos indica la diversidad genética total.

Otra manera de calcular o describir la estructura genética de las poblaciones es usando los índices de fijación de Wright (1978). En este trabajo únicamente se utilizó el índice de fijación F_{is} que mide la diferenciación genética entre las subpoblaciones. Este índice toma valores que van de 0 cuando todas las poblaciones son iguales, a 1 cuando todas son diferentes. El índice de fijación F_{is} no se puede calcular cuando se utilizan RAPD's debido a que no se tiene un estimador de las heterocigosis observadas.

Frecuencias alélicas.

Para analizar los patrones de los RAPD's, se supuso que cada banda representa el fenotipo de un locus con dos alelos, y se cuenta su presencia o ausencia en cada

individuo. Debido a la propiedad de dominancia de los RAPDs, sólo la frecuencia de los genotipos recesivos (mostrando ausencia de la banda) se conoce sin ninguna ambigüedad. Por esta razón se utilizó el factor de corrección sugerido por Kremer et al. (1997).

$$Y_i = -f_i / 2(1 - f_i) + \Delta_{1/2} / 2 (1 - f_i) - (1 - f_i) - \Delta_{3/2} \text{ Var} (q_i).$$

Donde:

q_i es la frecuencia de los individuos que no muestran la banda en la población i , y f_i es el índice de fijación (Wright 1978) en la población i .

$$\Delta = f_i^2 + 4 (1 - f_i) q_i.$$

$$\text{y Var} (q_i) = q_i (1 - q_i) / n_i$$

n_i es el número de individuos en la población i , y q_i es la frecuencia observada de individuos que no muestran la banda en la población i . Para este análisis se recomienda restringirse a las bandas cuyas frecuencias observada sean menores que $1-3/n_i$ en cada población (Lynch y Milligan 1994). Los valores de los índices de fijación F_{is} fueron obtenidos del análisis de 31 loci isoenzimáticos (Ibarra, datos sin publicar).

Las distancias e identidades genéticas se obtuvieron con el programa TFPGA (Tools for population genetic analysis, Miller 1997) que construyó una matriz de distancias a partir de la matriz de datos. Como posible estimador tiene las distancias de Nei (1972). Con esta de matriz de distancias TFPGA se construyó un fenograma de distancias genéticas con el método UPGMA (Hartl y Clark 1989). Para probar la consistencia del árbol, se realizó un bootstrapping de 1000 permutaciones. Para el bootstráp el programa TFPGA construye nuevos sets de datos remuestreando sobre los loci originales. La información de cada nuevo set de datos es comparado con los datos del árbol original. De esta forma, el programa reporta la proporción del conjunto de

datos permutados que resulta en la formación de cada uno de los nodos originales (Miller 1997).

Finalmente se realizó un análisis de discriminantes con el objetivo de ver si se había obtenido un marcador para la esterilidad masculina. En este análisis se compararon las medias de las variables (frecuencias alélicas y esterilidad masculina) de cinco poblaciones y de esta forma se produjo una función discriminante, que es una medida relativa de las diferencias entre poblaciones (Lehner 1996).

Resultados.

La matriz de presencia-ausencia de bandas se realizó a partir del análisis de 5 primers que resultaron polimórficos después de probar 60. Estos primers fueron escogidos debido a que resultaron ser muy consistentes debido a su repetibilidad. Los demás primers probados tuvieron la desventaja de no ser muy claros a la hora de la lectura, por lo cual se decidió no meterlos en este estudio.

Los análisis genético-moleculares se realizaron con 142 bandas que resultaron polimórficas de 145. El peso molecular de las bandas obtenidas va de 0.3 Kb a 1.5 Kb.

En la Tabla 1 se muestran los valores de variabilidad genética en las poblaciones de *E. havanense* analizadas.

Tabla 1. Valores de heterocigosis esperada (H_e) estimados a partir de RAPD's en poblaciones de la región de Chamela, Jalisco. (intervalos de confianza al 95%).

Población	N	He
Ardilla	36	0.47 (0.0037)
Antiguo Sur	23	0.45 (0.0049)
Ranchitos	27	0.41 (0.0080)
Cuitzmala	22	0.39 (0.0142)
Limoncitos	36	0.37 (0.0271)
Promedio		0.42

$H_i = 0.47$.

Todos los valores de heterocigosis esperada fueron muy altos, siendo el más bajo de 0.37 en el caso de la población de Limoncito y el más alto de 0.47 para la población de Ardilla. La heterocigosis total, también fue muy alta (0.47). Todos los valores obtenidos fueron significativamente diferentes de 0. En las dos poblaciones que se

encuentran dentro de la estación biológica de Chamela (Ardilla y Antiguo Sur), las heterocigosis esperadas fueron más altas (0.47 y 0.45) que las de las poblaciones que se encuentran fuera de la estación que son Cuitzmala (0.39), Limoncito (0.37) y Ranchitos (0.41).

La diferenciación genética de las poblaciones F_{st} fue de 0.10. Esto indica que más del 10% de la variación genética de *E. havanense* está explicada por las diferencias entre las poblaciones. La diferenciación genética fue significativamente diferente de 0.

En la Tabla 2 se muestran las identidades y las distancias genéticas entre poblaciones. Se puede observar que las poblaciones se agrupan en dos conjuntos. Las poblaciones que están dentro de la estación y las que están fuera. Las poblaciones que tienen las mayores identidades genéticas son Antiguo Sur y Ardilla (0.955) que se encuentran dentro de la estación, y las poblaciones de Ranchitos y Limoncito (0.979) que se encuentran fuera. A su vez, los valores más lejanos que nos indican menor parecido, se encuentran entre los grupos de poblaciones más distantes geográficamente, es decir, entre Cuitzmala y Limoncito (0.783) y Limoncito y Antiguo Sur (0.866).

Tabla 2. Distancias e identidades genéticas de Nei para *E. havanense*. Arriba de la diagonal se muestran las distancias genéticas y por debajo las identidades.

	Ardilla	Cuitzmala	Limoncito	Ranchitos	Antiguo sur
Ardilla	---	0.094	0.058	0.034	0.045
Cuitzmala	0.909	---	0.243	0.178	0.053
Limoncito	0.943	0.783	---	0.020	0.143
Ranchitos	0.965	0.836	0.979	---	0.101
Antiguo sur	0.955	0.997	0.866	0.903	---

En la Figura 5 se muestra el fenograma de distancias genéticas UPGMA para *E. havanense*. El fenograma coincide con la descripción de las distancias e identidades genéticas. Las poblaciones de la estación biológica están agrupadas y forman un cluster. Sus distancias genéticas son muy similares (Antiguo Sur-Ardilla = 0.045). Las poblaciones de Cuitzmala, Ranchitos y Limoncito están alejadas de la estación e incrementan de igual manera su diferenciación genética. La proporción de similitud en las 1000 replicaciones del bootstrapping para cada nodo resultó ser relativamente baja. Para el nodo que une Limoncito y Ranchitos la proporción de la replicación fue de 0.54, para Ardilla y Antiguo Sur de 0.30, para Ardilla, Antiguo Sur y Cuitzmala de 0.25 y para el nodo principal de 1.

En el análisis de discriminantes que se realizó con el fin de ver si se había encontrado un marcador molecular para el caso de la esterilidad masculina se obtuvo una lambda de Wilk's = 0.9364, una $F(5,91) = 0.9362$ con una $p = 0.29$ no significativamente diferente de cero. Es decir, no se encontró el marcador molecular para la esterilidad masculina.

Este método (RAPDs) no ha sido utilizado para estudiar la estructura genética de ninguna especie heterostilica. Aunque existen numerosos estudios para diferentes especies de plantas basados en RAPDs (271), sólo ocho de éstos revisan los mismos parámetros de genética de poblaciones que en este trabajo (tabla 5).

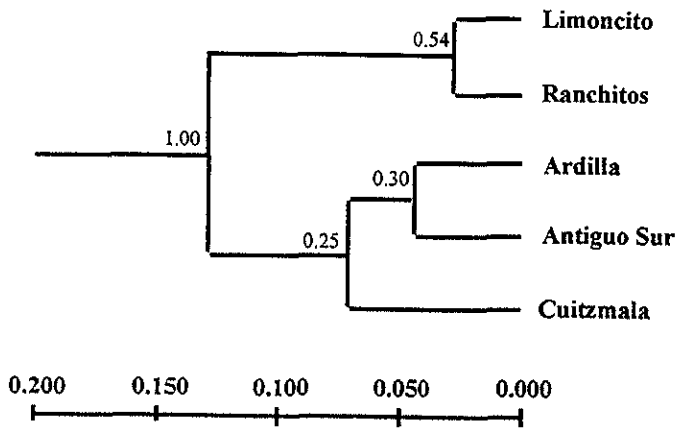


Figura 5. Fenograma a partir de los valores del algoritmo UPGMA y las distancias genéticas de Nei (1973) en *E. havanense*.

Tabla 4 Estructura genética para diferentes especies de plantas a partir de RAPDs

Autor	Especie	H _c	F _{st}	Distancia	# pobl	Forma de Vida
Bucci et al 1997	<i>Pinus leucodermis</i>	0.23	0.17	5,678 km	5	Árbol
Hamelin et al 1995	<i>Pinus strobus</i>	0.21	0.11	1,000 km	22	Árbol
Bonnin et al 1996	<i>Medicago truncatula</i>	-----	0.32	200 km	4	Hierba
Agres y Ryan 1997	<i>Wyethia reticulata</i>	0.31	0.25	104 km	4	Hierba
Rowe et al 1997	<i>Euphorbia esula</i>	0.41	0.46	5,000 km	5	Hierba
Navarro 1999	<i>Agave cerulata</i>	0.18	0.09	Baja California	5	-----
Navarro 1999	<i>Agave subsimplex</i>	0.14	0.08	Costa de Sonora	3	-----
Otero 1998	<i>Chamaedorea alternans</i>	0.35	0.02	Los Tuxtlas, Ver	---	-----
Abarca 1999	<i>Erythroxyllum havanense</i>	0.47	0.10	15-20 Km	5	Arbusto
Le Core et al 1997	<i>Quercus petrea</i>	0.23	0.17	Toda Europa	21	Árbol

En la Tabla 4 podemos observar que no existe ningún estudio en donde se hayan utilizado RAPD's para estudiar la estructura genética de alguna población heterostilica. En todos los estudios, las heterocigosis esperadas H_c son elevadas. Siendo las más altas de 0.47 para *E. havanense* y 0.41 para *E. esula* y las más pequeñas de 0.14 y 0.18 para *A. subsimplex* y *A. cerulata* respectivamente. La diferenciación genética entre poblaciones F_{st} en cambio, comprende rangos que van desde los moderados (*Chaemaedora alternans* 0.02, *Agave subsimplex* 0.08 y *Agave cerulata* 0.09) hasta los altos (*Erythroxyllum havanense* 0.47 y *Euphorbia esula* 0.46). En general todas las especies estudiadas tienen un amplio rango de distribución geográfica que va de cientos a miles de kilómetros.

excepto *E. havanense* el cual presenta como máxima distancia 20 kilómetros de separación entre una población y otra.

Tabla 5. estructura genética de poblaciones de plantas heterostíficas

Autor	Especie	H _i	H _e	F _{st}	F _{is}	F _{it}
Ganders et al 1985	<i>Amsinckia spectabilis</i>	0.63	0.016	0.047	----	----
Loiselle et al 1995	<i>Psychotria officinalis</i>	----	0.184	0.095	0.055	0.144
Loiselle et al 1995	<i>Psychotria surrensis</i>	----	0.14	----	----	----
Pérez-naser et al 1993	<i>Psychotria faxsluscens</i>	----	0.495	0.026	0.115	0.138
Hamrick y Loveless1986	<i>Psychotria horizontalis</i>	----	0.202	----	----	----
Hamrick y Loveless1986	<i>Faramaea occidentalis</i>	----	0.00	----	----	----
Abarca 1999	<i>Erythroxyllum havanense</i>	----	0.42	0.10	----	----

En la Tabla 5. podemos observar que las Heterocigosis esperada excepto para *Amsinckia spectabilis* (0.016) y *Faramaea occidentalis* (0.00) son relativamente altas. Estas se encuentran entre un rango de 0.14 para *Psychotria surrensis* hasta 0.49 para *Psychotria faxsluscens*. Sin embargo, en el caso de la diferenciación genética entre poblaciones F_{st}, encontramos que esta es particularmente alta para *E. havanense* (0.10), siendo incluso de un orden de magnitud mayor respecto al reportado para *Psychotria faxsluscens* (0.026) y *Amsinckia spectabilis* (0.047).

Discusión.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que existen altos niveles de variación genética dentro de todas las poblaciones y una fuerte diferenciación genética entre ellas.

Los resultados que nos indican una alta diferenciación genética pueden ser interpretados de acuerdo a las predicciones teóricas de los modelos que incluyen una dinámica evolutiva generada por esterilidad masculina citoplasmática (Carlesworth 1999) En poblaciones en donde existe una marcada variación en la frecuencia de hembras (debido a la esterilidad masculina) entre poblaciones, se ha demostrado que es consecuencia de las diferencias que existen entre citotipos que producen esterilidad masculina y alelos restauradores nucleares entre las poblaciones. Esta variación entre citotipos y restauradores tiene como resultado diferencias en la estructura genética de las poblaciones (Manacacci et al, 1998, Saumitou-Laprade 1994, Tarayre y Thompson 1997, Couvet et al. 1998).

Sí en *E. havanense* la esterilidad masculina también se debe a un conflicto entre genes nucleares y mitocondriales que controlan la expresión sexual, entonces existen dos posibles formas de explicar porqué existe una alta diferenciación entre poblaciones y porqué las poblaciones de Ardilla y Tejón que son las únicas en que los morfos florales difieren en sus niveles de esterilidad, se parecen más genéticamente entre si que las poblaciones que están fuera (Figura 5). La primera posibilidad, es que la presencia de genes que causan esterilidad masculina citoplasmática sólo estén presentes en estas dos poblaciones y en Limoncito, Ranchitos y Ardilla, no. Otra posibilidad es que aún estando

presente la EMC en todas las poblaciones, únicamente en Ardilla y Tejón se estén expresando genes restauradores nucleares y esto marque las diferencias.

Además, las poblaciones que presentan marcadas diferencias de esterilidad masculina entre los morfos florales (Ardilla y Tejón) son las que poseen los mayores niveles de variación genética (ver Tabla 1). Pensamos que las diferencias en los niveles de esterilidad masculina entre poblaciones y morfos, están directamente relacionadas con los niveles de variación genética. La esterilidad masculina podría estar afectando la tasa de entrecruzamiento, particularmente el mecanismo a partir del cual se generan individuos heterocigotos. De modo que las poblaciones que presentan esterilidad masculina asociada a uno de los morfos (Thrum) podrían reducir el rango de endogamia biparental, pues una vía de transferencia del polen de plantas Thrum emparentadas con plantas Pin prácticamente no existe. En cambio en las otras poblaciones (Limoncito, Ranchitos y Cuitzmala), el flujo de polen entre parientes se puede dar en ambos sentidos, tanto de individuos Thrum hacia Pin como lo inverso y esto podría tener como consecuencia, una mayor cantidad de homocigóticos.

Adicionalmente, encontramos una significativa diferenciación genética entre las poblaciones de *J. havanense* ($F_{st} = 0.10$), cuando comparamos los datos obtenidos para otras especies heterostilicas, en las cuales la F_{st} es de un rango de magnitud menor (ver Tabla 5). Este resultado podría ser interpretado de acuerdo a la existencia de un limitado flujo de genes a través del polen y de las semillas entre las poblaciones. La alta diferenciación también podría ser consecuencia o estar asociado a la variación en el patrón de floración sincrónico y masivo, pues este cambia entre años y entre poblaciones. El resultado de esto sería que cuando una población ha dejado de florecer, otra, apenas este comenzando (Dominguez 1990) y entonces que el flujo de polen entre poblaciones

se viera también limitado. Lo cual evitaría el arribo de genes restauradores de una población que los poseyera a una que no

Así mismo, la estimación de la F_{st} obtenida para *E. havanense* a partir de RAPD's revela también una fuerte diferenciación cuando la comparamos con otras especies (ver tabla 4). Por ejemplo, la estimación basada en RAPD's para otras especies varía de 0.02 para *C. alternans* (Otero 1998) a 0.46 para *E. esula* (Rowe et al. 1997), pero el rango geográfico utilizado en estos grupos es de por lo menos cinco veces más grande que el usado en este estudio. Incluso en algunas de estas investigaciones (*A. subsimplex* y *A. cerulata*, Navarro 1999) la diferenciación genética entre poblaciones fue menor a la de *E. havanense*, aún cuando se tratase de trabajos en los cuales se involucraron en procesos de especiación. Es decir, se encontró una fuerte diferenciación genética para un rango de distribución geográfica limitado. Además, entre estos estudios podemos encontrar coníferas y árboles tropicales, para las cuales en promedio se han registrado los mayores niveles de variación en caracteres moleculares (Loveless y Hamrick 1984, Ledig 1986).

Como ya se mencionó, en los modelos teóricos que introducen la EMC también se predicen altos niveles de diferenciación genética entre poblaciones (Charlesworth 1999). Es sorprendente la fuerte semejanza que existe entre estos modelos y los datos obtenidos para *E. havanense* y otras especies con EMC (*Plantago lanceolata* Por Van Damme 1993, *Thymus vulgaris* Por Tarayre y Thompson 1997).

Lo interesante de los datos obtenidos para el sistema reproductivo de *E. havanensis* en este trabajo, es que parecen indicar que estamos estudiando un comportamiento diferente a los sistemas heterostilicos investigados hasta ahora de una forma clásica. Por ejemplo, a pesar de la corta distancia que existe entre cada una de las poblaciones, el flujo de genes a través de polen y seguramente a través de semillas es

muy restringido. Esto tendría como consecuencia una alta diferenciación genética entre las poblaciones, seguramente debido a las diferencias que existen entre citotipos que producen esterilidad masculina o los alelos restauradores nucleares.

Otra observación interesante se desprende de la interpretación del fenograma construido a partir de las distancias e identidades genéticas de Nei (1973, ver Figura 5). Las dos poblaciones que se encuentran dentro de la estación y en las cuales la esterilidad masculina se asocia al morfo Thrum, se agrupan en un cluster. Lo que nos indica un mayor parecido genético, consecuencia seguramente de una dinámica evolutiva similar a través del intercambio de genes. Al parecer el flujo de genes que existe entre las poblaciones, esta restringido por la distancia geográfica que hay entre ellas.

Todos los resultados en conjunto, muestran que, primero, hay una alta variación genética dentro de las poblaciones, particularmente en las que hay diferencias en la esterilidad del polen entre ambos morfos florales, segundo, hay diferenciación genética entre las poblaciones, podemos concluir que la estructura genética de *E. havanense* es muy diferente a la reportada en otras especies heterostilicas. Esto indica, que estas diferencias están asociadas a los patrones de variación de la esterilidad masculina dentro y entre las poblaciones. Lo que finalmente, podría ser el reflejo de una transición evolutiva para las poblaciones en donde se mantiene la presencia de esterilidad masculina asociada a un morfo, desde un sistema reproductivo heterostilico a uno dioico.

Sin embargo, aún es difícil establecer si el fenómeno evolutivo estudiado se debe a un conflicto de intereses entre los genes nucleares y los mitocondriales. Esto debido a que es una especie con ciclo de vida largo, alcanzando la etapa reproductiva hasta los siete u ocho años de edad (Dominguez 1990). La desventaja que representa esto, es la imposibilidad de tener líneas específicas (con esterilidad, sin esterilidad y con esterilidad parcial), a partir de las cuales se podrían realizar cruzas específicas para conocer como se

hereda la esterilidad masculina a partir de los componentes maternos y paternos que intervienen en la determinación del sexo.

De esta forma, es que resulta muy importante seguir intentando obtener marcadores moleculares que nos permitan establecer estas diferencias. Desafortunadamente en este estudio no fue posible alcanzar este objetivo, pues el genoma de *E. havanense* nunca había sido explorado, cosa que vuelve sumamente complicado encontrar alguna región genómica que nos permita obtener esta información. Además, también hay que mencionar que los resultados obtenidos a partir de marcadores moleculares son difíciles de interpretar ya que solo existen primers para citotipos de esterilidad masculina, pero no para restauradores nucleares. En este caso, no sabríamos si la esterilidad masculina es un proceso remanente entre las poblaciones o se acaba de originar, debido al posible encubrimiento de los genes restauradores nucleares.

Para estudios futuros encaminados a entender la dinámica evolutiva del sistema reproductivo de *E. havanense*, es recomendable probar una cantidad mayor de oligonucleótidos, o quizás explorar esta misma posibilidad, pero dentro del genoma mitocondrial, ya que es más pequeño que el genoma nuclear y está más conservado. Resultaría interesante estudiar la manera en como se está heredando este conflicto intragenómico a nivel inter e intra poblacional y aportar de esta forma, más evidencia de la evolución del dioicismo a partir de la heterostilia a través de un conflicto de intereses núcleo-citoplasmático.

Conclusiones.

- Debido a que el flujo de genes entre las poblaciones disminuye proporcionalmente a la distancia geográfica, existe una alta diferenciación genética entre las poblaciones de *E. havanense*.
- También existe una alta variación genética en todas las poblaciones de *E. havanense*, particularmente en las que la esterilidad masculina está asociada a uno de los morfos florales.
- Las diferencias encontradas en la esterilidad del polen tanto entre morfos, como entre poblaciones, repercuten directamente en la estructura genética de las poblaciones.
- La genética de poblaciones de *E. havanense* es muy diferente a la reportada en otras especies heterostilicas.
- Las diferencias genéticas encontradas en *E. havanense* respecto a otros sistemas reproductivos heterostilicos y la semejanza con especies que presentan EMC, pueden ser el reflejo de una transición evolutiva desde un sistema reproductivo distilico a uno dioico, pero a partir de un mecanismo evolutivo muy similar al propuesto para poblaciones ginodioicas.

Bibliografía.

- Agres, D.R., y Ryan, J.F. 1997. The clonal and population structure of a rare endemic plant, *Wyethia reticulata* (Asteraceae). allozyme and RAPD analysis. *Molecular Ecology*. 6: 761-772.
- Barrett.S.C.H. 1992. Heterostylous genetic polymorphism: Model system for evolutionary analysis *in* Monographs on theoretical and applied genetics. Barrett.S.C.H. springer, Berlin Heidelberg. 270 pp.
- Beach, J.H., Bawa, K.S 1980. Role of pollinators in the evolution of dioecy from distyly. *Evolution* 34: 1138-1143.
- Bonnin, I., Huguet, T., Gherardi, M., Prosperi, J., y Olivieri, I. 1996. High level of polymorphism and spatial structure in selfing plant species, *Medicago truncatula* (Leguminosae), shown using RAPD markers. *American Journal of Botany*. 83: 843-855.
- Brown, A.H.1978. Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. *Theor. Appl. Genet.* 52: 145-157.
- Bucci, G., Vendramin, G.G., Lelli, L., y Vicario, F. 1997. Assessing genetic divergence of *Pinus leucodermis* Ant. endangered population: use of molecular markers for conservation purposes. *Theor. Appl. Genet.* 95: 1138-1146.
- Bullock, S.H. 1986. Climate of Chamela, Jalisco, and trends in the south coastal region of Mexico. *Arch. Met. Geoph. Biocl. Ser. B* 36: 297-316.
- Casper, B.B. 1992. The application of sex allocation theory to heterostylous plants *in* Monographs on theoretical and applied genetics. Barrett S.C.H. springer, Berlin Heidelberg. 270 pp.
- Charlesworth, D., Charlesworth B. 1978 Population genetics of partial male-sterility and the evolution of monoecy and dioecy. *Heredity* 41: 137-153

- Couvet, D., Ronce O , Gliddon C. 1998 The maintenance of nucleocytoplasmic polymorphism in a metapopulation: the case of gynodioecy. *The American Naturalist*. Vol. 152. nº 1
- Couvet, D., Bonnemaïson, F , y Gouyon, P.H 1986 The maintenance of females among hermaphrodites: the importance of nuclear-cytoplasmic interactions. *Heredity* 57. 325-330.
- Cuevas, E. 1999. Patrones de esterilidad masculina entre poblaciones y morfos de *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). Tesis de maestría, Facultad de ciencias, U.N.A.M. México. 43 pp.
- Darnell, J., Lodish, H., y Baltimore, D. 1993. *Biología celular y molecular*. Editorial Omega. Barcelona. 1140 pp.
- Darwin ,C. 1887. *The different forms of the same species*. Jhon Murray, London.
- Dominguez, C., A. 1990. Consecuencias ecológicas y evolutivas del patrón de floración sincrónico y masivo de *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). Tesis de doctorado, Centro de Ecología, U.N.A.M. México. 167 pp.
- Dominguez, C., A. 1995. Genetic conflicts of interest in plants. *TREE*. Vol. 10, nº 1.
- Dominguez, C., A , Ávila, G., Vázquez, S., y Márquez, J. 1997. Morph biased male sterility in the tropical distylous shrub *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). *American Journal of Botany* 85 (5): 626-632.
- Doyle, J.J. y Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- Dulberg, R. 1992. Floral polymorphism and their significance in the heterostylous syndrome *in* *Monographs on theoretical and applied genetics*. Barrett.S.C.H. springer, Berlin Heidelberg. 270 pp

- Erlich, H.A., y Arheim, N. 1992. Genetic analysis using polymerase chain reaction. Annual review of genetics. 26: 479-506.
- Ganders, F.R., Denny, S.K. and Tsai. 1985. Breeding system and genetic variation in *Amsinckia spectabilis* (Boraginaceae). Canadian Journal of Botany. 66:533-538.
- Gigord, L., Lavignes, C., Shykoff, J.A. and Atlan, A. 1998. No evidence for local adaptation between cytoplasmic male sterility and nuclear restorer genes in the gynodioecious species *Thymus vulgaris* L. Heredity 81: 156-163.
- Grosberg, K.R., Levitan, R.D., y Cameron, B.B. 1996. Characterization of genetic structure and genealogies using RAPD-PCR markers: A random primer for the novice and nervous. Molecular Zoology: Advances, strategies, and protocols. 67-100.
- Hamelin, R.C., Beaulieu, J., y Plourde, A. 1995. Genetic diversity in populations of *Cronartium ribicola* in plantations and natural stands of *Pinus strobus*. Theor. Appl. Genet. 91: 1214-1221.
- Hamrick, J.L. y Loveless, M.D. 1986. Isozyme variation in tropical trees: procedures and preliminary results. Biotropica. Vol. 18(3): 201-207.
- Hartl, L.D., y Clark, G.A. 1989. Principles of population genetics. U.S.A. 670 pp.
- Hedrick, P.W. 1983. Genetics and population. Science Books Int. U.S.A.
- Hurst D.L. 1992. Intragenomic conflict as an evolutionary force. Proc R. Soc. Lond. 248: 135-140.
- Kheyr-Pour, A. 1981. Wide nucleo-cytoplasmic polymorphism for male sterility in *Origanum vulgare*. L. Journal of Heredity. 72: 45-51.
- Le Corre, V., Dumolin-Lapegue, S., y Kremer, A. 1997. Genetic variation at allozyme and RAPD loci in sessile oak *Quercus petraea* (Matt.) Lieb. the role of history and geography. Molecular Ecology. 6: 519-525.

- Ledig, T.F. 1986. Heterozygosity, heterosis and fitness in outbreeding plants. *in* M.E. Soulé, de. Conservation Biology. Sinauer Associates Pub. U.S A.
- Lehner N.P. 1996. Handbook of ethological methods. Cambridge University press, Second edition.
- Lewis, L., Jones D.A. 1992. The genetics of heterostyly *in* Monographs on theoretical and applied genetics. Barrett.S.C.H. springer, Berlin Heidelberg. 270 pp.
- Loiselle, B., Sork, V., Nason, J., y Graham, C. 1995. Comparison of genetic variation in bird-dispersed shrub of a tropical wet forest. *Biotropica*. Vol. 27(4): 487-494
- Loiselle, B., Sork, V., Nason, J., y Graham, C. 1995. Spatial genetic structure of a tropical understory shrub *Psychotria officinalis*. *American Journal of Botany*. 82:1420-1425.
- Lott, E.J., Bullock, S.H., y Solís-Magallanes, J.A. 1987. Floristic diversity and structure of upland and arroyo forest in coastal Jalisco. *Biotropica*. 19: 228-235.
- Loveless, M.D. y Hamrick. 1984. Ecological determinant of genetic structure in plant populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15: 65-95.
- Loyd, D.G., Webb C.J., y Dulberg, R. 1990. Heterostyly in species of *Narcissus* (Amarillydaceae), *Hugonia* (Linaceae) and other disputed cases. *Plant. Syst. Evol.* 172: 215-227.
- Loyd, D.G., y Webb, C.J. 1992. The evolution of heterostyly *in* Monographs on theoretical and applied genetics Barrett.S.C.H. springer, Berlin Heidelberg. 270 pp.
- Lynch, M. y Milligan, B.G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*. 3: 91-99.
- Manicacci, D., Couvet, D., Belhassen, E., Gouyon, P.H., y Atlan, A . 1998. Founder effects and sex ratio in the gynodioecious *Thymus vulgaris*. *Molecular Ecology* 5: 63-72.

- Miller, M.A. 1997. Tools for population genetic analysis. Department of Biological Science. Northern Arizona University, Flagstaff, Arizona.
- Nakajima, Y., Yamamoto, T., y Oeda, K. 1997. Genetic variation of mitochondrial and nuclear genomes in carrots revealed by random amplified polymorphic DNA (RAPD) *Euphytica*. 95(3): 259-276.
- Navarro, Q.R. Estructura genética y procesos de especiación de *Agave cecurata* (trcl.) y *Agave subsimplex* (trcl.) en el desierto sonorense a partir de RAPDs. Tesis de licenciatura, Facultad de ciencias, U.N.A.M. México. 78 pp.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70: 3321-3323.
- Ornduff, R. 1988. Distyly and monomorphism in *Villarsia* (Menyanthaceae) some evolutionary considerations. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 75: 1180-1206.
- Otero, M.A., De la Cruz, M., y Oyama, K. 1997. El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. *Bol. Soc. Bot. México.* 60: 85-117
- Otero, M.A. 1998. Variación genética y biología reproductiva de *Chamaedora alternans* mediante el uso de marcadores moleculares (RAPDs) en la selva de "los Tuxtles", Veracruz, México. Tesis de maestría, facultad de ciencias, UNAM.
- Perez-Nasser, N., Equiarte, E., Piñero, D. 1993. Mating system and genetic structure of the distylous tree *Psychotria faxtuscens* (Rubiaceae). *Am. J. Bot.* 80: 45-52.
- Richards, J.H., y Barrett, S.C.H. 1992. The development of heterostyly in *Monographs on theoretical and applied genetics*. Barrett.S.C.H. Springer, Berlin Heidelberg. 270 pp.
- Rowe, L.M., Lee, J.D., Bowditch, M.B., y Masters, A.R. 1997. Genetic variation in North American leafy spurge (*Euphorbia esula*) determined by DNA markers. *Weed Science.* 45: 446-454.
- Rzedowski, J. 1978. *Vegetación de México*. Editorial Limusa México

- Sakai, K.N , y Weller, G S. 1999 Gender and sexual dimorphism in flowering plants A review of terminology, biogeographic patterns, ecological correlates, and phylogenetic approaches. 1-25 pp in Gender and sexual dimorphism in flowering plants. Geber, A.M., Dawson, E.T., y Delph, F.L. (Eds). Springer, Berlin Heidelberg
- Samitou-Leprade P. 1994. Cytoplasmic male sterility in plants: molecular evidence and the nucleocytoplasmic conflict. *Trec* vol 9 n° 11.
- Tarayre, M , Thompson D J. 1997. Population genetic structure of gynodioecious *Thymus vulgaris* (Labiataceae) in southern France. *J. Evol. Biol.* 10:157-174.
- Van Damme, J.M.M 1993. Gynodioecy in *Plantago lanceolata* L. II. Inheritance of male sterility types. *Heredity.* 50: 253-273.
- Vekemans, X., Lefeburec C., Bejalla L., y Meerts P. 1990. The evolution and breakdown of the heteromorphic incompatibility system of *Armeria maritima* revisited. *Evol. trends in plants* Vol 4 (1): 15-23.
- Weir, B.S. y Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38(6): 1358-1370.
- Williams, J.G.C., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., y Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research.* 18: 6531-5535.
- Wright, S. 1978. Evolution and genetics of populations. Vol. 4: Variability within and among natural population. University of Chicago Press, Chicago.

Apéndice 1.

Extracción de ADN (MINI-PREP).

- 1) Moler en un mortero de 1 a 2 g de tejido con nitrógeno líquido.
- 2) Moler en un micromortero una punta de espátula de tejido pulverizado junto con 1 ml de buffer CTAB 2X (Tris Hcl 100 mM pH 8, NaCl 1.4 M, EDTA 20 mM, CTAB 2% y b-ME 0.03%).
- 3) Recuperar todo en un tubo eppendorf de 1.5 ml y centrifugar a 10,000 rpm durante 8 min.
- 4) Eliminar el sobrenadante y resuspender con 600 μ l de buffer CTAB 2X. Incubar en H₂O a 60 °C durante 10 min.
- 5) Agregar a cada tubo 600 μ l de cloroformo:octanol 24:1, agitar hasta homogenizar y centrifugar a 7,000 rpm durante 12-15 min hasta que el sobrenadante quede transparente.
- 6) Transladar el sobrenadante a un tubo nuevo con una pipeta de 200 μ l y precipitar el ADN con 2/3 del volumen final (500 μ l aproximadamente) de isopropanol frío. Dejar reposar de 30 min. a 12 hrs a -20 °C.
- 7) Centrifugar a 10,000 rpm X 5min. Eliminar el sobrenadante.
- 8) El pellet puede limpiarse agregando 1ml de etanol al 70% frío y centrifugado a 10,000 rpm X 5 min.
- 9) Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet con 200 μ l de TE (tris-Hcl 10 mM pH 8, EDTA 1mM).

Apéndice 2.

Gel de agarosa.

- 4.05 g de agarosa.
- 270 ml de TBE 1X.
- 12 microlitros de bromuro de etidio.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Apéndice 3.

Tabla 6. Valores de Fst para cada locus.

Locus	(Theta) P
1	0.0988
2	0.1349
3	0.0815
4	0.1183
5	0.0823
6	0.0360
7	0.0483
8	0.0336
9	0.0914
10	0.0914
11	0.0639
12	0.0914
13	0.0567
14	0.0266
15	0.1070
16	0.1368
17	0.1259
18	0.1964
19	0.1452
20	0.0114
21	0.1237
22	0.1285

23	0.1561
24	0.0504
25	0.0365
26	0.0347
27	0.0347
28	0.0001
29	0.0290
30	0.0380
31	0.0820
32	0.2063
33	0.1849
34	0.1849
35	0.1849
36	0.1969
37	0.0012
38	0.1849
39	0.0181
40	0.1849
41	0.1849

Promedio	0.0953
----------	--------

Intervalo: 0.1141-0.077. S.D. 0.009. 95%.

A partir de todas las frecuencias alélicas se evaluaron los valores de F_{st} para cada locus en todas las poblaciones. El intervalo de confianza para la F_{st} de todas las poblaciones fue de 0.1141-0.077 con una confiabilidad del 95%.

Agradecimientos.

Hay tantas personas y cosas que se han atravesado de una manera tan significativa y hermosa en mi vida, que podría escribir una gran novela agradeciéndoles por el encuentro, sin embargo, en este trabajo todo eso es imposible de mencionar, así es que gracias, gracias a todo eso imposible de mencionar.

En esta mañana de sillas blandas y colores arremolinados bajo el sol, a los primeros que me gustaría agradecerles es a mi familia, Adriana mi hermana, César mi padre y Leticia mi madre por amarme tanto y apoyarme siempre en los momentos difíciles que pase, por permitirme encontrar la huella libre y mágica de mi vida, o más bien, a partir de ella, comprender lo libre y mágico que radica en toda historia de una vida. Yo también los amo.

A Celia Oliver que ha compartido su vida conmigo y que tanto amo, espero siempre seguir creciendo entre sus sueños de mariposa alada. Su compañía le ha dado contentez como yo la llamo, a mi vida, la ha ahondado.

A la Herminio Almendros por esa gran sensibilidad que tuvieron conmigo durante mi educación, lo lograron, formaron un humanista en mí, un niño inmarcesible que como antes y como ahora sigue y seguirá lleno de convicción.

A César Domínguez que me ha apoyado tanto, muchas gracias por impulsar mi desarrollo individual, por enseñarme a interpretar el mundo biológico a través de una sólida formación académica, por esas grandes pláticas acerca de las polémicas contemporáneas en evolución que tanto me apasionan.

Al Dr. Luis Eguiarte y la Dra. Valeria Souza por hacerme parte de su laboratorio durante mi estancia en él, desarrollando la parte experimental de este trabajo, lo disfruté mucho.

A Luis por revisar mi tesis y apoyar mi formación en el área de la genética de

poblaciones como una forma de interpretar fenómenos evolutivos, ha sido una gran enseñanza.

Al Dr. Francisco Molina por siempre estar involucrado en el proyecto y mi formación académica, su ayuda ha sido invaluable.

Al Dr. Mauricio Quesada por revisar mi tesis y los comentarios acerca de mi trabajo. También por todo lo que me ha enseñado en mis estancias en Chamela durante mi trabajo de campo, por los buenos momentos.

Al Dr. Daniel Piñero por revisar tan rápido mi tesis y por todos sus comentarios, corregir los errores que visualizo enriqueció mucho mi trabajo.

A Minerva Martínez por enseñarme la técnica de RAPD's a partir de la que se derivó este trabajo, aprendí muchísimo a su lado, además era muy divertida.

A todos mis compañeros y compañeras del laboratorio Interacción planta animal. Al Dr. Rodolfo Dirzo por ser de un carácter extremadamente abierto y crítico. Particularmente me gustaría agradecerle a Gume por ser una persona tan solidaria conmigo y con todos y a Lalo Cuevas pues me parece que hemos formado una bonita amistad. A Luis Ramírez por las tertulias literarias y las buenas discusiones filosóficas. A Gina y Fernando por ser tan necios. A Raúl Alcalá por ser también una persona muy solidaria y por cantar y tocar la guitarra. A José Luis por ayudarme en mi trabajo de campo. A Lalo Mendoza, Nestor, Armando e Ivan con los cuales no tengo tanto contacto, pero sin embargo cuando les he pedido algo me han ayudado. A todos los estudiantes nuevos.

A mis pocos pero grandes amigos de la facultad de Ciencias Luisa Falcon, Amadeo Estrada y Adán Oliveras por todo lo que hemos compartido juntos, siempre seremos grandes amigos.

A Erik Jerezano mi hermano de toda la vida, Maricarmen Gastelum Y Omar Sailhan por todo lo que representan, me han enseñado tanto, los amo. Al Cangrejo, esa quimera que mira hacia atrás y camina a adelante

Después de compartir todo esto, solo me queda por decir, que compleja es la vida, y que hermoso es que la complejidad despierte de esta manera reflexiva la ensoñación y el *sentimiento*.