

46



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

CAMPUS IZTACALA

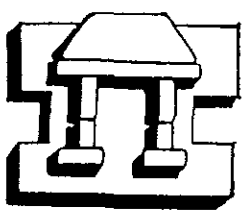
GENETICA DE POBLACIONES DE *Erythroxyllum havanense* (*Erythroxyllaceae*). UNA PLANTA HETEROSTILICA CON ESTERILIDAD MASCULINA ASOCIADA AL MORFO "THRUM".

287409

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGO PRESENTA JOSE LUIS IBARRA MONTOYA

DIRECTOR DE TESIS. CESAR A DOMINGUEZ PEREZ TEJEDA INSTITUTO DE ECOLOGIA UNAM



IZTACALA

MEXICO, D. F.

2000



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
IZTACALA  
JEFATURA DE LA CARRERA DE BIOLOGIA



Los Reyes Iztacala 14 de octubre de 1999

DR. FELIPE TIRADO SEGURA  
DIRECTOR  
PRESENTE.

Atención Lic. América Landa Romero  
Jefa de la Unidad de Administración Escolar

Los abajo firmantes, miembros de la Comisión Dictaminadora del trabajo de  
(X) Tesis de Investigación Tesis de experiencia Profesional ( )

titulado **Genética de poblaciones de *Erythroxyllum havanense* (Erythroxyllaceae). Una planta heterostilica con esterilidad masculina asociada al morfo "Trum"**

Que presenta el alumno de la carrera de Biología: **JOSE LUIS IBARRA MONTOYA**

Con numero de cuenta **9257764-0**

Para obtener el título de Biólogo.

Informan que después de haber revisado cuidadosamente el trabajo, consideramos que reúne las características de calidad académica que se requieren para aspirar a la obtención del título citado, razón por la cual otorgamos nuestros **votos aprobatorios** para la presentación del examen profesional correspondiente

GRADO	NOMBRE	FIRMA	CARGO
Dr	Diego Julio Arenas Arandas		Presidente
Dr	Cesar A. Domínguez Pérez Tejada		Vocal
M en C	José Daniel Tejero Díez		Secretario
M en C	Ramón Victor Moreno Torres		1er Suplente
M en C	Rafael Chávez López		2do suplente

Con base en lo anterior solicito su autorización para que los profesores que otorgan los votos aprobatorios firmen como sinodales del examen profesional en el cargo anotado, y a la Administración Escolar otorgue la fecha para la Réplica Oral del trabajo presentado

Atentamente  
"Por mi raza hablara el espíritu"

M en C. Sergio Vaca Pacheco  
Jefe de la Carrera de Biología

VoBo Dr Felipe Tirado Segura  
Director

**A mis padres Yolanda y José Luis**

Por todo su cariño, apoyo y confianza  
que me dan día tras día.

Los quiero mucho

**A mis hermanos Bibiana, Ivan y Juan**

*Echenle ganas siempre.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A todas las personas que contribuyeron de alguna u otra forma para la realización de éste trabajo.

Agradezco de una manera especial  
al Dr. César Domínguez,  
por su tiempo y paciencia  
durante el desarrollo de ésta tesis.

## INDICE

INTRODUCCION .....	03
Heterostilia	
Evolucion de la heterostilia .....	.06
Esterilidad Masculina Citoplasmatica .....	12
Objetivos .....	14
Historia Natural de <i>Erythroxylum havanense</i> .....	14
Sitio de Estudio .....	15
MATERIALES Y METODOS .....	17
Electroforesis en Gel .....	18
Estimaciones geneticas utilizadas para el analisis de los datos. ....	20
RESULTADOS .....	25
DISCUSION GENERAL .....	30
LITERATURA CITADA .....	37
APENDICE .....	43

## INTRODUCCION

Dentro de las Angiospermas existe una gran gama de sistemas reproductivos tales como la heterostífilia, el ginodioicismo, el androdioicismo y el dioicismo (Richards, 1986). Los sistemas reproductivos tienen un papel crucial en la composición genética de las poblaciones, no sólo determinan las frecuencias genotípicas en las siguientes generaciones sino que también afectan parámetros de la población tales como el tamaño efectivo, la vecindad genética y el flujo de genes (Loveless y Hamrick, 1984).

Conocer los niveles y la distribución de la variación genética es muy importante para determinar el potencial evolutivo de una especie o población. Los patrones de variación genética están fuertemente determinados por los efectos de cinco procesos evolutivos fundamentales: la deriva génica, la migración (flujo génico), los sistemas de apareamiento, la mutación y la selección natural. Por consiguiente, un requisito para entender la biología evolutiva de una especie es el conocimiento de su variación genética (Lewontin, 1974; Endler, 1977; Gottlieb, 1977; Brown, 1979; Slatkin, 1980).

Para conocer la variación genética existente en una población se han propuesto varias técnicas que utilizan marcadores moleculares (Gottlieb, 1977; Brown, 1979; Hamrick *et al.* 1979; Ellstrand, 1984; Crawford, 1985; Soltis y Soltis, 1989). Uno de los marcadores moleculares más usados en los últimos años son las isoenzimas.

Las isoenzimas han sido aplicadas exitosamente para abordar problemas relacionados con los sistemas de reproducción y los patrones de entrecruzamiento, las relaciones entre fenotipo y ambiente, el establecimiento de filogénias, variabilidad y endemismos, diversidad en plantas clonales y apomícticas, interacciones planta-insecto, relaciones entre morfología o citología y polimorfismo en una amplia variedad de taxa silvestres y cultivados (Nevo, 1978; Brown y Moran, 1981; Hamrick, 1982; Hedrick, 1983; Nei, 1987).

Actualmente son ya muy numerosos los estudios que se han hecho en plantas y animales sobre los niveles de variación genética. Tales estudios involucran el uso de la electroforesis para obtener índices de variación genética. Estos índices generalmente son cuantificados en términos del porcentaje de loci polimórficos por población, el número efectivo de alelos por locus y la proporción promedio de loci heterocigotos por individuo (Crow y Kimiura, 1970; Hedrick, 1983; Futuyma, 1986; Hamrick y Loveless, 1986; Nei, 1987)

Utilizando estos estimadores se ha encontrado que las plantas de vida larga, de amplia distribución, localmente abundantes y de estados sucesionales tardíos, presentan altos niveles de variación genética, en comparación con aquellas plantas que no presentan alguna o ninguna de esas características (Ledig 1986, Hamrick *et al.*, 1992; Loveless, 1992)

Los índices frecuentemente usados para medir la variación genética son básicamente dos: la proporción de loci polimórficos (P) que nos indica que proporción de todos los loci son polimórficos, y la heterocigosis promedio (H) que es la proporción de heterocigotos de todos los loci de una cierta población. El polimorfismo se refiere a la ocurrencia de diferentes formas genéticas en una misma población y la heterocigosis se refiere a la proporción de genotipos diploides compuestos por dos diferentes alelos (Nevo, 1978; Brown y Moran, 1981, Hedrick, 1983)

Los estudios de variación genética involucran dos aspectos principalmente. El primero se refiere a la descripción de los niveles de variación que hay dentro de las poblaciones. El segundo concierne a la manera en cómo está repartida la variación entre las poblaciones y tiene particular importancia para la conservación de recursos genéticos (Franklin, 1980; Frankel y Souté, 1981; Clegg y Brown, 1983) El conocimiento de la distribución de la variación genética ofrece información complementaria para el entendimiento de las interacciones entre las características ecológicas y de historia de vida, tales como mecanismos de polinización, dispersión de semillas y fecundidad, y de cómo estas interacciones moldean la estructura genética de las poblaciones.



Los estudios de la variación genética en poblaciones vegetales han revelado que ésta no se distribuye al azar y que los niveles y estructura de esta variación son afectados por el sistema de apareamiento, el flujo génico y la selección ( Howe *eT al.*, 1985, Hamrick y Loveless, 1986; Hamrick, 1990; Hamrick *eT al.*, 1992 y Loveless, 1992) De los estudios realizados en plantas se ha observado que los niveles de variación genética son mayores en especies tropicales que en especies templadas y que gran parte de esta variación se presenta a nivel intrapoblacional (Loveless, 1992)

Para entender el desarrollo de la estructura genética de una población es de particular importancia la evaluación del sistema de apareamiento y de los patrones de movimiento del polen y semillas. El sistema de apareamiento está dado por los patrones de parentesco dentro de una población que determinan la composición genotípica de la progenie, mientras que la distancia de dispersión (polen y semillas) determina la escala espacial a la cual éstas partes del ciclo de vida tienen influencia sobre la estructura genética (Nason *eT al.* 1997)

Es por esto que los sistemas de apareamiento y el movimiento de genes se consideran los factores más importantes en la determinación de la estructura genética ( Layton y Ganders, 1984; Loveless y Hamrick, 1984, Clegg y Epperson, 1985, Howe *eT al.*, 1985; Hamrick *eT al.*, 1992, Loveless, 1992 y Nason *eT al.*, 1997).

Dentro de los sistemas de apareamiento existen plantas que cuentan con un sistema de incompatibilidad como en el caso de las especies heterostilicas, las cuales presentan un polimorfismo controlado genéticamente que está asociado a un sistema de auto-incompatibilidad esporofítico. Esta característica favorece la fecundación cruzada (Ganders, 1979) El sistema de incompatibilidad en las plantas heterostilicas es fácilmente identificado, principalmente por las diferencias morfológicas que presentan

## HETEROSTILIA

### Evolución de la heterostilia

La heterostilia es un sistema reproductivo en el que diferentes individuos de una misma población producen flores hemafroditas que difieren en las longitudes relativas de sus estilos y estambres, favoreciendo así el cruzamiento entre los diferentes tipos de flor ( Darwin, 1877, Ganders. 1979a y b; Lloyd y Webb 1992) Este polimorfismo está controlado genéticamente, y generalmente se asocia a un sistema de auto-incompatibilidad, por lo que la fertilización se lleva a cabo sólo entre individuos de morfo diferente (Frankel y Galun, 1977; Nettancourt, 1977; Ganders, 1979).

Hay dos tipos de heterostilia: distilia y tristilia. Las especies distílicas son aquellas que presentan individuos con dos morfos. El morfo Pin produce flores con estilo largo y estambres cortos, el morfo Thrum produce flores con estilo corto y estambres largos ( los términos "Pin" y "Thrum" fueron introducidos por Darwin (1877) para distinguir a las flores distílicas; ( Figura 1).

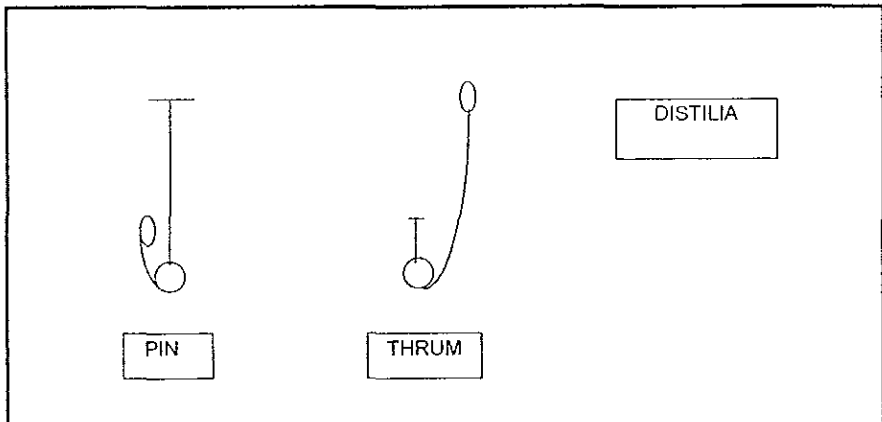


Figura 1. Esquema de las flores distílicas. Los términos "Pin" para flores con estilo largo y estambre corto y "Thrum" estilo corto y estambre largo

Genéticamente la distilia está controlada por un supergene que segrega mendelianamente, por lo que se comporta como un locus con dos alelos S y s (Ganders 1979a, Lewis, 1979) En la mayoría de las especies, las plantas con flores de estilo corto (Thrum) tienen el genotipo Ss, y las de estilo largo (Pin) presentan el genotipo recesivo ss. Esta generalidad es en sí un hecho que merece atención, pues la heterostilia ha surgido varias veces de manera independiente en las angiospermas (Ganders, 1979a; Wyatt, 1983).

Se puede considerar que la heterostilia es un sistema de reproducción raro pues sólo se presenta en veinticinco familias de angiospermas, tanto de monocotiledóneas como de dicotiledóneas (Ganders, 1979a; Lloyd y Webb, 1992). Este sistema reproductivo no se presenta en las subclases más primitivas pero tampoco en las familias altamente especializadas (Cronquist, 1981, Ganders, 1979a). Ya que las familias donde se encuentra no forman un grupo emparentado, se considera que la heterostilia es un sistema reproductivo de origen polifilético (Ganders, 1979a).

La mayoría de las especies heterostílicas son autoincompatibles. En algunas especies el nivel de incompatibilidad difiere entre los morfos (Ganders, 1979a) o entre poblaciones de la misma especie (Barret *et al* , 1989; Sobrevilla *et al* 1983). En las especies distílicas, los individuos Thrum suelen ser más autoincompatibles que los Pin (Bir Bahadur, 1970; Ornduff, 1966, 1971, Darwin, 1877) pero hay casos en los que el patrón se invierte (*Psychotria faxlucens*, Pérez, 1990 ). Sin embargo en la mayoría de los casos reportados la incompatibilidad es total.

A pesar de ser un sistema reproductivo polifilético, existen convergencias que sugieren que ciertos caracteres son importantes para su funcionamiento; y que además están coadaptados. Por lo tanto es probable que la selección natural haya jugado un papel importante en su evolución.

Las similitudes que presentan las plantas heterostilicas sugieren evolución convergente en respuesta a presiones selectivas similares (Ganders, 1979 Lloyd y Webb, 1992) Existen al menos dos hipótesis que explican el origen de este sistema de reproducción (Figura 2). En la primera hipótesis se considera que el establecimiento de un sistema de incompatibilidad es el primer paso evolutivo que después es reforzado por la evolución del polimorfismo morfológico (Lewis, 1979) Esta propuesta requiere de una etapa ginodioica funcional (Ganders, 1979a) Una dificultad de esta hipótesis es que la evolución de un sistema de incompatibilidad esporofítico restringe la posibilidad de los individuos de reproducirse con la mitad de la población, un evento raro de ocurrir por selección natural La segunda hipótesis propone como primer paso la evolución del heteromorfismo seguida de la adquisición del sistema de incompatibilidad (Lloyd, 1987) La evolución del heteromorfismo se da por la eficiencia en la polinización cruzada la cual posteriormente provoca una depresión en el sistema reproductivo; es decir, que cada uno de los morfos florales funcionen como machos y hembras dando como resultado una reproducción diferencial. Posteriormente se genera un sistema de incompatibilidad el cual es reforzado por la evolución del polimorfismo morfológico (Lloyd y Webb, 1990). Esta secuencia es mas factible porque no tiene la dificultad de la hipótesis anterior; ya que al producirse la depresión del sistema reproductivo (causada por la polinización cruzada), da como resultado una reproducción diferencial probablemente debida a que los polinizadores tengan preferencia por algún tipo de flor

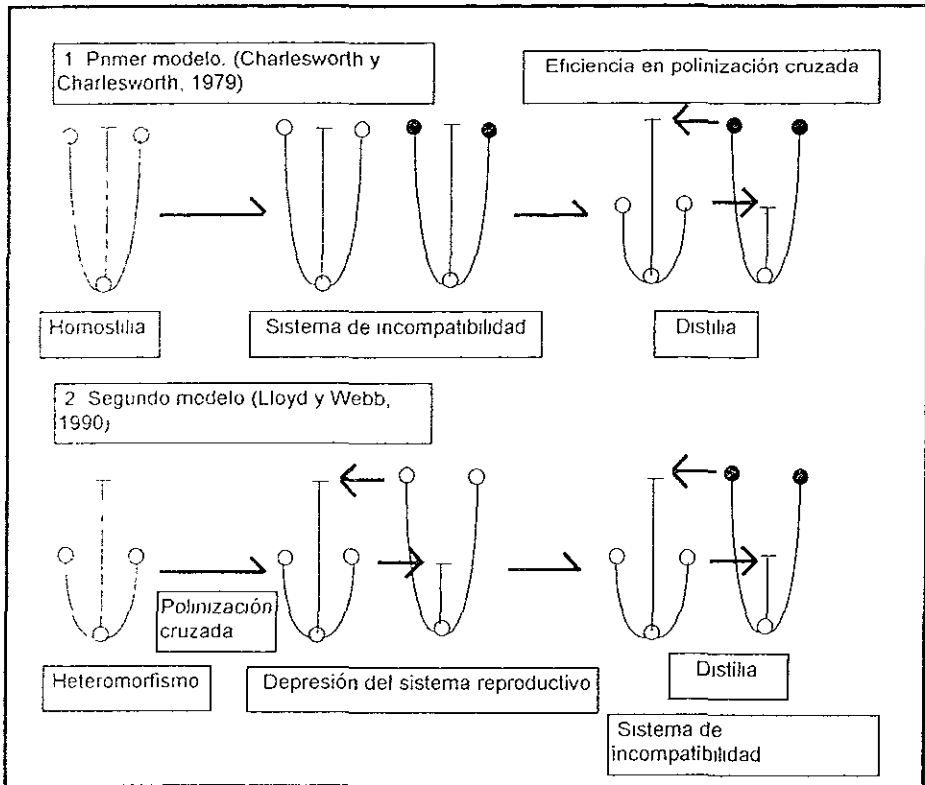


Figura 2 Hipótesis que explican el origen del sistema heterostílico a partir de las plantas hermafroditas

Por otro lado Darwin (1859, 1877) propuso que la diecia había evolucionado a partir de la distilia en varios grupos. Varios autores han aportado evidencias que favorecen esta idea (ver citas en Wyatt 1983). Se piensa que los polinizadores son un factor que podría desestabilizar un sistema heterostílico y favorecer su evolución hacia la diecia (Bawa, 1980). Esto puede ocurrir cuando haya escasez de los mismos o bien por que estos tengan preferencias hacia algún morfo en particular (Wyatt, 1986, Casper, 1992).

La diversidad de polinizadores asociada a las especies heterostílicas es grande, aunque casi restringida a insectos abejas, moscas, esfingidos, mariposas y escarabajos, sobre todo en especies que pertenecen a la familia Rubiaceae. También hay reportes de polinización por colibríes en especies heterostílicas (Ganders, 1979a, Coello *eT al.*, 1986; Sobrevilla *eT al.*, 1983).

Es indudable que los polinizadores han jugado un papel clave en la dinámica evolutiva de la heterostilia (Baker, 1986)

Sin embargo, la distilia no es el único camino por donde pudo haber surgido la diecia. Pudo haber sido a través de la ginodiecia, androdiecia o la monoecia, pero su origen último en cualquier caso tuvo que ser un sistema hermafrodita (Bawa y Beach 1981; Wyatt 1986; Casper, 1992).

Esta transición implica la especialización de las funciones sexuales entre los morfos florales. A nivel morfológico, en la mayoría de los ejemplos que se tienen sobre la transición de distilia a diecia, los individuos Pin se han vuelto pistilados y los Thrum, estaminados (Wyatt 1983). Se ha sugerido que la preponderancia de las plantas Thrum para adoptar la función masculina se debe a que el morfo Thrum es heterogamético (Ss), igual que las plantas masculinas (XY) en algunos sistemas dioicos (Meagher 1988; Wyatt 1983). No obstante, esto no es un obstáculo para que pueda ocurrir que las plantas heterogaméticas evolucionen a femeninas. Existen muchas especies animales (como las aves) con determinación cromosómica del sexo en los cuales los machos son homogaméticos y las hembras heterogaméticas.

Barrett (1990), realizó una extensa revisión sobre la evolución de sistemas reproductivos en plantas heterostilicas, y ahí él concluye que los cambios en los sistemas reproductivos de las plantas ocurren rápidamente en respuesta a alteraciones genéticas relativamente simples pero con profundos efectos en los patrones de apareamiento, lo cual puede tener consecuencias evolutivas y ecológicas muy importantes. En *Turnera ulmifolia* la compleja recombinación del supergene de la distilia que está asociado con la poliploidía, permiten un cambio grande en el sistema de apareamiento que produce aislamiento reproductivo en un solo paso mutacional (Barrett *et al.*, 1987). Por otro lado, en *Eichhornia paniculata* el rompimiento de la heterostilia involucra varios pasos, con cambios en el sistema de apareamiento, pasando de la condición de fecundación cruzada a la autofertilización (Barrett *et al.*, 1989). Estos son algunos ejemplos de estas alteraciones genéticas.

Es pues la heterostilia un sistema reproductivo que por sus características (*diferencia de las longitudes relativas entre antera y estigma*, el polimorfismo morfológico, la asociación de un sistema de autoincompatibilidad esporofítico y su aparente estado de transición entre el hermafroditismo y el dioicismo) ofrece buenas oportunidades para contrastar la estructura genética de la población con el sistema de apareamiento

En este estudio se determinarán los niveles de variación y la estructura genética de siete poblaciones de una especie heterostilica de la zona de Chamela, Jalisco, México. Esta especie es *Erythroxyllum havanense* Jacq. (Erythroxyllaceae)

*Erythroxyllum havanense* ha sido estudiado desde 1987 por Domínguez (1990), Gryj (1990), Avila (1995), Domínguez y Dirzo (1994, 1995a), Vázquez-Santana (1996), Domínguez *eT al.*, (1997). Se conoce que la proporción entre los morfos Pin/Thrum en la región de Chamela, Jalisco es 1:1 y se ha mantenido sin cambios desde 1987. Las cruces entre individuos del mismo morfo no producen frutos debido a la presencia de un sistema de autoincompatibilidad esporofítico. Por esta razón depende por completo de vectores externos del polen. Sus principales polinizadores son abejas sociales, en particular *Scaptotrigona helwegeri*. La fecundidad de los morfos (medida como el cociente del número de frutos sobre el número de flores por individuo) es casi dos veces mayor para el morfo Thrum, y se ha mantenido así a través de los años. Este resultado no se debe al flujo de polen asimétrico, ya que esta diferencia se mantiene aún bajo un régimen de polinización artificial. La menor fecundidad del morfo Pin se debe a la esterilidad parcial del polen del morfo Thrum. Esta conclusión está avalada por estudios de la viabilidad del polen *in vitro*, así como por un detallado estudio embriológico de los dos morfos florales (Domínguez, 1990, Domínguez y Dirzo, 1995; Vázquez-Santana 1996; Domínguez *eT al.*, 1997). En conjunto, estos resultados sugieren la presencia de un sistema de Esterilidad Masculina Citoplasmática (EMC) asociado al morfo Thrum

Este hallazgo es importante, por que sugiere un nuevo mecanismo que puede causar la disolución evolutiva de la heterostilia.

## ESTERILIDAD MASCULINA CITOPLASMÁTICA

La Esterilidad Masculina Citoplasmática (EMC) es el resultado de un conflicto de intereses entre los genes de los organelos y los del núcleo (Dominguez 1995). En el caso de las plantas con flores, los genes nucleares se heredan a través del polen y de los óvulos, mientras que en general los genes de los organelos se transmiten únicamente por vía materna. Esta asimetría en los patrones de herencia genera un conflicto de intereses entre las diferentes entidades del genoma, por lo que la selección natural favorecerá a un alelo citoplasmático que provoque esterilidad masculina; ya que de esta manera incrementará el número de copias de él mismo que estén presentes en la siguiente generación (Cosmides y Tooby, 1981; Frank, 1989, Maurice *eT al.*, 1993; Saumitou-Laprade *eT al.*, 1994, Dominguez, 1995).

La evolución de genes mitocondriales que suprimen la función masculina solo sería favorecida por la selección natural si está acompañada por un *incremento en el éxito reproductivo obtenido por vía femenina*. Este alelo incrementaría su frecuencia hasta que se alcanzara el equilibrio citoplasmático, es decir, una proporción de individuos hermafroditas y hembras (estériles para la función macho) determinada por la selección dependiente de la frecuencia (Dominguez, 1995). El equilibrio citoplasmático es inestable, ya que la introducción (por mutación o migración) de nuevas variantes alélicas nucleares que restauran la fertilidad masculina, reduciría a cero la frecuencia de individuos estériles. Este proceso se repetiría con la introducción de nuevos genes mitocondriales, que producen esterilidad masculina, y para los cuales no existen aún las variantes alélicas nucleares que restauran su fertilidad (Frank, 1989).

Estas ideas han sido formalizadas en modelos genéticos y matemáticos que consideran la evolución de la EMC como el resultado de la interacción coevolutiva entre los genes del citoplasma y los del núcleo (Saumitou-Laprade *eT al.*, 1994).



A partir de estos modelos se ha determinado que los parámetros relevantes para la evolución de la EMC son: la diferenciación genética entre poblaciones, el nivel de endogamia, la vecindad genética y el tamaño efectivo de las poblaciones, la tasa de entrecruzamiento y el flujo de polen, el número de loci citoplasmáticos y nucleares, y el éxito reproductivo de cada morfo por ambas vías sexuales.

Dentro de los estudios realizados sobre la biología reproductiva de *Erythroxylum havanense* se han detectado diferencias en la producción de semillas entre los individuos Pin y Thrum ahora se sabe que estas diferencias no son producidas por la asimetría en el flujo de polen, ya que éste patrón se mantiene aún bajo un régimen de polinización artificial, sino que se debe a la esterilidad parcial del polen del morfo Thrum. La presencia de la EMC es sin duda un hecho que merece atención, ya que ninguna de las 140 especies de plantas que presentan EMC es heterostilica (Laser y Lersten, 1972). Sin embargo no existe alguna razón teórica para que se de la evolución de la esterilidad masculina en éstas especies.

Es nuevamente importante realizar un estudio de estructura genética de las poblaciones en *E. havanense* para conocer los parámetros que han sido determinados a partir de los modelos teóricos de la evolución de la EMC mencionados anteriormente. Estos parámetros podrán ser contrastados y discutidos con los resultados obtenidos de los datos de la esterilidad masculina asociada al morfo Thrum (medida como la producción y germinación de polen en ambos morfos ( Cueva E., 1999 )

Por otro lado el conocimiento de los niveles de endogamia y del flujo genético nos ayudarán a determinar la magnitud de la vecindad genética y el tamaño efectivo de las poblaciones, ya que estos son parámetros cruciales en los modelos de la evolución de la heterostilia (Frank, 1989, Eguiarte, 1990; Lloyd y Webb, 1992).

## OBJETIVOS

1) Estudiar la variación genética de *Erythroxylum havanense* en siete poblaciones localizadas en la estación de Biología de Chamela y sus alrededores 2) Describir e interpretar la estructura genética de las poblaciones por medio de los estadísticos F de Wright (1951-1965): 3) Estimar los niveles de endogamia y el flujo génico dentro y entre poblaciones 4) Discutir la posible relación entre los resultados de la genética de poblaciones y la esterilidad masculina citoplasmática, como un nuevo mecanismo que puede causar la *disolución evolutiva de la heterostilia*

Para lograr los objetivos fue necesario montar un sistema de loci polimórficos enzimáticos para *Erythroxylum havanense*.

## HISTORIA NATURAL DE *Erythroxylum havanense*

La familia Erythroxylaceae es pantropical y consiste de cuatro géneros y cerca de 200 especies especialmente abundantes en América (Cronquist, 1981) La mayor parte de ellas pertenece al género *Erythroxylum*.

En Norteamérica sólo está presente el género *Erythroxylum* (Britton 1907) que en México cuenta con siete especies (Standley 1923). Se les encuentra principalmente en bosques tropicales (caducifolios, subcaducifolios y perennifolios) y también en matorrales xerófilos. La mayoría de las especies de este género son distílicas lo que parece ser una condición ancestral (Lloyd y Webb, 1992).

*Erythroxylum havanense* Jacq. es un arbusto perenne, caducifolio, hermafrodita y distílico. La distribución geográfica de esta especie es amplia. En el Herbario Nacional (MEXU) existen ejemplares de Cuba, Nicaragua, Costa Rica, Honduras y Panamá. En México es abundante en la zona de Chamela, Jalisco, aunque se le ha colectado en los estados de Sinaloa, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Yucatán e Hidalgo. En Chamela *Erythroxylum havanense* se encuentra distribuido de manera agregada (en 'parches', Domínguez, 1990, Gryj, 1990).

Sus flores están agrupadas en fascículos de no más de 10 flores, pierde las hojas durante la temporada de sequía (diciembre-mayo) Su crecimiento y reproducción se restringen a los meses de la época de lluvias de cada año En Chamela la altura máxima que alcanza esta especie es de 3 metros. y el área basal promedio es de  $5.17\text{cm}^2$  (n=90) (Dominguez 1990)

La floración de este arbusto es masiva y sincrónica y ocurre entre seis y quince días después de que empiezan las lluvias (Dominguez, 1990) En promedio cada individuo presenta flores durante casi tres días

Los visitantes más importantes son abejas meliponinas (Apidae), dentro de las cuales la especie *Scaptotrigona hellwegeri* (Ayala, 1988) es la más frecuente Por esto y por su tamaño podrían ser polinizadores muy eficientes (Dominguez, 1990)

La frecuencia con la que se presentan las *Xilocopa* (Anthophoridae) es menor, pero por su gran movilidad podrían jugar un papel importante en el flujo de polen entre parches (Dominguez, 1990) De acuerdo con lo esperado para una planta heterostilica, en *E. havanense* solamente las cruza entre individuos de distinto morfo producen semillas (Dominguez, 1990).

Los frutos maduros son drupas de color rojo intenso, ovoides, de aproximadamente 1cm de largo. Sus características se ajustan al síndrome de ornitocoria, aunque los registros directos de aves dispersoras son escasos (Gryj, 1990)

## SITIO DE ESTUDIO

El estudio se realizó en la estación de Biología Chamela del Instituto de Biología (IB-de la UNAM.  $19^{\circ}30' \text{ N}$ ,  $105^{\circ}03' \text{ W}$ ), localizada a 5 Km al sur del poblado de Chamela, Jalisco; México (Figura 3) Se encuentra a menos de 2 Km de la costa del Pacífico en el Km 59 de la carretera federal número 200 (Barra de Navidad-Puerto Vallarta), en el municipio de la Huerta, estado de Jalisco



Figura 3. Localización de las poblaciones estudiadas.

La región se caracteriza por su topografía irregular con lomeríos que van de 20 a 200 m s n m. Estos lomeríos conforman un sistema de numerosas y pequeñas cuencas en cuyo cause principal predomina un substrato pedregoso. Las laderas tienen pendientes convexas con inclinaciones a veces del 100% (Mass y García-Oliva, 1990).

De acuerdo con Lott (1985) y siguiendo la clasificación de Miranda y Hernández-X (1963) existen dos tipos de vegetación principales en la zona. La selva baja caducifolia, localizada en las pendientes y cimas de los lomeríos, y la selva mediana subcaducifolia, ubicada en las partes de las laderas y orillas de los arroyos.

El clima de la zona se encuentra entre los más secos de los cálidos-húmedos. En el sistema de clasificación climática de Köppen, la zona geográfica de Chamela pertenece al tipo AwQ(x'). De acuerdo con el sistema modificado de García (1988) el clima se caracteriza con una estación seca en invierno y lluvias en verano. La temperatura promedio anual es de 24.9°C.

La precipitación promedio anual es de 748mm con valores que van de 585 a 961mm. La época de secas abarca los meses de noviembre a junio, mientras que el 80% de las lluvias se concentra entre julio y octubre (Bullock, 1986).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron 345 individuos al azar de *Erythroxylum havanense* en siete poblaciones localizadas en la Estación de Biología (4), una más al norte y dos al sur de la misma (Tabla 1; Fig 3). Se colectaron al azar hojas jóvenes de todos los individuos (aproximadamente 10 hojas por cada individuo) y se guardaron en bolsas de plástico debidamente etiquetadas. Cada bolsa fue cubierta con hielo hasta colectar todas las muestras de una población. Las muestras fueron almacenadas en un tanque con nitrógeno líquido para ser transportadas a la ciudad de México, para luego guardarse en un ultracongelador (REVCO Scientific, Inc modelo ULT1490-5-D14) hasta su uso en el Laboratorio (ver apéndice para más detalle).

La región se caracteriza por su topografía irregular con lomeríos que van de 20 a 200 m s.n.m.m. Estos lomeríos conforman un sistema de numerosas y pequeñas cuencas en cuyo cause principal predomina un substrato pedregoso. Las laderas tienen pendientes convexas con inclinaciones a veces del 100% (Mass y García-Oliva, 1990)

De acuerdo con Lott (1985) y siguiendo la clasificación de Miranda y Hernández-X (1963) existen dos tipos de vegetación principales en la zona. La selva baja caducifolia, localizada en las pendientes y cimas de los lomeríos, y la selva mediana subcaducifolia, ubicada en las partes de las laderas y orillas de los arroyos

El clima de la zona se encuentra entre los más secos de los cálidos-húmedos. En el sistema de clasificación climática de Köppen, la zona geográfica de Chamela pertenece al tipo AwO(x`j). De acuerdo con el sistema modificado de García (1988) el clima se caracteriza con una estación seca en invierno y lluvias en verano. La temperatura promedio anual es de 24.9°C

La precipitación promedio anual es de 748mm con valores que van de 585 a 961mm. La época de secas abarca los meses de noviembre a junio, mientras que el 80% de las lluvias se concentra entre julio y octubre (Bullock, 1986)

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron 345 individuos al azar de *Erythroxylum havanense* en siete poblaciones localizadas en la Estación de Biología (4), una más al norte y dos al sur de la misma (Tabla 1; Fig 3). Se colectaron al azar hojas jóvenes de todos los individuos (aproximadamente 10 hojas por cada individuo) y se guardaron en bolsas de plástico debidamente etiquetadas. Cada bolsa fue cubierta con hielo hasta coleccionar todas las muestras de una población. Las muestras fueron almacenadas en un tanque con nitrógeno líquido para ser transportadas a la ciudad de México, para luego guardarse en un ultracongelador (REVCO Scientific, Inc modelo ULT1490-5-D14) hasta su uso en el Laboratorio (ver apéndice para más detalle)

Tabla 1 Localización y número de individuos examinados de cada una de las siete poblaciones de *Erythroxylum havanense* de la región de Chamela

Población	Localización	Número de individuos
* Antiguo Sur	Lat. 19° 29' 951'', Long 105° 02' 669''	45
* Eje Central	Lat 19° 29' 951'', Long 105° 02' 669''	40
* Tejón	Lat 19° 29' 951'', Long 105° 02' 669''	45
* Ardilla	Lat 19° 29' 951'', Long. 105° 02' 669''	80
Cuitzmala	Lat 19° 25' 518'', Long 104° 58' 837''	45
Ranchitos	Lat 19° 35' 347'', Long 105° 01' 635''	45
Limoncote	Lat 19° 31' 45'', Long 104° 56' 13''	45
* Poblaciones localizadas dentro de la Estación de Biología		

## ELECTROFORESIS EN GEL

Para el análisis genético de las poblaciones de *Erythroxylum havanense* se usó la técnica de electroforesis horizontal en geles de almidón de papa hidrolizado al 12% v/w (Murphy *et al.*, 1990). Las muestras de tejido de cada individuo fueron maceradas en un mortero añadiendo el buffer de extracción usado para *Abies* (Modificado de Mitton, 1981), el cual fue seleccionado después de probar tres diferentes buffers (Tabla 2).

Las electroforesis se realizaron usando cinco sistemas de corrimiento diferentes, que fueron los que dieron mejor resolución en el mayor número de enzimas (Tabla 3).

Solo se utilizaron las enzimas con una buena actividad y cuyo patrón de bandeo fuera interpretable en términos genéticos.

Para las pruebas de expresión enzimática y el efecto de diferentes buffers de extracción se trabajó con las hojas de 20 individuos. El método experimental que se utilizó para determinar el mejor buffer de extracción fué meramente empírico. En cada gel se probó la actividad de varias enzimas buscando la mejor combinación de buffer de extracción y de buffer de corrimiento. Finalmente se utilizaron 5 diferentes sistemas de buffer. Poulik, Sistema 7, Sistema 2, Sistema R y Mitton (Mitton, 1983)

Tabla 2 Pruebas de buffers de extracción para las enzimas que se probaron

Buffer de extracción	Mangle	Abies	Wendell
Enzima			
RUB	XX	XXX	XX
MNR	X	XX	X
SDH	X	XXX	X
NADPHDH	X	XX	X
APX	XX	XXX	XX
ADH	X	XXX	X
AcPH	X	XX	X
EST	NO	XX	X
GOT	NO	XXX	NO
PGI	X	XX	NO
LAP	XX	XXX	X
PGM	NO	X	NO
IDH	NO	XX	X

Estos resultados son un promedio de los tres buffers de corrimiento utilizados (Poulik, Milton y Sistema 7). (X= malo, XX= regular, XXX= excelente)

Tabla 3 Sistemas de buffer de corrimiento y enzimas ensayadas

Sistema de corrimiento	Enzimas
Poulik	APX, ME, LAP, PGI
Sistema 7	RUB, MNR, SDH, NADPHDH, APX, ADH, AcPH, EST, GOT, PGI, LAP, PGM
Milton	AcPH, MNR, EST, NADPHDH, SDH, IDH, MDH
Sistema 2	GOT, ADH, PGI, APX, SDH, MNR
Sistema R	PGI, APX, MNR, ADH, NADPHDH, AcPH

De los cinco sistemas de buffer de corrimiento, tres resultaron ser los mejores (Tabla 4). De un total de 35 enzimas ensayadas, catorce tuvieron buena resolución en sus patrones de bandeo generando un total de 31 loci que se usaron para estimar la variación genética de todas las poblaciones. Catorce enzimas y un total de 31 loci, fueron leídos para cada individuo de cada población, veinticinco de los cuales fueron polimórficos (Tabla 4).



Las enzimas fueron: Peroxidasa anódica (**APX**), Phosphoglucosomerasa (**PGI**), Enzima málica (**ME**), Leucina aminopeptidasa (**LAP**) Fosfatasa ácida (**AcPH**), Menadión reductasa (**MNR**), Malato deshidrogenasa (**MDH**), Esterasa (**EST**), Nicotinamida anenina dinucleotido fosfato deshidrogenasa (**NADPHDH**), Hexokinasa (**HEX**), Sorbitol deshidrogenasa (**SDH**), Lactato deshidrogenasa (**LDH**), Superoxidasa anódica (**SOD**), Alcohol deshidrogenasa (**ADH**).

Tabla 4 Enzimas y buffers de cornmento que se utilizaron para analizar la estructura genética de las siete poblaciones de *Erythroxyllum havanense* en Chamela, Jalisco.

SISTEMA POULIK		
ENZIMAS	VARIACION	N LOCI
LAP	M	1
PGI	P	3
ME	P	2
APX	P	4
SISTEMA 7		
SOD	P	2
HEX	P	1
ADH	P	3
SDH	P	2
LDH	P	1
SISTEMA MITTON		
AcPH P	P	3
EST	P	3
NADPHDH	P	2
MNR	P	2
MDH	P	2

Variación (P=Polimórfica, M= Monomórfica).

### **Estimaciones Genéticas utilizadas para el análisis de los datos.**

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

1. La proporción de loci polimórficos (P): Se calcula dividiendo el número de loci polimórficos encontrados entre el número de loci analizados. Este índice toma valores entre 0 y 1. Si vale 0 no existe variación genética; si es 1 todos los genes analizados son polimórficos. Es decir, todos los genes tienen dos o más formas alternativas o alelos. Las limitaciones de este índice son: es sensible al número y tipo de enzimas analizadas (Nevo 1978), depende del criterio del polimorfismo establecido (lo cual dificulta las comparaciones entre estudios) (Hedrick 1983), no considera las frecuencias alélicas dentro de cada locus

2 La heterocigosis esperada o la proporción estimada de genes que se espera sean heterocigos en una población en donde los apareamientos son al azar. Es decir la heterocigosis esperada de acuerdo a la Ley de Hardy-Weinberg ( $H$ ). Para un locus dado con  $i$  alelos la heterocigosis esperada es igual a  $1 - \sum (p_i)^2$ , donde  $p_i$  es la frecuencia de cada alelo. Cuando no hay variación en ninguno de los loci éste índice es igual a cero. Cuando todos los loci son polimórficos, con un número infinito de alelos, con frecuencias alélicas iguales dentro de cada locus, la  $H$  es igual a 1. Por ejemplo, si sólo se tienen dos alelos por locus su valor máximo es de 0.5 si todos los genes son polimórficos y las frecuencias de los dos alelos son iguales ( $p=q=0.5$ ). La varianza muestral de éste índice es sensible al tamaño muestral (Brown y Weir 1983), pero es más robusto al tipo y número de enzimas consideradas para su estimación. Este índice puede estimarse utilizando todos los loci montados o solamente aquellos que resultaron polimórficos. Al considerar todos los loci (los monomórficos y polimórficos) se da una idea más real de la variación enzimática promedio de una población.

3 El número de alelos por locus ( $A$  ó  $n$ ), y el número de alelos efectivos ( $A_p$  ó  $E_n$ ) por locus. Un promedio de estos dos valores para todos los loci montados también es un buen estimador de la variación genética en una población. "A" se calcula promediando el número de alelos por locus. El número de alelos efectivos es el número de alelos igualmente frecuentes que se necesitarían en una población ideal para producir el mismo nivel de homocigosis que en la población real, y para  $i$  alelos en un locus se calcula como:  $1/\sum P_i^2$ ; donde  $P_i$  es la frecuencia del alelo  $i$  en un locus (Hartl y Clark 1989).

Para cada isoenzima o locus, las frecuencias genotípicas se calculan dividiendo el número de individuos de cada uno de los genotipos entre el total de individuos en la población. A partir de estos datos se calculan las frecuencias alélicas. Para el caso de un locus con dos alelos:

$$p = D + \frac{1}{2} (H)$$

$$q = R + \frac{1}{2} (H)$$

donde  $p$  y  $q$  corresponden a las frecuencias alélicas,  $D$  y  $R$  a las frecuencias de los homocigos, y  $H$  a la de los heterocigos

El estudio de las posibles fuerzas evolutivas que han moldeado la estructura genética de una población podría abordarse a través de la comparación de las frecuencias génicas y genotípicas de una población natural con aquellas esperadas en el equilibrio de Hardy-Weinberg.

La ley de Hardy-Weinberg (H-W) plantea que en ausencia de fuerzas evolutivas las frecuencias génicas y genotípicas se mantienen constantes de generación en generación en una relación  $D=p^2$ ,  $H=2pq$  y  $R=q^2$  (para el caso de un locus con dos alelos)

Los genotipos encontrados dentro de una población pueden estar formados por uniones aleatorias de los gametos, o sea estar en las proporciones esperadas por la ley del equilibrio de Hardy-Weinberg, o bien se puede tener más o menos heterocigos de los esperados al azar. Estos patrones se pueden estudiar de manera local o global. Para ayudar a este análisis, Sewall Wright (1921) propuso el índice de fijación  $F$ . El índice  $F$  se define como.

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

donde  $H$  = a la proporción de heterocigos observados

$2pq$  = proporción de heterocigos esperados, en el caso de que solo existan dos alelos.

Este índice toma valores de  $-1$  a  $+1$ , llegando a  $-1$  si existen exclusivamente individuos heterocigos en la población y a  $+1$ , si sólo se presentan organismos homocigos. Valores de  $F=0$  indican que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg (Hedrick 1983).

Para la descripción de la variación genética dentro y entre poblaciones, el índice de fijación  $F$  se parte a varios niveles geográficos (Wright 1951, 1965), lo que genera los estadísticos  $F$ .

a)  $F_{is}$  ( $F$  individuo -subpoblación) mide la desviación genética a nivel local

Toma valores de  $-1$  a  $+1$ . Se expresa como:  $F_{is}=H_s-H_o/H_s$

donde  $H_o$  es la proporción de heterocigos observada dentro de una subpoblación y  $H_s$  es la proporción de heterocigos esperada a nivel subpoblación (Nei 1977) Si es positivo quiere decir que existe diferenciación

entre subpoblaciones: y que ésta puede deberse a la endogamia (aunque generalmente esto debe coincidir con un valor alto de  $F_{st}$ , sin embargo no necesariamente es así), mientras que si es negativo sugiere algún tipo de selección que favorece a los individuos heterocigos.

b)  $F_{st}$  (subpoblación-total) mide la diferenciación entre poblaciones. Propuesto inicialmente por Nei (1972), este índice toma valores entre 0 y 1 y se puede obtener de la siguiente fórmula  $F_{st} = H_t - H_s / H_t$

donde  $H_s$  es la proporción de heterocigos esperada a nivel subpoblación y  $H_t$  es la proporción de heterocigos esperada a nivel global (Nei, 1977).

Su valor es de 0 si todas las subpoblaciones son idénticas entre ellas en términos de variación genética, mientras que vale 1 si son completamente diferentes entre sí, o sea que no comparten ningún alelo. Otra manera de interpretarlo es en términos del porcentaje de la variación genética que se encuentra dentro y entre poblaciones. Si es de cero quiere decir que el total de la variación se encuentra en cualquier subpoblación. Si es de 1 quiere decir que la variación se encuentra repartida entre las distintas subpoblaciones, ya que cada una esta fija para un alelo dado (Buckley *et al.*, 1988).

Generalmente si la  $F_{st}$  es similar en los distintos loci se considera que se debe a la deriva génica. Entre más alto sea el valor de la  $F_{st}$ , se interpreta como una mayor deriva y menor flujo génico (aunque esto depende también de la interpretación conjunta de  $F_{is}$ ) (Wright 1978; Slatkin 1985b, 1989).

c)  $F_{it}$  (F individuo-total) mide la diferenciación total debida tanto por endogamia como por deriva génica. Se puede obtener de la fórmula  $F_{it} = H_t - H_o / H_t$   
 $F_{it}$  toma valores entre -1 y +1.

Los estadísticos F funcionan como descriptores de la distribución de la variación genética y sugieren cuales podrían ser las fuerzas evolutivas que han estado operando en una población dada. Por ejemplo, si  $F_{is}$  es positiva señala que existe en una población un exceso de individuos homocigos en relación a los esperados por la Ley de Hardy-Weinberg. Si la  $F_{is}$  es negativa indica que existen menos homocigos que los esperados, y sugiere que ha existido

selección a favor de los heterocigos (Linhart *et al* 1981). Si  $F_{st}$  es pequeña indica poca diferenciación genética entre poblaciones, y que la mayor parte del total de la variación genética se puede encontrar dentro de una sola subpoblación. Esto podría indicar que ha habido mucho flujo génico entre las poblaciones. Si  $F_{st}$  es grande para todos los loci indica que existe mucha diferenciación genética entre subpoblaciones, que la mayor parte de la variación genética se encuentra repartida entre las subpoblaciones, y que posiblemente ésta haya sido generada por deriva génica. En contraste, si la  $F_{st}$  es elevada para sólo algunos loci, esta diferenciación podría estar generada por adaptación a condiciones locales por selección natural (Slatkin 1985b).

Además de los estadísticos  $F$  de Wright, existen otros posibles descriptores de la estructura genética, como el índice de la Identidad genética  $I$  de Nei (1972), el cual se define como:

$I = \sum_j x_j y_j / (\sum_j x_j)^{1/2} (\sum_j y_j)^{1/2}$  donde  $x_j$  es la probabilidad de escoger un par de alelos idénticos, uno de la población "x" y otro de la población "y". A partir de la identidad  $I$  se puede obtener la distancia genética  $D$  de Nei(1972):  $D = -\ln(I)$

Estas identidades y distancias se obtienen para pares de poblaciones. La identidad  $I$  toma valores que van de cero, si las dos poblaciones comparadas no comparten alelos, a 1 si las dos poblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas. La distancia  $D$  tiene un valor de cero si las poblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas, y de infinito si no comparten ningún alelo (Hedrick 1983)

La distancia genética que hay entre las poblaciones es una función de la intensidad del flujo de genes que ocurre entre ellas, por lo que sería muy importante conocer el valor de ese parámetro.

El estadístico  $F_{st}$  permite estimar indirectamente el flujo génico (Slatkin, 1994) mediante la expresión derivada por Wright (1951):

$$F_{st} \approx 1/4(Nm + 1) \quad \text{ecuación (1)}$$

donde  $N$  es el tamaño de la población,  $m$  es la fracción de inmigrantes a  $N$

A partir de  $F_{st}$  se puede estimar indirectamente el flujo génico entre las subpoblaciones (Wright, 1951):

$$Nm \approx 1/4 [(1/F_{st}) - 1] \quad \text{ecuación (2)}$$

Valores de  $Nm \ll 1$  producen una fuerte diferenciación entre las subpoblaciones (i.e., deriva génica actuando independientemente en cada subpoblación: Slatkin, 1994), mientras que si  $Nm \gg 4$ , las subpoblaciones se comportan como una sola población y el flujo génico restringe el efecto de la deriva génica (Hartl y Clark, 1989, Slatkin 1994).

Por último, con el fin de obtener una representación gráfica de las relaciones genéticas entre las poblaciones se realizó un análisis de cúmulos (cluster) a partir de las distancias genéticas de Nei (1972). El método empleado fue el UPGMA para lo cual se empleó el programa Biosys-1 (Swofford y Selander 1981)

## RESULTADOS

Veinticinco loci de los treinta y uno examinados fueron polimórficos en todas las poblaciones. Se detectaron altos niveles de variabilidad genética (polimorfismo, heterocigosis, y número promedio de alelos por locus) en las siete poblaciones de *Erythroxylum havanense* estudiadas (Tabla 5)

Los estimadores de la variación genética concuerdan en las siete poblaciones analizadas de *E. havanense* en la región de Chamela (Tabla 5) El porcentaje de loci polimórficos para las siete poblaciones es alto, esto indica que la mayoría de los genes analizados son polimórficos (ver Tabla 4), es decir tienen dos o más alelos. La heterocigosis total es de 0.387, mientras que el estimador insesgado de la heterocigosis esperada (Nei, 1978) obtenido fue de 0.330 (Tabla 5), esto también indica que la mayoría de los loci son polimórficos y que las frecuencias alélicas son iguales en la mayoría de cada locus analizado.

Valores de  $Nm \ll 1$  producen una fuerte diferenciación entre las subpoblaciones (i.e., deriva génica actuando independientemente en cada subpoblación Slatkin, 1994), mientras que si  $Nm \gg 4$ , las subpoblaciones se comportan como una sola población y el flujo génico restringe el efecto de la deriva génica (Hartl y Clark, 1989; Slatkin 1994).

Por último, con el fin de obtener una representación gráfica de las relaciones genéticas entre las poblaciones se realizó un análisis de cúmulos (cluster) a partir de las distancias genéticas de Nei (1972). El método empleado fue el UPGMA para lo cual se empleó el programa Biosys-1 (Swofford y Selander 1981)

## RESULTADOS

Veinticinco loci de los treinta y uno examinados fueron polimórficos en todas las poblaciones. Se detectaron altos niveles de variabilidad genética (polimorfismo, heterocigosis, y número promedio de alelos por locus) en las siete poblaciones de *Erythroxylum havanense* estudiadas (Tabla 5)

Los estimadores de la variación genética concuerdan en las siete poblaciones analizadas de *E. havanense* en la región de Chamela (Tabla 5). El porcentaje de loci polimórficos para las siete poblaciones es alto, esto indica que la mayoría de los genes analizados son polimórficos (ver Tabla 4), es decir tienen dos o más alelos. La heterocigosis total es de 0.387, mientras que el estimador insesgado de la heterocigosis esperada (Nei, 1978) obtenido fue de 0.330 (Tabla 5), esto también indica que la mayoría de los loci son polimórficos y que las frecuencias alélicas son iguales en la mayoría de cada locus analizado

Tabla 5. Medidas de variabilidad genética calculadas en siete poblaciones de *Erythroxylum havanense* en Chamela, Jalisco

POBLACION	No promedio individuos por locus	Número promedio alelos por locus	Porcentaje Loci Polimorficos	Heterocigosis promedio	
				Conteo directo	Hdy-Wb Esperado
Antiguo Sur	38.4 (1.9)	1.8 (0.1)	80.6	484 (.053)	.359 (.034)
Eje Central	44.1 (0.5)	1.8 (0.1)	77.4	.429 (.048)	.367 (.037)
Tejon	37.6 (1.2)	1.8 (0.1)	83.9	.530 (.049)	.391 (.033)
Ardilla	65.6 (0.3)	1.8 (0.1)	77.4	.390 (.045)	.370 (.037)
Cuitzmala	43.3 (0.9)	1.7 (0.1)	71.0	.341 (.043)	.299 (.036)
Ranchitos	42.4 (1.6)	1.7 (0.1)	74.2	.302 (.040)	.296 (.034)
Limoncito	44.2 (0.8)	1.6 (0.1)	61.3	.236 (.037)	.232 (.034)

(Error standard dentro de los parentesis); \* Un locus es considerado polimórfico si la frecuencia del alelo más común no excede 0.95 (ver Nei, 1978)

Proporción de loci polimorficos = 0.806

Total de loci = 31

Loci Polimorficos = 25

Heterocigosis Total = 0.387

Heterocigosis Esperada = 0.330

Los índices de Fijación (Wright, 1978) estimados en *E. havanense* fueron negativos en todas las poblaciones. Es decir hay un exceso de heterocigos en relación a los esperados según el azar (Tabla 6)

Tabla 6. Índices de Fijación (promedio) de todos los loci analizados para todas las poblaciones de *E. havanense*.

POBLACION	Índice de Fijación (promedio)
Antiguo Sur	-0.3500
Eje Central	-0.1811
Tejon	-0.3682
Ardilla	-0.0767
Cuitzmala	-0.1251
Ranchitos	-0.0366
Limoncito	-0.0272



Los estadísticos  $F$  de Wright muestran esta misma tendencia, ya que la mayoría de las  $F_{is}$  fueron negativas y significativamente diferentes de cero (Tabla 7)

Tabla 7 Estadísticos  $F$  de Wright (1951,1965) para todos los loci analizados en siete poblaciones de *Erythroxyllum havanense* de la región de Chamela Jalisco

LOCUS	$F_{is}$	$F_{st}$	$F_{it}$
APX	-.264	.115	-.118
APA-1	-.316	.104	-.179
APA-2	-.617	.318	-.104
APA-3	-.168	.286	.166
PGI-1	-.031	.183	.158
PGI-2	.127	.555	.611
PGI-3	-.054	.238	.196
ME-1	-.274	.281	.084
ME-2	-.518	.717	.571
APH-1	-.291	.712	.628
APH-2	-.195	.204	.049
APH-3	-.036	.072	.039
APH-4	-.106	.821	.802
MNR-1	-.318	.035	-.272
MNR-2	-.286	.136	-.112
MDH-1	-.408	.068	-.313
MDH-3	-.410	.727	.615
EST-1	-.168	.274	.152
EST-2	-.010	.164	.156
EST-3	-.185	.223	.079
NADPHDH-1	-.225	.063	-.149
NADPHDH-2	-.111	.147	.062
HEX-1	-.216	.084	-.113
SDH-1	-.126	.249	.154
SDH-2	.049	.575	.595
LDH-1	-.050	.123	.079
SOD-1	-.146	.142	.017
SOD-2	-.404	.689	.563
ADH-1	-.073	.051	-.018
ADH-3	-.078	.034	-.041
PROMEDIO	-.185	.263	.127

Asimismo, la  $F_{is}$  promedio fué de -0.185 lo que indica que hay un exceso de heterócigos. Este resultado sugiere que la selección favorece a los individuos heterócigos. La  $F_{st}$  indica que hay diferencias significativas en la variación genética entre poblaciones de *E. havanense*. El 27% de la variación genética se debe a las diferencias entre poblaciones, mientras que el resto de la variación se explica por el componente dentro de las poblaciones.

Los estimadores insesgados (Nei, 1978) de la distancia genética entre poblaciones de *Erythroxylum havanense* fueron en general altos. No obstante hubo una amplia variación ( $0.114 \leq D \leq 0.360$ ) Las máximas distancias genéticas registradas ( $D=0.360$ ) se observaron entre las poblaciones de Cuitzmala y Limoncito y entre las poblaciones de Ranchitos y Ardilla ( $D=0.287$ ) La menor distancia genética ( $D=0.114$ ) se observó entre las poblaciones de Antiguo Sur y Ardilla (Tabla 8)

En términos generales se encontró una menor distancia genética en las poblaciones que están localizadas dentro de la estación (Antiguo Sur, Ardilla, Eje Central y Tejón), con respecto a las que están fuera de ella (Ranchitos, Limoncito y Cuitzmala).

Tabla 8 Matriz de distancias genéticas (arriba de la diagonal principal) y de identidades genéticas (abajo de la diagonal principal).

POBLACION	1	2	3	4	5	6	7
Antiguo Sur	*****	0.115	0.130	0.114	0.291	0.245	0.258
Eje Central	0.891	*****	0.121	0.170	0.210	0.278	0.259
Tejón	0.878	0.886	*****	0.208	0.269	0.121	0.182
Ardilla	0.892	0.843	0.812	*****	0.177	0.287	0.231
Cuitzmala	0.747	0.811	0.764	0.838	*****	0.285	0.360
Ranchitos	0.783	0.758	0.886	0.751	0.752	*****	0.272
Limoncito	0.772	0.772	0.833	0.794	0.698	0.761	*****

El resultado del fenograma indica que las poblaciones de la estación forman un grupo (Antiguo Sur, Ardilla, Eje Central y Tejón) con similitudes genéticas muy altas (i.e.,  $I \geq 0.878$ ). Las poblaciones de Ranchitos, Limoncito y Cuitzmala forman otro grupo separado que tiene menor similitud en promedio (Figura 4).

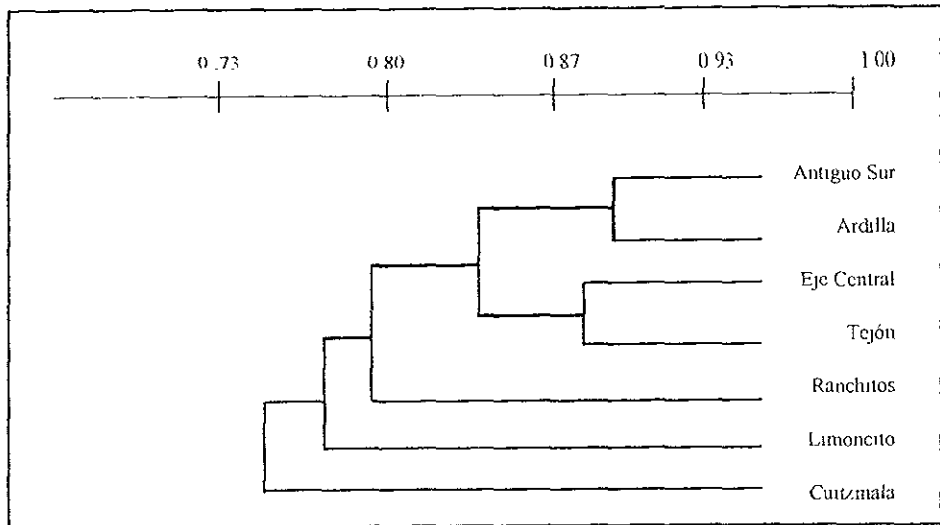


Figura 4. Fenograma basado en la similitud genética entre las poblaciones de *E. havanense* en Chamela, Jalisco

Para todas las poblaciones de *E. havanense*, el valor del flujo génico fué de  $Nm = 0.515$ . Este valor de flujo génico es bajo y sugiere evolución independiente y la diferenciación entre sitios podría ser resultado de la deriva o de la selección (Wright, 1969).

Al estimar el flujo génico entre las poblaciones (ec 2) que están dentro de la estación con las que se encuentran fuera de ella, se observó que las poblaciones que están dentro obtuvieron un estimado de  $Nm = 0.40$ , y las que están fuera  $Nm = 0.31$ . Esto sugiere que el flujo génico está restringido en ambos sitios, aunque es más acentuado en las poblaciones que están fuera de la Estación.

En general el flujo génico es poco y sugiere una fuerte diferenciación entre poblaciones (probablemente la deriva génica está actuando independientemente en cada población). Por otro lado es posible que exista un caso de aislamiento por distancia (Wright, 1943a y b, 1946, 1951), ya que las poblaciones más lejanas geográficamente entre sí (Limoncito, Ranchitos y Cuitzmala) registran valores más pequeños de flujo génico, y por el contrario los sitios más cercanos tienen un valor mayor de flujo génico.

## DISCUSION GENERAL

Los niveles de variación genética encontrados en *Erythroxylum havanense* son altos en comparación con los encontrados en otros árboles (Tabla 9) otras especies heterostilicas (Tabla 10), y en árboles tropicales en general (Hamrick y Loveless, 1986)

Tabla 9 Niveles de vanación de algunas especies de interés

Especies	Proporción de loci polimorficos	Heterocigosis esperada	Número de especies
Árboles tropicales	0.28	0.11	n = 29
Árboles de zonas templadas	0.37	0.14	n = 113
Coníferas	0.52	0.17	n = 40
Herbaceas	0.35	0.14	N
E. havanense	0.806	0.387	n = 345

Tabla 10 Tabla que muestra los niveles de variación genética para especies heterostilicas

Autor	Especie	Escala	Ht	He	Fst	Fis	Fit	Loci	N. ind.
Ganders	<i>Amsinckia Spectabilis</i>	10 pob.	0.063	0.016	0.047	-----	-----	6/17	270
Loiselle, A	<i>Psychotria Officinalis</i>	4 pob.	-----	0.184 (0.054)	0.095 (0.019)	0.055 (0.018)	0.144 (0.051)	11/14	175
Loveless y Hamnck	<i>Psychotria horizontalis</i>	-----	0.152	0.133	0.039	-----	-----	50/50	-----
Dewey y Heywood	<i>Psychotria nervosa</i>	-----	-----	-----	0.038	-----	-----	3 loci	-----
Pérez, N.	<i>P. faxiuscens</i>	2 pob.	0.198	0.495	0.026	0.115	0.138	8/20	52
Ibarra, J.L.	<i>E. havanense</i>	7 pob.	0.387	0.330	0.263	0.185	0.127	25/31	345

Existen diferentes mecanismos que podrían explicar los niveles altos de variación genética de *E. havanense* y de otras especies tropicales. Las cuatro especies de *Psychotria* que se muestran en la tabla 10 son autoincompatibles, lo que provoca un mayor intercambio genético y promueve niveles altos de variación genética al reducir la tasa de endogamia (Loveless y Hamrick, 1984; Brown 1989 Loveless y Hamrick 1987, Ledig. 1986; Hamrick *et al* , 1996) *E. havanense* tiene un sistema de auto-incompatibilidad bien desarrollado, lo que provoca que la fertilización solamente se lleve a cabo entre morfos diferentes y por lo tanto existan altos niveles de variación. La fertilización cruzada junto con los sistemas de autoincompatibilidad mantienen una alta carga genética: esto quiere decir que existen mas individuos heterocigos que los esperados según la relación de Hardy-Weinberg dentro de las poblaciones (Ledig. 1986. Loveless, 1992)

Por otro lado, el alto valor de la heterocigosis en *E. havanense* concuerda con la predicción de que las plantas que tienen fecundación cruzada presentan mayor heterocigosis que aquellas que se autofecundan (Nevo, 1978; Brown. 1979; Shea, 1987; Hamrick *et al* , 1996)

Los valores de diferenciación genética encontrados en *E. havanense* coinciden con los valores de plantas que tienen un sistema de cruzamiento mixto (Loveless y Hamrick, 1987; Hamrick y Godt, 1996), sin embargo resultan altos al compararlos con los reportados para otras especies heterostilicas (Tabla 10) *Psychotria horizontalis* obtuvo una  $F_{st}$  de 0.039 (Hamrick y Loveless. 1989); *Psychotria nervosa* con una  $F_{st}$  = 0.038 (Dewey y Heywood, 1988) y *Psychotria faxlucens* con  $F_{st}$  = 0.026 (Pérez- Naser, 1993).

La mayoría de las  $F_{is}$  fueron negativas (Tabla 7), por lo que es probable que los heterocigos tengan una ventaja selectiva (Wright, 1977; Mittón y Grant, 1984; Ledig. 1986) Esta ventaja podría expresarse en que los individuos que son heterocigos sean más robustos, crezcan más rápido, sean mejores competidores, etc. (Mittón y Grant, 1984; Allendorf y Leary, 1986).

El valor de la  $F_{st}$  (0.263) sugiere un grado de diferenciación elevado dentro de cada población, aproximadamente el 73% de la variación genética se encuentra repartida dentro de las poblaciones; posiblemente esto sea debido a la deriva genética y al flujo genético (Wright, 1978, Slatkin, 1985b, 1989). Parece que la deriva genética está actuando de manera independiente en cada población ya que la mayor parte de la variación se encuentra dentro de cada población.

Las distancias genéticas entre pares de poblaciones indican que hay un grupo de poblaciones conformadas por Antiguo Sur, Eje Central, Ardilla y Tejón (poblaciones situadas dentro de la Estación de Biología), que son las más parecidas genéticamente. Ranchitos, Cuitzmala y Limoncito son por separado las que están más distantes genéticamente entre ellas y entre el grupo mencionado anteriormente. La distancia geográfica (ver mapa fig.3) podría ser la explicación a las distancias genéticas que existen entre las poblaciones. En general las poblaciones geográficamente más distantes son también más distantes genéticamente (Cuitzmala-Antiguo Sur, Eje Central, Ardilla, Tejón, Cuitzmala-Ranchitos y Cuitzmala-Limoncito). Parece que existe una fuerte correlación, entre la distancia genética con la distancia geográfica. Este comportamiento podría hablarnos de que se tiene aislamiento por distancia; o sea que entre más lejanos geográficamente los sitios es menor la probabilidad de que exista flujo genético (Wright, 1943a y b, 1946, 1951). La distancia geográfica que existe entre las poblaciones puede estar provocando una alta diferenciación genética que puede ser explicada cuando menos en parte por el movimiento de polen a pequeñas distancias generadas por polinización que es principalmente por medio de abejas (*Scaptotrigona helwegeri*; Domínguez, 1997).

El flujo génico estimado a partir de la  $Nm$  es bajo, lo cual favorece la diferenciación genética dentro y entre poblaciones. Una posible explicación puede ser el movimiento de polen a pequeñas distancias que se genera por la polinización, y el modo de dispersión de las semillas, que también se da a pequeñas distancias, ya que se ha visto que las aves (como principales dispersores) escupen el fruto casi inmediatamente después de haberlo comido (Domínguez *et al.*, 1997).

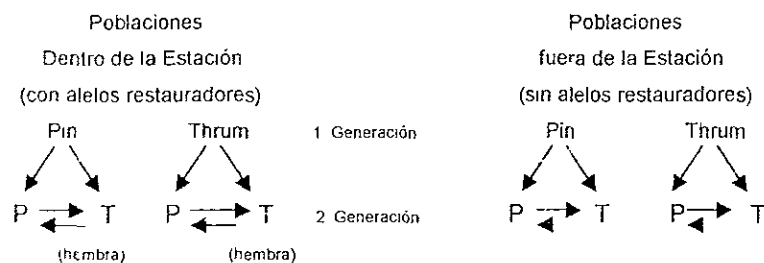
En las poblaciones de *Erythroxyllum havanense* se ha detectado la posible existencia de esterilidad masculina citoplasmática asociada al morfo thrum. Esto probablemente es la razón por la que los individuos pin producen 54% más semillas que los Thrum (Dominguez, 1990; Domínguez *eT al* , 1997). Esta diferencia se explica por la presencia de los altos niveles de polen estéril en algunos individuos del morfo Thrum. La esterilidad masculina parcial observada en algunos individuos del morfo Thrum de *E. havanense* podría ser el primer paso en la evolución de la heterostilia hacia la diecia, probablemente modulada por la interacción entre los genes del núcleo y los del citoplasma.

En la región de Chamela las poblaciones de *E. havanense* presentan altos niveles de variación fenotípica y genética. La variación fenotípica (medida como el nivel de germinación de polen) es significativamente diferente entre los morfos florales principalmente para las poblaciones de Ardilla y Tejón (Cueva E. , 1999). Por otro lado la variación genética (analizada con isoenzimas) indica que existen altos niveles de variación y una fuerte diferenciación entre todas las poblaciones, Ardilla y Tejón fueron también las poblaciones que presentaron los niveles más altos de heterocigosis. Esta variación puede ser el resultado de la esterilidad masculina asociada al morfo thrum, ya que los resultados que se presentan coinciden con las predicciones generadas a partir de los modelos teóricos que describen las dinámicas evolutivas de la EMC, las cuales señalan que las especies de plantas con EMC presentan una alta diferenciación y variación genética debido a la presencia de los citotipos que provocan la esterilidad masculina y a los alelos del núcleo que la restauran (Frank, 1989).

La variación fenotípica se da entre poblaciones, entre morfos y entre individuos del mismo morfo. Esta variación puede ser consecuencia del medio y/o de las diferencias genéticas que existen entre las poblaciones. Por un lado se sabe que la germinación de polen está muy influenciada por el medio, el cual puede ser muy variable. Por ejemplo; si hay una escasez de agua en el medio durante la microgametogénesis en el trigo y el arroz, se induce una esterilidad masculina (Sheoran y Saini, 1996; Lalonde *eT al* , 1997). La región de Chamela se caracteriza por una marcada estacionalidad en la temporada de lluvias y de secas (Bullók, 1986; García-Oliva *eT al* , 1991, Galicia, 1992;

García-Oliva *et al.*, 1995) Esta heterogeneidad en el medio podría explicar parcialmente los niveles altos de variación fenotípica en la germinación de polen. Por otro lado, en las especies ginodioicas (macho estéril) comúnmente se observa una marcada variación en la frecuencia de hembras entre las poblaciones (Van Damme *et al.*, 1994). Ya ha sido demostrado que esta variación tiene bases genéticas, dado que esta es una consecuencia de la variación entre poblaciones en la frecuencia de los citotipos que provocan la esterilidad masculina y los alelos restauradores del núcleo (Frank, 1989). Dado que la vía principal para que se desarrolle la esterilidad masculina en *E. havanense* tiene un fuerte parecido con las especies que tienen EMC (Dominguez *et al.*, 1997), se piensa que gran parte de la variación fenotípica que se observa en la germinación de polen se debe a las diferencias genéticas que existen entre las poblaciones. Existe evidencia que apoya esta interpretación, y es que casi el 30% del total de la variación genética en *E. havanense*, se debe a la diferenciación que existe entre poblaciones, esto podría ser una consecuencia de la frecuencia de los citotipos que provocan la esterilidad y los restauradores nucleares.

Analizando por separado los niveles de heterocigosis de los dos grupos de poblaciones con más similitudes genéticas (Figura 4), encontramos que en las poblaciones de afuera de la Estación de Biología existe una menor heterocigosis que en aquellas que se encuentran dentro de la Estación. Es posible que esto se deba a que si pensamos que los genes causantes de la esterilidad masculina están en todas las poblaciones y que los alelos restauradores solo están presentes en las poblaciones de adentro de la Estación entonces el escenario sería el siguiente:



donde  $\rightarrow$  viable para la fertilización.

$\blacktriangleright$  parcialmente viable para la fertilización.



Existe un camino que es viable para la fertilización  $P \rightarrow T$  para ambos sitios, sin embargo el camino  $T \rightarrow P$  para las poblaciones que están afuera de la Estación es parcialmente viable. Esto quiere decir que las poblaciones que se encuentran afuera de la Estación tienen parcialmente solo una vía de fertilización, ya que algunos individuos Thrum no pueden fecundar a los individuos pin que se encuentran formando parte de la población, debido a que este morfo es estéril para algunas plantas. Esto provoca que existan menos heterocigos que cuando existen las dos vías posibles de fertilización (aunque la heterocigosis es alta para ambos casos) como parece que está ocurriendo con las poblaciones de adentro de la Estación en donde si están presentes ambas vías y son viables. Posiblemente exista endogamia biparental en ambos sitios, pero se da con mayor frecuencia en las poblaciones localizadas afuera de la estación (presencia de más homocigos).

Una posible explicación del porque solo existan los alelos restauradores en las poblaciones localizadas dentro de la estación, puede ser debido al poco flujo genico que se genera y a la distancia geográfica que separa ambos grupos de poblaciones. Esto es, que al ser restringido el flujo de genes es menos probable que los alelos restauradores de la esterilidad que ya están presentes en Ardilla, Tejón, A Sur y Eje Central, lleguen a todos los individuos de Ranchitos Limoncito y Cuitzmala.

Esta propuesta se apoya en los resultados obtenidos a partir de la estructura genética de las poblaciones de *E. havanense*; y al gran parecido que existe con las especies que presentan esterilidad masculina citoplasmática.

Este hallazgo es importante, por que sugiere nuevos mecanismos causales para la disolución evolutiva de la heterostilia. La evolución de la EMC puede ocurrir en *Erythroxylum havanense*, y su dinámica va a depender de la ubicación de los genes restauradores dentro del genoma nuclear. Si estos genes están asociados al supergene de la heterostilia, entonces se esperaría que la esterilidad masculina se presentara en uno solo de los morfos. Para

*E. havanense*, los alelos podrían estar asociados al haplotipo que determina el morfo Pin. Los alelos mitocondriales que causan EMC deberían estar presentes en los dos morfos florales ya que se heredan por vía materna. En contraste, si los alelos nucleares que restauran la fertilidad están asociados al haplotipo pin, estos individuos tendrán dos copias de estos genes (el morfo Pin es homogamético, ss) y serían fértiles para la función masculina. En cambio, los individuos Thrum tendrían los genes mitocondriales que causan EMC pero, dado que el haplotipo Thrum es dominante sobre el Pin (Ganders, 1979), los genes restauradores no se expresarían y estas plantas serían estériles para la función macho. Este fenómeno podría generar un desequilibrio en el funcionamiento de la heterostilia y por tanto promover su evolución hacia otro sistema reproductivo.

## LITERATURA CITADA

- AYALA, R 1988 Abejas silvestres (hymenoptera: Apoidea) de Chamela, Jalisco, México. *Folia Entomológica mexicana* 77 395-493.
- BAKER, H. 1966. The evolution, functioning, and breakdown of heteromorphic incompatibility systems I The Plumbaginaceae. *Evolution* 20. 349-368.
- BAKER, H G. 1986. Breeding systems of plants in relation to West African ecology In G. W. Lawson (ed). *Plant Ecology in West Africa* John Wiley & Sons Ltd
- BARRETT, S C H. & J. S. SHORE 1987 Variation and evolution of breeding systems in the *Turnera ulmifolia* L. complex (Turneraceae). *Evolution* 41. 340-354.
- BARRETT, S C.H., M. T. MORGAN, & B C HUSBAND 1989. The dissolution of a complex genetic polymorphism the evolution of self-fertilization in tristylous *Eichornia paniculata* (Pontederiaceae). *Evolution* 43: 1398-1416.
- BARRETT, S C H. 1989. Isozyme variation in colonizing plants. In Soltis, D.E. and P.S. Soltis (eds). *Isozyme in Plant Biology*, 106-126. Advances in plant science series Vol. 4. U S.A.
- BARRETT, S.C.H. 1990. The evolution and adaptive significance of heterostyly. *Trends in Ecology and Evolution* 5:144-148.
- 1992a. Evolution and function of heterostyly. Springer-Verlag. Berlin
- . 1992b Gender variation in *Wurmbea dioica* (Liliaceae) and the evolution of dioecy *Journal of Evolutionary Biology* 5: 423-444.
- M. T MORGAN, & B. c Husband. 1989. The dissolution of a complex genetic polymorphis. The evolution of self-fertilization in tristylous *Eichornia paniculata* (Pontederiaceae). *Evolution* 43:1398-1416
- BAWA, K S.1980 Evolution of dioecy in flowering plants *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 11 15-39
- BAWA K.S., & J.H. BEACH. 1981 Evolution of sexual systems in flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 68:254-274
- BAWA, K D. 1992 Mating Systems, genetic differentiation and speciation in tropical rain forest plants. *Biotropica* 24(2b): 250-255.
- BEACH, J.H. & K S. BAWA. 1980. Role of pollination in the evolution of dioecy from distyly. *Evolution* 34: 1138-1142.
- BIR BADHUR. 1970. Homostyly and heterostyly in *Oldenlandia umbellata* L. *J Genet.* 60:192-198.
- BRITTON, N. L. 1907 Erythroxylaceae. *North American Flora* 25:59-66
- BROWN, A. H. D 1979 Enzyme polymorphism in plant populations. *Theor. Pop. Biol.* 15: 1-42.
- BROWN, A H. D & G. F. MORAN. 1981. Isozymes and the genetic resources of forest tress. Pags 1-10. In: M. T. Conkle, ed *Proceedings of the symposium on isozymes of North American forest tress and forest insects* Gen. Tech. Rep. PSW-48 Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, Forest Service, U. S. Department of Agriculture.
- BROWN, A. H. D., & B. S. WEIR. 1983. Measuring genetic variability in plant populations. En S.D. Tanksley y T. J. Orton, eds. *Isozymes in plant genetics and breeding. Part A.* Elseiver, Amsterdam,

- BROWN A H D & B S WEIR. 1983 Measuring genetic variability in plant populations En S D Tanksley y T J Orton eds *Isozymes in plant genetics and breeding Part A* Elsevier Amsterdam, pages 219-239.
- BULLOCK S H. 1985 Breeding systems in the flora of a tropical deciduous forest in México *Biotropica* 17. 287-301
- S H. 1986. Climate of Chamela Jalisco and trends in the south coastal region of Mexico *Archives Meteorology Geophysics Bioclimatology Serie B* 36. 297-316
- BUCKLEY D P D M O MALLEY, V. APSIT, G. T PRANCE, & K. S BAWA 1988 Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb & Bompl Lecythidaceae). I. Genetic variation in natural populations *Theor Appl Genet* 76. 923-928.
- CASPER B B 1992 The application of sex-allocation theory to heterostylous plants *In* S C H Barrett (ed ), *Evolution and function of heterostyly*, 209-223 Springer-Verlag, Berlin
- CHARLESWORTH. B. & D CHARLESWORTH 1978. A model for the evolution of dioecy and gynodioecy *American Naturalist* 112: 975-997.
- CHARLESWORTH D. 1981 A further study of the problem of the maintenance of females in gynodioecious species. *Heredity* 46: 27-39.
- CLEGG M. T 1983 Detection and measurement of natural selection en S D Tanksley y T J Orton, eds. *Isozymes in plant genetics and breeding Part A* Elsevier. Amsterdam, pages. 241-255.
- CLEGG, M T & A H. D BROWN 1983. The founding of plant populations. Pages. 216-228. *In*. Schonewald-Cox, S.M. Chambers, B Macbryde y L. Thomas, eds *Genetic and Conservation*. Benjamin/Cummings Pub. Co Inc USA
- CLEGG, M T & B K EPPERSON 1985 Recent developments in populations genetics Pages. 235-268 *In* *Advances in Genetics* Academic Press. USA
- COELLO-COUTIÑO, G M M. MARTÍNEZ, P. A. MELÉNDEZ & B PAZOS 1986. Incompatibilidad sexual y distilia en *Bouvardia ternifolia*. *Memorias del III Simposio de Ciencias en Sistemas Biológicos* Facultad de Ciencias, UNAM
- COSMIDES, L M, & J. TOOBY. 1981 Cytoplasmic inheritance and intragenomic conflict. *Journal of Theoretical Biology* 89: 83-129.
- CRAWFORD, D. 1985 Electrophoretic data and plant speciation *Syst. Bot.* 10. 405-416
- CRONQUIST, A 1981 *An Integrated System of Classification of Flowering Plants* Columbia University Press, Great Britain.
- CROW, J F, & M. KIMURA 1970. An introduction to population genetics theory Harper and Row, New York.
- DARWIN, C 1859 *On the origin of Species by Means of Natural Selection or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. John Murray, London
- . 1877 *The different forms of flowers on plants of the same species*. John Murray. London

- DOMÍNGUEZ C. A. 1990. Consecuencias ecológicas y evolutivas del patrón de floración sincrónico y masivo de *Erythroxyllum havanense* Jacq (Erythroxyllaceae) Ph. D. dissertation Universidad Nacional Autónoma de México México
- 1995 Genetic conflicts of interest in plants *Trends in Ecology and Evolution* 10 412-416
- & R DIRZO. 1994 Effects of defoliation in *Erythroxyllum havanense* a tropical proleptic species *Ecology*. 75(1) 1896-1902
- & R DIRZO. 1995 Rainfall and flowering synchrony in a tropical shrub variable selection on the flowering time *Erythroxyllum havanense* *Evolutionary Ecology* 9 204-216
- ÁVILA-SAKAR G. VAZQUEZ-SANTANA S., & MÁRQUEZ-GUZMÁN J 1997. Morph-biased male sterility in the tropical distylous shrub *Erythroxyllum havanense* (Erythroxyllaceae) *American Journal of Botany* 84(5). 626-632
- EGUIARTE L E 1986 Una guía para principiantes a la genética de poblaciones *Ciencias, revista de difusión*
- EGUIARTE, F L E 1990 Genética de Poblaciones de *Astrocaryum mexicanum* Liebm en los Tuxtlas, Veracruz Ph. D Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- EGUIARTE F L E., PEREZ-NASER, N & PIÑERO, D 1992 Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm) implications for evolution and conservation *Heredity*. 69. 217-288.
- ELLSTRAND, N. 1984 Multiple paternity within the fruits of the wild radish, *Raphanus sativus* *Amer Natur* 123 819-828.
- ENDLER, J A 1977. *Geographic Variation Speciation, and Clines*. Princeton Univ Press., Princeton, NJ.
- ENDLER, J. A 1986. *Natural Selection in the Wild* Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- FRANK, S A 1989. The evolutionary dynamics of cytoplasmic male-sterility *American Naturalist* 133 345-376.
- FRANKEL, R. & E GALUN 1977 Pollination Mechanisms, Reproduction and Plant Breeding Springe-Verlag, New York.
- FRANKEL, O. H., & M E. SOULÉ. 1981. *Conservation and evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- FRANKLIN, I. R 1980. Evolutionary change in small populations, en M.E. Soulé y B. A Wilcox, eds. *Conservation biology. An evolutionary-ecological perspective* Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, pages. 135-150
- FUTUYMA, D J. 1986. *Evolutionary biology* 2<sup>nd</sup> edition Sinauer Associates, Inc Publishers, USA
- GANDERS, F R 1975 Fecundity in distylous and self-incompatible homostylous plants of *Mitchela repens* (Rubiaceae). *Evolution* 29:186-188.
- 1979a The biology of heterostily *New Zealand Journal of Botany* 17. 607-635
- 1979b Heterostily in *Erythroxyllum coca* (Erythroxyllaceae). *Bot. J. Linn Soc* 78:11-20

- GARCÍA, E 1988. Modificaciones al sistema climático de Koppen Limusa, México
- GRYJ, E. O. 1990. Dispersión de frutos del arbusto *Erythroxylum havanense* Jacq. en Chamela, Jalisco Tesis Prof. Fac. de Ciencias, UNAM.
- GOTTLIEB, L D 1977. Electrophoretic evidence and plant systematics. *Ann. Mo Bot Gard* 64 161-180.
- HAMRICK, J L Y B LINHART & J B MITTON. 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants, *Ann Rev. Ecol. Syst* 10: 173-200.
- HAMRICK, J. L 1982. Plant population genetics and evolution. *Amer. J. Bot.* 69(10). 1685-1693
- HAMRICK, J L. & M D LOVELESS 1986. Isosyme variation in tropical trees: procedures and preliminary results *Biotropica* 201-207.
- HAMRICK, J. L. & GODT, M J. W 1990. Allozyme diversity in plant species. En Brown A D H, Clegg M.T Kahler A.L y Weir B S (Edrs) *Plant population genetics, breeding and germoplasm resources*. Sinauer, Sunderland, MA. 43-63.
- HAMRICK, J L. GODT, M J. W. & S.L SHERMAN-BROYLES 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forest* 6 95-124
- HAMRICK, J L & M J. W GODT. 1996. Effects on the life history traits on genetic diversity in plant species *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 351: 1291-1298
- HARTL, D. L., & A G. CLARK 1989. *Principles of population genetics*, 2<sup>nd</sup>. ed. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- HEDRICK, P. W. 1983. *Genetics of populations* Science Books Int., Boston
- HOWE, H F., E. W. SCHUPP & L. C WESTLEY 1985. Early consequences of seed dispersal for a neotropical trees. (*Virola surinamensis*) *Ecology* 66. 781-791.
- KIMURA, M , & T OTHA 1971. *Theoretical aspects of population genetics*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.
- LASER, K D., & N. R LERSTEN 1972. Anatomy and cytology of microsporogenesis in cytoplasmic male-sterile angiosperms. *Botanical Review* 38: 425-454
- LAYTON, C. R., & F. R GANDERS.1984. The genetic consequences of contrasting breeding systems in *Plectritis* (Valerianaceae). *Evolution* 38: 1308-1325.
- LEDIG. F. T. 1986. Heterozygosity, heterosis and fitness in outbreeding plants, en M.E. Soulé. *Conservation biology The science of scarcity and diversity*. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, pages. 77-104.
- LEWIS. D. 1941. Male-sterility in natural populations of hermaphrodite plants. *New Phytologist* 40: 53-63.
- 1979. Evolution towards dioecy in heterostylous populations. *Plant Syst. Evol.* 131 71-80.
- LEWONTIN, R C.1974. *La base genética de la evolución* Ediciones Omega S A. Barcelona, 328 pages.
- . 1985 a. Population genetics. *Ann. Rev. Genet.* 19: 81-102.
- . 1985 b. Population genetics, en P J. Greenwood, P H Harvey y M Slatkin eds. *Evolution. Essays in honour of John Maynard Smith*. Cambridge University Press, Cambridge, pages 3-18.

- LINHART, Y. B., J. B. MITTON, K. B. STURGEON, & M. L. DAVIS 1981. Genetic variation in space and time in a population of ponderosa pine. *Heredity* 46: 407-426
- LOTT, E. J. 1985. Listados florísticos de México III. La Estación de Biología Chamela. Jalisco. Instituto de Biología, UNAM
- LOTT, E. J., S. H. BULLOCK, & J. A. SOLIS-MAGALLANES 1987. Floristic diversity and structure of upland and arroyo forests in coastal Jalisco. *Biotropica* 19: 228-235
- LOVELESS, M. D. & J. L. HAMRICK. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 15: 65-95
- LOVELESS, M. D. 1992. Isozyme variation in tropical trees. patterns of genetic organization. *New Forest* 6: 67-94
- LLOYD, D. G. 1987. Benefits and costs of biparental and uniparental reproduction in plants. In R. E. Michod & B. Levin (eds). *The Evolution of Sex*. Sinauer Assoc., Sunderland, Massachusetts
- LLOYD, D. G., & C. J. WEBB. 1992. Evolution of heterostyly. In S. C. H. Barrett (ed.), *Evolution and function of heterostyly*. 151-178. Springer-Verlag Berlin
- MAURICE, S. 1992. Maintenance of nuclear-cytoplasmic polymorphism under dioecious reproductive systems. *Journal of Theoretical Biology* 154: 239-247
- . S. CHARLESWORTH, D., DESFEUX, C., COUVET, D., & GOUYON, P. H. 1993. The evolution of gender in hermaphrodites of gynodioecious populations with nucleo-cytoplasmic male-sterility. *Proc. R. Soc. B.*, 251: 253-261.
- . E. BELHASSEN, D. COUVET, & P. H. GOUYON. 1994. Evolution of dioecy. can nuclear-cytoplasmic interactions select for maleness? *Heredity* 73: 346-354.
- MEAGHER, T. R. 1988. Sex determination in plants. In J. Lovett Doust & L. Lovett Doust (eds) *Plant Reproductive Ecology. Patterns and Strategies*. Oxford University Press, New York.
- MIRANDA, F. Y. E. HERNÁNDEZ. X. 1963. Los tipos de vegetación en México y su clasificación. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 28: 29-179.
- MITTON, J. B. 1983. Conifers, en S. D. Tanksley & T. J. Orton, eds. *Isozymes in plant genetics and breeding, Part B*. Elsevier, Amsterdam, pags. 443-473.
- NASON, J. D., P. R. ALDRICH & J. L. HAMRICK. 1997. Dispersal and the dynamics of genetic structure in fragmented tropical tree populations. En Laurence, W. F. & Y. R. O. Bierregaard, Jr. (eds). *Tropical Forest Remnants*. The University of Chicago Press. Chicago pp. 304-320
- NEI, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- NEI, M. 1972. Genetic distance between populations. *Amer. Natur.* 105: 385-398.
- . 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Ann. Human Genet.* 41: 225-233.
- NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetic.* 89: 583-590.
- NETTANCOURT, D. 1977. *Incompatibility in Angiosperms*. Springer-Verlag, N.Y.

- NEVO, E 1978 Genetic variation in natural populations: Patterns and theory. *Theoretical population biology* 13 121-177
- ORNDUFF R 1966. The origin of dioecism from heterostyly in *Nymphoides* (Menyanthaceae) *Evolution* 20 309-314
- 1971. The reproductive system of *Jepsonia heterandra* *Evolution* 25 300-311
- PEREZ N 1990. Biología reproductiva y estructura genética de *Psychotria faxlucens* (Rubiaceae) en los Tuxtlas. Veracruz Tesis de Maestría en Ciencias (Biología), UNAM. México
- RICHARDS A J 1986 *Plant breeding systems*. George Allen and Unwin, London
- SAUMITOU-LAPRADE, P., J. CUGUEN, & P. VERNET 1994. Cytoplasmic male sterility in plants: molecular evidence and the nucleocytoplasmic conflict *Trends in Ecology and Evolution* 9. 431-435.
- SLATKIN, M 1980 The distribution of mutant alleles in a subdivided population. *Genetics* 95 503-523
- SLATKIN, M. 1985b Gene flow in natural populations *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 16: 393-430
- . 1989 Population structure and evolutionary progress. *Genome* 196-202
- SLATKIN, M 1990 Flujo genico en poblaciones naturales. *Ciencias*. 17 10-14.
- SLATKIN, M 1994 Gen flow and population structure. In L. A. Real (ed), *Ecological genetics*, 3-17. Princeton University Press Princeton.
- SOBREVILLA, C., N. RAMÍREZ & N. XENA 1983 Reproductive biology of *Palicourea fendleri* and *P. petiolaris* (Rubiaceae). *Biotropica* 15:161-169
- SOLTIS, D. E. & P. S. SOLTIS 1989. Isozyme in Plant Biology Advances in plant science series. Vol. 4 U.S.A
- STANDLEY, P. C 1923 Trees and Shrubs of México. Contributions for the United States National Herbarium. 23: 517-848.
- SWOFFORD, D. L. & SELANDER, R. B 1981 BIOSYS-1.- Urbana University of Illinois
- VÁZQUEZ SANTANA S., C. A. DOMÍNGUEZ, & J. MÁRQUEZ. 1996. Embriología de *Erythroxylum havanense* (Erythroxylaceae). una especie heterostilica *Boletín de la Sociedad Botánica de México*.
- WRIGHT, S 1921. Systems of mating *Genetics* 6 111-178
- 1931. Evolution in Mendelian populations *Genetics* 16:97-159.
- 1951 The genetic structure of populations *Ann. Eugen* 15:322-354.
- 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19:355-420.
- 1978. *Evolution and the genetics of populations. vol. 4: Variability within and among natural populations*. University of Chicago press, Chicago.
- WYATT, R 1983 Pollinator-plant interactions and the evolution of breeding systems. In L. Real (ed.) *Pollination Biology*. Academic Press, N.Y.
- WYATT R 1986. Ecology and evolution of self-pollination in *Arenaria uniflora* (Caryophyllaceae) *Journal of Ecology* 74 403-418.



## APENDICE TÉCNICA DE ELECTROFORESIS

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

Una vez que se separan las enzimas por electroforesis se tiñen los geles mediante métodos histoquímicos que hacen al producto de la reacción enzimática visible. Las técnicas de tinción más usadas identifican la transferencia del ión hidrógeno del sustrato NAD o NADP (que pasan a ser NADH o NADPH). Estas reacciones son llamadas deshidrogenasas. El PMS es usado para transferir el ión H<sup>2</sup> de NAD o NADP a alguna sal como MTT o NBT que se reduce dando lugar a formazan insoluble que aparece en color en el gel, en sitio donde la reacción tuvo lugar.

A continuación se detalla la técnica utilizada en el tratamiento de las muestras después de la colecta, su almacenamiento, el método de extracción de proteínas que se utilizó, y los procedimientos de corrimiento, tinción, lectura y almacenamiento de los geles para llevar a cabo electroforesis de enzimas a partir de tejido foliar de *Erythroxylum havanense*.

La secuencia metodológica se enlista a continuación:

- 1 - Colecta de muestras foliares del campo
- 2 - Almacenamiento de muestras foliares en un tanque de Nitrógeno líquido a -196 grados centígrados
- 3 - Almacenamiento permanente en un ultracongelador (REVCO) a -70 grados centígrados
- 4 - Extracción de proteínas mediante el macerado de las muestras con un buffer específico y absorción en wiks.
- 5 - Almacenamiento a largo plazo de los extractos de tejido foliar absorbidos en papel filtro y guardados en tubos eppendorf en el ultracongelador a -70 grados centígrados
- 6 - Montaje de las muestras en el gel.
- 7 - Electroforesis. Corrimiento del gel bajo un amperaje/voltaje específicos y una combinación de buffer de charola y gel adecuada.
- 8 - Retiro del gel de la corriente eléctrica y corte en rebanadas.
- 9 - Tinción con base en protocolos específicos para cada enzima
- 10 - Lectura. Se hace la lectura de los patrones de bandeado en los geles en fresco ya que es el momento de resolución óptima para algunas enzimas.
- 11 - Fijación de geles en alcohol al 50%.

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

Se colectaron hojas, se envolvieron en bolsas, se etiquetaron y se les puso una liga y un ganchillo para introducirlos en el tanque de Nitrógeno

líquido. Una vez en el Laboratorio, las muestras se colocaron en un ultracongelador (REVCO de -70 grados centígrados) para su posterior utilización. Se ha reportado (Kephart 1990) que las muestras guardadas por largos periodos de tiempo en un ultracongelador, presentan diferentes grados de viabilidad. Generalmente, en los tejidos con altos contenidos de compuestos secundarios las enzimas se degradan rápidamente aún a temperaturas de -50 grados centígrados. Por eso se decidió congelar instantáneamente con nitrógeno líquido y mantener las muestras a -70 grados centígrados.

Los tejidos fueron homogeneizados (usando 1.2ml de buffer de extracción) buffer de Abies ) y absorbidos en papel para cromatografía Whatman del N 20, y colocados en geles de almidón (30 gr de almidón y 10gr de sucrosa).

A continuación se presenta la composición química del buffer de extracción de Abies que se utilizó para *E. havanense*.

### **BUFFER DE EXTRACCION DE ABIES (MODIFICADO DE MITTON, 1981)**

BUFFER YO para 100ml

Compuesto

- Tris Ac cítrico-----	10ml
(1.57g de trisma base, 0.83g de ácido cítrico pH 7.0).	
-NADP (TPN)-----	0.05g
-NAD (DPN)-----	0.05g
-Ac ascórbico-----	0.018g
-EDTA-----	0.034g
-Suero albumina de bovino----	0.10g
-2- Mercaptoethanol-----	0.33ml

BUFFER VEG 11

-Ac bóico-----	0.31g
-Tergitol17-S-9-----	2ml
-PEG 8000-----	2g
-PVP 40-----	7g
-PVP 360-----	1g
-Ac ascórbico-----	0.88g
-NAD (DPN)-----	0.02g
-Suero de albumina de bovino----	0.1g
-Pyridoxal 5' fosfato-----	0.005g
-Sacarosa-----	0.27g
-Cisteina-HCL-----	0.19g
-2-Mercaptoetanol-----	0.66ml

Para 100ml de agua a pH 7.

Como se mencionó anteriormente se requiere de un buffer de gel (que se usa para prepararlo) y un buffer de charola (que es una solución ionizada que conduce la corriente eléctrica a través del gel) para llevar a cabo una corrida electroforética.

La corriente eléctrica produce un corrimiento diferencial de las proteínas, de acuerdo a sus cargas debido a la presencia de grupos amino y de grupos carboxilo. La carga neta de la proteína, y como resultado de ésta, su migración en el gel, depende del pH, compuestos químicos y la concentración de estas en

el sistema de buffer Cuando las proteínas migran hasta su punto isoeléctrico (donde ya no hay carga) ya no se registra más movimiento

Ya que las enzimas se ionizan a varios pH's usualmente hay que ensayar con 2 a 4 diferentes sistemas de buffer hasta poder lograr una buena expresión enzimática Para este trabajo se utilizaron varios sistemas de buffer para encontrar las enzimas polimórficas, y los pH's van desde 6.1 hasta 9.0 y con 3 niveles de amperaje. (como se observa en la siguiente tabla)

Tabla Apendice 1. Amperaje y pH de los sistemas de buffer utilizados (\*Buffer's elegidos para trabajar con *E. havanense* )

SISTEMA	CORRIENTE (mA)	pH Charola	pH Gel
*Sistema 7	65	8.3	8.3
Sistema 2	60	9.0	9.0
Sistema R	60	8.1	8.5
Morfolina	55	6.1	6.1
*Poulik	60	8.6	8.1
*Mitton	55	7.5	7.6
Histidina	55	7.0	7.0
Sistema -8		8.0	7.6

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

Como se puede observar en la tabla (Apendice 1 ) hay algunos sistemas de buffer que presentan el mismo pH para el buffer del gel y el de charola. Este tipo de sistemas de buffer se denominan continuos en contraposición a aquellos discontinuos en donde el pH del gel y el de charola son diferentes ( sistema R, Poulik, Mitton y Sistema -8). Una de las consecuencias de usar un sistema de buffer discontinuo es que las bandas de los loci se adelgazan y permiten, en algunos casos, una mejor resolución de las isoenzimas.

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

## SISTEMA BUFFER DEL GEL

## BUFFER DE CHAROLA

**A (A. Garay) Sistema 7**

Tris (T-1378)7-9 ----5.45g  
 Acido Citrico-----1.3g  
 Aforar a 900ml y ajustar a pH 8.3  
 con NaOH  
 Buffer de Charola ----100ml

LiOH-----1.6g  
 Acido Bórico-----11.6g  
 Ajustar a pH 8.3 con compues-  
 tos secos.

**B (Hakim-Elahi,1976) Poulik**

Tris (T-1378)7-9 ----2g  
 Acido Citrico-----0.63g  
 Agua destilada-----1000ml  
 Aforar, ajustar a pH 8.1

Hidróxido de sodio----4.0g  
 Acido Bórico-----18.55g  
 Agua destilada -----1000ml  
 Aforar, ajustar a pH 8.6

**C (Mittton PP) Mitton**

Tris (T-1378)7-9----1.8g  
 Ac.citríco monohidratado--0.7g  
 Agua destilada-----1000ml  
 Ajustar el pH a 7.5 con NaOH.  
 con Ac. Bórico.

Hidróxido de sodio----1.25g  
 Acido Bórico-----18.25g  
 Agua destilada-----1000ml  
 Ajustar el pH a 7.6 con NaOH  
 o con Ac. Citríco.

Para poder determinar a que distancia del cátodo va el frente de corrimiento se coloca, en las orillas de los geles, dos wicks con marcador (amido-black). La mayoría de los geles se corren hasta que el frente a recorrido aproximadamente 10 cm. El gel se retira de la corriente eléctrica y se corta en rebanadas de 2mm. Cada rebanada se tiñe de acuerdo a un protocolo específico para cada enzima.

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

A continuación se enlistan las recetas de las enzimas montadas:

**LAP (Werth, 1985)**

Pesar:

-Fast Black K salt-----100mg  
 (disolverlo en 5ml de agua destilada  
 justo antes de teñir)

Añadir:

-Buffer 0.2 Tris maleato pH 5.2-----50ml  
 (Tns 1378 24.2g y Ac. málico 23.2g)  
 -L-Leucina-b-naftilamida-HCL 2.5%-----1ml  
 Incubar en la obscuridad a 37C durante 30 minutos y  
 posteriormente añadir el Fast Black salt.

**PGI (Vallejos, 1983)**

Pesar

-D-Fruetosa 6-G-fosfato, sal disódica-----30mg

Añadir

-0.1M Tris-HCL pH 7.5-----50ml

-Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (10u/ml)--3ml

-1M Mg CL2 o al 10%-----1ml

-TPN (=NADP) 1%-----1ml

-MTT 1%-----1ml

-PMS 1%-----0.5ml

Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente

**APX (Hakim-Elahi, 1976)**

Pesar

-3-Amino-9-ethylcarbazole-----100mg

Añadir

-Dimetilformamida-----7ml

-Agua destilada-----90ml

-Peróxido de hidrogeno-----1ml

-Cloruro de calcio al 1%-----2ml

-1M de acetato de sodio pH 5.0---5ml

Incubar en la obscuridad

**ME (Modificada de Soltis et al. 1983)**

Mezclar

-0.2 Tris-HCL pH 8.0-----40ml

-1M DL-Malato pH 8.0-----5ml

-1M MgCl2-----1ml

-TPN (NADP) 1%-----1ml

-MTT 1%-----1ml

-PMS 1%-----0.2ml

Incubar en la obscuridad a 30 C.

**SDH (Modificado de Werth, 1985)**

Pesar

-1) Acido shikímico-----40mg

-2) Agar-----0.36g

Añadir.

-1) 0.2 Tris-HCL pH 8.0-----15ml

- TPN (=NADP) 1%-----1ml

- MTT 1%-----1ml

- PMS 1%-----0.3ml

-2) Agua destilada-----25ml

Calentar hasta que hierva y se disuelve bien

el agar, entonces mezclar 1) y 2)

Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente

**HEX (Murphy et al., 1990)**

Pesar:

-ATP-----0.25g  
 -D (+) Glucosa-----5g  
 -DPN (=NAD)-----20mg  
 -NBT-----10mg

Añadir.

-0 2M Tris-HCL pH 8.0-----50ml  
 -0 1M MgCl2-----1ml  
 -Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa-----80u  
 -PMS 1%-----0.5ml  
 Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente

**RUB**

Pesar

-Fast Black K salt-----0 2g

Añadir

-Metanol-----50ml  
 -Acido acético glacial-----10ml  
 Incubar por una hora a temperatura ambiente.

**ADH**

Pesar

-DPN (=NAD)-----10mg  
 -NBT-----10mg

Añadir:

-0 2M Tris-HCL pH 8.0-----40ml  
 -Etanol al 95% ó 100%-----5ml  
 -PMS 1%-----0.5ml  
 Incubar en la obscuridad a 30 C

**SOD**

Pesar.

-Glucosa-----0.5g

Añadir

-0 2M Tris-HCL pH 8.0-----50ml  
 -DPN 1%-----3ml  
 -NBT 1%-----1ml  
 -PMS 1%-----1ml

**LDH**

Pesar

-1) DPN (=NAD)-----10mg  
 - MTT-----5mg  
 - PMS-----5mg  
 -2) Agar-----500mg

Añadir.

- 1) 0.05M Tris-HCL pH 8.0-----25ml
- Acido DL-Láctico-----2ml
- 2) Agua destilada-----25ml

Calentar hasta que hierva y se disuelva bien el agar.  
entonces mezclar 1) y 2) e incubar en la oscuridad a temperatura ambiente.

**MNR (Cheliak y Pitel, 1984)**

Pesar

- B- NADH (forma reducida)-----35mg
- NBT-----15mg
- Menadione-----35mg

Añadir

- 0.05M Tris-HCL pH 7.0-----75ml
- Incubar en la oscuridad

**AcPH (Hakim-Elahi,1976)**

Pesar

- Fast Garnet GBC salt-----75mg

Añadir.

- Buffer 1M de NaAc (acetato de sodio) pH 5  
-----4ml
- Agua destilada-----40ml
- MgCL<sub>2</sub> 10%-----1ml
- a-Naphthyl acid phosphate (sodium salt) 1%  
-----2ml

Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente

**EST (Hakim-Elahi,1976)**

Pesar

- Fast blue RR salt-----50mg
- a-Naftil acetato-----25mg

Añadir.

- Acetona-----2ml
- Agua destilada-----45ml
- Buffer de fosfatos pH 6.0-----5ml  
(fosfato de potasio dibásico y fosfato de potasio monobásico)

Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente

**NADPHDH**

Pesar

- NADH-----0.025g
- NBT-----0.020g

Añadir.

- 0.2M Tris-HCL pH 8.0-----50ml
- Incubar en oscuridad a 37 C

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

**IDH (Modificado por Soltis et al. 1983)**

Pesar.

- 1) Ac. isocitrónico, sal trisódica-----100mg  
 2) Agar-----0.36g

Añadir.

- 1) 0.2M Tris HCL pH 8.0-----25ml  
 1M MgCl<sub>2</sub> o al 10%-----1ml  
 1PN (=NADP) 1%-----0.75ml  
 MTT 1%-----0.5ml  
 PMS 1%-----0.025ml

- 2) 0.2M Tris-HCL pH 8.0-----30ml

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

Incubar en la oscuridad a 37C

**MDH (Modificada de Vallejos, 1983)**

Pesar

- DPN (=NAD)-----8mg  
 -NBT-----8mg  
 NaNC-----25mg

Añadir

- 0.2M Tris-HCL pH 8.0-----50ml  
 -1M DL- Malato pH 7.8-----5ml  
 -PMS 1%-----0.1ml

Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente.

Una vez mezclados los componentes de las recetas para cada enzima, se incuban los geles con estas mezclas generalmente a 37 grados centígrados y en la oscuridad