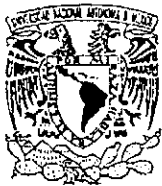


38  
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Estructura genética poblacional de  
Rhizophora mangle L. (Rhizophoraceae)  
en el Golfo de México y Mar Caribe

T E S I S

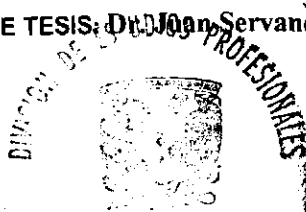
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIOLOGA

P R E S E N T A :

Amelia Cornejo Romero

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Juan Servando Núñez Farfán



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

26 3969



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:  
"Estructura genética poblacional de Rhizophora mangle L.  
(Rhizophoraceae) en el Golfo de México y Mar Caribe"  
realizado por Amelia Cornejo Romero  
con número de cuenta 8707310-2 , pasante de la carrera de Biología  
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Dr. Juan Servando Núñez Farfán

Director de Tesis

Propietario

Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns

Propietario

Dra. América Nitxin Castañeda Sortibrán

Propietario

M. en C. Beatriz Rendón Aguilar

Suplente

Biól. Roberto Arturo Cebrales Vargas

Suplente

*Juan Servando Núñez Farfán*

*Luis Enrique Eguiarte Fruns*

*América Nitxin Castañeda Sortibrán*

*Beatriz Rendón Aguilar*

FACULTAD DE CIENCIAS  
U.N.A.M. *Cebrales V.*

Consejo Departamental de Biología

*Edna María Suárez Díaz*

Dr. Edna María Suárez Díaz



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

A mi amorosa mamá

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Juan Servando Núñez Farfán la dirección de esta tesis y su apoyo constante durante la realización de la misma.

Al Dr. Luis E. Eguiarte, Dra. América Castañeda, M. en C. Beatriz Rendón y al Biól. Roberto Cabrales quiénes revisaron este trabajo, agradezco sus comentarios y su disposición para aclarar mis dudas siempre que lo solicité.

A la M. en C. Nidia Pérez Nasser por facilitarme material de laboratorio y por sus sugerencias para mejorar los geles de almidón.

A la Dra. Elena R. Álvarez-Buylla por auxiliarme en la interpretación de los geles y sus valiosas sugerencias.

Al Dr. Glenn Furnier por su disposición para aclarar mis dudas sobre los programas de computo empleados en el análisis de datos pero sobretudo agradezco sus comentarios siempre estimulantes.

A Juan Fornoni por ayudarme a hacer los mapas y scanear las imágenes de mi tesis, por discutir ampliamente las dudas que surgieron durante el trabajo y por su disposición a compartir sus conocimientos con los demás.

Agradezco a las personas que contribuyeron directa o indirectamente a la realización de esta tesis.

Por supuesto, agradezco a mi querida familia por creer en mí. A mis padres por su apoyo incondicional. A mis hermanos y hermanas por todo lo que compartimos, por quererme tanto y hacerme tan feliz.

También quiero agradecer a mis amigos Fernando, Liz, Ray, Alejandro, Elvira, Pancho, Salomón, Miguel Angel y también a Sarita por su apoyo y por hacer tan divertidos los momentos que hemos vivido juntos.

A Aida Castillo, Judith, Gina, Lalo Mendoza, Cecilia Sánchez, Noé Flores y Sofia por su amistad y compañerismo.

Este trabajo se realizo gracias al financiamiento de CONABIO (Proyecto de investigación B-214 y B-007).

Fundación UNAM me otorgó una beca para Licenciatura durante un año.

# ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| Resumen   | 1  |
| Abstract  | 2  |
| 1. Introducción   | 3  |
| 2. Antecedentes   | 6  |
| 3. Materiales y métodos   |    |
| a) Descripción de la especie, biología floral,<br>mecanismos de dispersión y distribución mundial | 13 |
| b) Sitios de estudio  | 17 |
| c) <i>Colección de las muestras</i>   | 20 |
| d) Electroforesis   | 20 |
| e) Análisis de datos  | 22 |
| 4. Resultados   |    |
| a) Determinación del sistema de corrimiento   | 33 |
| b) Frecuencias alélicas   | 34 |
| c) Diversidad genética  | 40 |
| d) Índices de Fijación y equilibrio de Hardy-Weinberg   | 41 |
| e) Tasa de entrecruzamiento en equilibrio   | 45 |
| f) Flujo génico   | 46 |
| g) <i>Índices de identidad y distancias genéticas</i>   | 48 |
| h) <i>Relaciones genéticas entre poblaciones</i>  | 49 |
| 5. Discusión  | 52 |
| 6. Conclusiones   | 58 |
| <br>  |    |
| Bibliografía  | 59 |
| Apéndice  | 65 |
| Buffer de extracción, sistemas de corrimiento y técnicas de tinción enzimática                    |    |

## RESUMEN

El estudio de los patrones de variación genética en especies con amplia distribución geográfica permite explorar el papel que juegan los procesos evolutivos e históricos sobre la estructura genética poblacional de dichas especies. En este estudio se analizó la estructura genética de ocho poblaciones de *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae) establecidas a lo largo de la costa del Golfo de México y Mar Caribe. El análisis se realizó con base en la variación de cuatro loci polimórficos, utilizando la técnica de electroforesis horizontal en gel de almidón. Los resultados obtenidos muestran que *R. mangle* es una especie tropical con poca diversidad genética ( $H_I = 0.058$  y  $H_S = 0.105$ ) y que las poblaciones no están en equilibrio de Hardy-Weinberg. El porcentaje de loci polimórficos y número promedio de alelos por locus son similares a los reportados en otras especies arbóreas tropicales ( $P = 27.75\%$ , y  $A = 1.31$ , respectivamente). Sin embargo, los coeficientes de endogamia son muy altos ( $F_{IS} = 0.478$ ) y las poblaciones están altamente diferenciadas entre sí ( $F_{ST} = 0.257$ ). La tasa de entrecruzamiento en equilibrio ( $t_{eq} = 0.2725$ ) indica que la mayor parte de los apareamientos son endogámicos (posiblemente por autofertilización dada la biología floral de la especie). El flujo génico entre las poblaciones es escaso (lo cual favorece la diferenciación) y no existe un patrón claro de aislamiento por distancia. Estos resultados señalan que la deriva génica es la principal fuerza evolutiva que determina la distribución espacial y temporal de la variación genética en *R. mangle*. Gran parte de la diversidad genética de la especie se encuentra entre sus poblaciones. Por consiguiente, la pérdida de dichas poblaciones debido a las actividades antropogénicas significa la reducción de la diversidad genética de *R. mangle*.

## ABSTRACT

The analysis of the genetic structure of species with broad geographic distribution, allows us to understand how the evolutionary processes and history events determine current patterns of genetic variation. In this work we surveyed the genetic variability of eight populations of *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae) from the coast of Gulf of Mexico and Caribbean Sea. Horizontal starch gel electrophoresis was used to analyse the genetic variation on four polymorphic loci. Results indicated a low genetic variation ( $H_I = 0.058$  and  $H_S = 0.105$ ) and the populations of *R. mangle* are not at Hardy-Weinberg equilibrium. Polymorphic loci and mean number alleles per locus were similar to data reported for other tropical trees ( $P = 27.75\%$  and  $A = 1.31$ , respectively). However the fixation index and interpopulation differentiation were very high ( $F_{IS} = 0.473$  and  $F_{ST} = 0.257$  respectively). The equilibrium outcrossing rate ( $t_{eq} = 0.2725$ ) suggest a high fraction of inbreeding (probably by selfing). Gene flow was low and no pattern of isolation by distance was detected. These results indicate that genetic drift could be the principal evolutionary force responsible for the genetic structure of *R. mangle*. Most genetic diversity occurs between rather than within populations, indicating the we might expect that the loss of one or more populations will ultimately reduce the species genetic diversity.



## INTRODUCCIÓN

Los manglares son el principal tipo de vegetación de los sistemas estuarinos tropicales, deltas de ríos y lagunas costeras, aunque también son capaces de establecerse en líneas costeras e islas.

Las comunidades de manglar están constituidas por árboles y arbustos que poseen una morfología especializada (raíces aéreas, neumatóforos lenticelas y viviparidad) y mecanismos fisiológicos (excretan sales), que les permiten habitar sitios inundables sujetos a cambios constantes de salinidad (Tomlinson, 1994).

Debido a que los manglares se desarrollan en la interfase tierra-mar establecen relaciones interdependientes tanto con los sistemas marinos adyacentes como con el ambiente terrestre. Los principales "servicios ecológicos" de los manglares a los sistemas circundantes incluyen: el mantenimiento de hábitats costeros y la provisión de alimento a organismos de diferentes niveles tróficos dentro de los cuales se incluyen especies de importancia económica. También juegan un papel importante en el mantenimiento de la calidad del agua y la estabilidad de la línea costera, ya que controlan la distribución de nutrientes y la sedimentación en estuarios y lagunas costeras (Mooney *et al.* 1995).

La extensión de los manglares está limitada a las zonas intermareales de las regiones tropicales y subtropicales del mundo, la cual abarca un área total de 240 000 km<sup>2</sup> (Mooney *et al.* 1995).

Las comunidades mexicanas de manglar se desarrollan en las costas del Pacífico, Golfo de México y el Mar Caribe. Aunque solamente están formadas por cinco especies de mangles estrictos (*Rhizophora mangle*, *R. harrisonii*, *Avicennia germinans*, *Laguncularia racemosa*, y *Conocarpus erecta*) su amplia distribución geográfica y latitudinal da como resultado una amplia variación en la estructura y en la riqueza de especies entre comunidades (véase Trejo-Torres *et al.* 1993; Lot-Helgueras *et al.* 1975)

Los estudios que se han realizado sobre los ecosistemas mexicanos de manglar incluyen, estudios florísticos, morfológicos, fisiológicos, demografía, estudios

geomorfológicos, y de productividad primaria, (Vázquez-Yáñez, 1980; Lot y Novelo, 1990; Flores-Verdugo, *et al.* 1992; Yañez-Aranciba, 1993; Trejo-Torres *et al.* 1993). Hasta ahora, en México, solamente se ha reportado un estudio con un enfoque genético que permite conocer la diversidad a nivel intraespecífico de las especies que constituyen estos ecosistemas (McMillan, 1986). Sin embargo, no existen estudios de este tipo donde se considere la mayor parte del rango de distribución geográfica de dichas especies. La amplia distribución geográfica de *Rhizophora mangle* permite analizar los mecanismos evolutivos e históricos que moldean la estructura genética actual de esta especie.

Mediante la genética de poblaciones es posible evaluar el efecto de diferentes mecanismos de transmisión genética, condiciones ecológicas y fuerzas evolutivas (sistemas reproductivos, deriva génica, flujo génico, selección natural y mutación) que moldean la composición y estructura (espacial y temporal) genética de las poblaciones (Garay, 1991).

La falta de información sobre la estructura genética de poblaciones vegetales es un problema serio, ya que para comprender la especiación, adaptación o los cambios genéticos deben tomarse en cuenta los patrones genéticos y los procesos por los cuales éstos son modificados. Además, el conocimiento de los niveles de diversidad y la estructura genética de las poblaciones es un prerequisite necesario para hacer diseños eficientes de las zonas de conservación de tal manera que preserven los niveles máximos de diversidad genética (Loveless y Hamrick, 1984).

Este estudio forma parte del proyecto de investigación "Ecología evolutiva de *Rhizophora mangle* en las costas de México" y abarca la mayor parte del ámbito de distribución de los manglares en ambas costas de México: Golfo de México y Mar Caribe (Atlántico) y Océano Pacífico. En dicho estudio se analizó la estructura de las comunidades mexicanas de manglar y el estado de conservación de éstas. Asimismo se hizo el análisis de morfología floral y la estructura genética a fin de determinar los mecanismos evolutivos e históricos que han actuado sobre las poblaciones de manglar y en particular de *Rhizophora mangle*.

Así el objetivo general de este estudio fue:

Analizar la estructura genética de diversas poblaciones de *Rhizophora mangle* establecidas en la región del Atlántico, para determinar los mecanismos evolutivos e históricos que actúan sobre dicha especie.

La hipótesis que se formuló fue la siguiente:

Dado que *Rhizophora mangle* es una especie

- a) colonizadora,
- b) en la que la mayor parte de los apareamientos se dan por endogamia, es probable que la principal fuerza evolutiva que moldea la estructura genética de las poblaciones sea la deriva génica. En consecuencia, se espera que los niveles de diversidad genética sean bajos y que exista diferenciación interpoblacional.

Los objetivos particulares fueron:

- a) Cuantificar las frecuencias genotípicas y alélicas de las poblaciones de *Rhizophora mangle* por medio del sistema de loci polimórficos adecuado para analizar la diversidad genética.
- b) Estimar los niveles de endogamia, flujo génico, distancias genéticas, para determinar la importancia de las distintas fuerzas evolutivas y factores históricos que determinan la estructura genética actual de *Rhizophora mangle*.

Dada la importancia de las comunidades de manglar y en particular, de sus especies constitutivas, es necesario generar información acerca de los niveles de diversidad que estas especies albergan. De esta manera será posible establecer prioridades de conservación con base en los atributos genéticos de dichas especies.

## ANTECEDENTES

La estructura poblacional está conformada por la estructura demográfica y la estructura genética. La estructura genética permite comprender los patrones de variación genética y su posible relación con factores históricos así como la posible dirección que estos patrones pueden tener a mediano y largo plazo.

Con base en marcadores hereditarios –como isoenzimas y secuencias de ADN, es posible obtener las frecuencias genotípicas y alélicas presentes dentro de las poblaciones de una especie (que son los estimadores básicos de la variación genética), a fin de establecer los patrones espaciales y temporales de la variación genética de una especie.

La electroforesis de isoenzimas es una técnica que ha sido utilizada ampliamente desde la década de los 60's para analizar la diversidad genética en diversos organismos desde bacterias e insectos, hasta mamíferos y plantas. Gracias a la electroforesis es posible conocer la variación de muchos individuos y analizar varios genes al mismo tiempo. Es una técnica barata comparada con las técnicas de hibridación y secuenciación de ADN, aunque en éstas últimas se analiza directamente el ADN (Murphy *et al.* 1990)

Los genes que codifican proteínas tienen dos propiedades que les confieren ciertas ventajas como marcadores genéticos: una fracción significativa de estos genes son polimórficos en la mayoría de los organismos y los alelos son codominantes en la mayoría de los casos, lo cual permite relacionar los fenotipos observados (electromorfos) con genotipos (Weeden, 1989; Castañeda, 1996).

La genética de poblaciones es el estudio de cómo las leyes de Mendel y otros principios de la Genética se aplican a poblaciones enteras. Tiene como objetivos principales comprender y predecir el efecto de los procesos que generan variabilidad genética (segregación, recombinación, transposición y mutación), al mismo tiempo pondera el papel que juegan los factores ecológicos y evolutivos como modificadores de la composición y estructura genética de las poblaciones. Un estudio semejante es esencial para comprender apropiadamente la evolución debido a que ésta es el

resultado del cambio progresivo en la composición genética de una población (Hartl y Clark, 1989).

Con base en los numerosos estudios realizados hasta ahora ha sido posible establecer algunas tendencias sobre la forma en que se distribuye la variación genética en poblaciones vegetales. Así, se sabe que existe una correlación entre las características de historia de vida y la distribución de la diversidad genética. La forma de vida y sistema de apareamiento tienen una influencia significativa sobre la diversidad genética y su distribución. En general, las especies leñosas de vida larga mantienen los niveles de diversidad genética más altos dentro de especies y poblaciones pero presentan menos diferenciación genética entre sus poblaciones que especies con otras formas de vida (herbáceas y perennes de vida corta). Las especies con sistemas de entrecruzamiento presentan menos diferencias genéticas entre sus poblaciones que especies con sistemas de autofertilización tales como las herbáceas anuales. (Hamrick *et al.* 1990,1996) .

Entre especies colonizadoras, algunos autores establecen que éstas se caracterizan por presentar niveles de diversidad genética depauperados y una marcada diferenciación interpoblacional así como poliploidía y sistemas reproductivos uniparentales (Barret, 1989; Barret y Shore, 1989; Barret y Husband; 1990).

Los cuellos de botella, eventos de fundador y la deriva génica juegan un papel determinante en la estructura genética de especies colonizadoras. Asimismo, un flujo génico escaso y las presiones de selección en los nuevos ambientes son factores que pueden llevar a la pérdida de la variación genética durante los eventos de colonización, particularmente cuando éstos se llevan a cabo a grandes distancias (Barret y Shore, 1989; Barret y Husband; 1990).

Durante los eventos de colonización frecuentemente sólo una parte de la información genética de la especie está representada en los individuos colonizadores. Si la población es suficientemente pequeña y se mantiene así durante largos periodos, puede experimentar deriva génica, como consecuencia, uno de los alelos de locus polimórficos se fijan y disminuirá la riqueza alélica, además aumentará la endogamia y se incrementará la diferenciación poblacional (Barret y Husband; 1990).

La mayor parte de los estudios realizados en especies colonizadoras están enfocados en herbáceas malezas o especies de importancia económica (Barret y Shore, 1989; Moran y Marshall, 1978) y existen unos cuantos estudios realizados en especies colonizadoras arbóreas como es el caso de *Acacia mangium* (Moran *et al.* 1989) y *Cecropia obtusifolia* (Álvarez-Buylla y Garay, 1994). En ésta última se encontraron niveles de diversidad altos, el patrón de variación genética observado se atribuye en parte, al sistema de apareamiento de la especie que es por entrecruzamiento.

Por otra parte, en años recientes, se han realizado varios estudios para caracterizar la variación genética en poblaciones naturales de árboles tropicales, usando isoenzimas como marcadores genéticos (Hamrick y Loveless 1986; Hamrick, 1993). Estos estudios revelan que árboles y arbustos generalmente presentan altos niveles de diversidad genética, y que la mayor parte de ésta se encuentra dentro de las poblaciones, por lo tanto, hay poca diferenciación interpoblacional (Hamrick y Loveless, 1986; Eguiarte *et al.* 1992; Hamrick 1993; Pérez-Nasser *et al.* 1993; Álvarez-Buylla y Garay, 1994).

No obstante, la mayoría de estos estudios examinan la variación genética a escala local, en poblaciones separadas por unos cuantos kilómetros (Sytsma y Schaal, 1985; Hamrick y Loveless, 1986; Hamrick y Godt, 1990; Eguiarte *et al.* 1992; Pérez-Nasser *et al.* 1993; Álvarez-Buylla y Garay, 1994). A la fecha, la estructura genética de especies tropicales que ocupen un rango amplio de distribución geográfica permanece prácticamente desconocido (Chase *et al.* 1995a, 1995b).

Entre los pocos estudios que han determinado la estructura genética de especies con un amplio rango de distribución geográfica se pueden mencionar el de Buckley *et al.* (1988) en el que examinaron la variación genética en dos poblaciones distantes de nuez brasileña (*Bertholletia excelsa*), demostraron que la mayor parte de la variación se encontraba dentro de las poblaciones y que había muy poca diferenciación genética entre éstas. Por su parte, Chase *et al.* (1995a) examinaron once poblaciones del árbol *Cordia alliodora* en América Central, desde Guatemala hasta Costa Rica, y también registraron bajos niveles de diferenciación entre poblaciones. En contraste, Moran *et al.* (1989) encontraron bajos niveles de diversidad

genética en especies tropicales de *Acacia* establecidas desde los bosques ribereños hasta sabanas abiertas en Australia y Papua, Nueva Guinea. Hall *et al.* (1994) examinaron la distribución de la variación genética en *Pentaclethra macroloba* en Costa Rica y reportaron que la diferenciación genética entre las poblaciones explicaba el 21.9% del total de la variación genética.

Con respecto a los estudios de diversidad genética realizados en mangles estrictos, sólo se han reportado dos. Goodall y Stoddart (1989), realizaron un estudio para establecer el mejor buffer de extracción de proteínas en varias especies australianas de la familia Rhizophoraceae. En el caso de *Rhizophora stylosa* se analizó la diversidad genética y encontraron que ésta fue muy baja. McMillan (1986) por su parte, estudió la variación de la diversidad genética en tres regiones donde se establece el mangle negro *Avicennia germinans*; reporta variaciones entre regiones (el Golfo de México, el Caribe, Centro América y una población panameña establecida en el Pacífico), pero no entre las poblaciones que constituyen dichas regiones.

*Rhizophora mangle* es la especie más abundante de las comunidades que se desarrollan en la costa del Golfo de México, y llega a constituir del 51 al 81% de los individuos presentes en región (Núñez-Farfán *et al.* 1996). Según el registro palinológico *R. mangle* ha sido el principal componente de la vegetación en los manglares del Neotrópico desde el Eoceno, hace aproximadamente 50 millones de años (Graham, 1995)

Después de que se formó el Istmo de Panamá (alrededor de 3.5 millones de años), la dinámica de los procesos de colonización y extinción de las poblaciones de manglares establecidas en las costas del Atlántico ha sido compleja (Domínguez *et al.* 1998). Toledo (1982) propone que, a consecuencia de la reducción en la temperatura promedio (4-5°C) durante el Pleistoceno (hace aproximadamente 12 000-20 000 años), el límite norte de la distribución de los manglares se redujo de 29°N a 21°N en el Océano Pacífico y de 23°N a 19°N en las costas del Atlántico. Por lo tanto la distribución norte actual de *Rhizophora mangle* en México es resultado de la reciente recolonización de las poblaciones sureñas que probablemente fueron menos afectadas por la reducción en la temperatura (Domínguez *et al.* 1998).

Hamrick *et al.* (1992) señalan que los factores históricos tienen un papel determinante sobre la diversidad genética de poblaciones vegetales. Las especies leñosas originadas a partir de un número limitado de individuos, poblaciones aisladas, o bien especies que hayan experimentado cuellos de botella severos pero que actualmente tienen una distribución amplia pueden tener una diversidad genética baja. Dado que *R. mangle* ha experimentado procesos de extinción y colonización, en el pasado reciente, su diversidad genética puede estar afectada considerablemente por dichos procesos.

En lo que respecta a la estructura, composición de especies y aspectos funcionales de manglares mexicanos puede decirse que éstos son muy heterogéneos (Lot y Novelo, 1990; Flores-Verdugo *et al.* 1992;).

El análisis de la estructura de la comunidad realizado por Núñez-Farfán *et al.* (1996) mostró una amplia variación en los componentes de la estructura de la comunidad (abundancia, área basal, altura, etc.), índice diversidad y composición florística de los 12 sitios muestreados a largo de las costas del Pacífico y el Atlántico (Tabla 1), lo cual refleja la capacidad que poseen las especies que los constituyen para desarrollarse en condiciones hidrológicas y edáficas muy diversas.

Tabla 1. Riqueza y composición florística (individuos con DAP  $\geq$  1 cm) de las comunidades de manglar estudiadas. (Tomado de Núñez-Farfán *et al.* 1996).

| LOCALIDAD    | ESTADO       | Ag | Ce | Lr | Rm | Rb | F1 | F2 | L1 | Pa | H1 | S |
|--------------|--------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|
| Bahía Kino   | Sonora       | +  | -  | -  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | 2 |
| Topolobampo  | Sinaloa      | +  | -  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | 3 |
| San Blas     | Nayarit      | +  | -  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | 3 |
| Chacagua     | Oaxaca       | +  | -  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | 3 |
| Chantuto     | Chiapas      | +  | -  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | 3 |
| Tamiahua     | Veracruz     | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | +  | 5 |
| Sontecomapan | Veracruz     | +  | -  | -  | +  | -  | +  | +  | -  | -  | -  | 4 |
| Centla       | Tabasco      | +  | +  | +  | +  | +  | -  | -  | +  | +  | -  | 7 |
| Carmen       | Campeche     | +  | -  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | 3 |
| Celestún     | Yucatán      | +  | -  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | 3 |
| Ría Lagartos | Yucatán      | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | 4 |
| Punta Allen  | Quintana Roo | +  | +  | +  | +  | -  | -  | -  | -  | -  | -  | 4 |

+ presente; - ausente

Ag *Avicennia germinans*; Ce *Conocarpus erecta*; Lr *Laguncularia racemosa*; Rm *Rhizophora mangle*; Rb *Rhabdadenia biflora*; F1 *Ficus sp.1*; Ficus sp.2; L1 *Lonchocarpus sp*; Pa *Pachira acuatica*; H1 no determinada. S: riqueza de especies



Dado que los manglares se desarrollan en la interfase tierra-mar, su importancia como ecosistema radica, sobre todo, en sus propiedades de tipo funcional y sus "servicios ambientales". Los principales atributos funcionales que determinan la importancia ecológica de los manglares incluyen los siguientes (Mooney *et al.* 1995):

1. Juegan un papel predominante en el mantenimiento de la calidad del agua y estabilidad de la costa a través del control de la distribución de los nutrientes y sedimentos en las aguas estuarinas
2. Su importancia debido a su capacidad de almacenamiento de carbono en el tejido vegetal
3. El contenido de carbono orgánico en el suelo, por lo general es muy alto
4. Los manglares constituyen el hábitat y refugio de una gran diversidad de organismos de diferente nivel trófico y pueden constituir hasta el 75% del alimento de varios heterótrofos
5. Operan como refugio de muchas especies animales migratorias y locales
6. Juegan un papel crítico como sistemas formadores y estabilizadores de suelos
7. Controlan la erosión por mareas
8. Funcionan como filtro de algunos contaminantes

Por otra parte, se reconoce que las comunidades de manglar son muy sensibles a perturbaciones naturales, por la acción de huracanes y tormentas, como a los efectos destructivos de las actividades económicas del hombre. Algunos estudios sugieren que, a nivel global, los manglares afrontan una destrucción significativa y en el menor de los casos, alteración marcada. La mejor recopilación y análisis del estatus de conservación de los manglares a nivel mundial señala que estos ecosistemas han sido alterados en magnitudes considerables (Saeng *et al.* 1983; Mooney *et al.* 1995).

A pesar de su gran importancia ecológica y la extensión geográfica que ocupa los manglares en México, los resultados arrojados por este proyecto de investigación, señala que éstos se encuentran altamente amenazados. La tasa promedio de deforestación anual para las comunidades de manglar estudiadas es 7.29% (en total se analizaron 23 sitios, que abarcan la mayor parte del ámbito de distribución de este ecosistema en todo el país) que es varios ordenes de magnitud mayor a las tasas de

deforestación reportadas para los bosques de coníferas (0.64%), bosques de latifoliadas (0.67%), selvas tropicales secas (1.9%) y selvas tropicales húmedas (2%). Asimismo la tasa de deforestación nacional 1.29% anual es seis veces menor que el valor promedio de los manglares de México (Núñez-Farfán *et al.* 1996).

La extensión inicial ocupada por los manglares (área base) de este estudio fue de 829,986.34 ha, las cuales se redujeron a 395,570.24 ha (área final) en un intervalo promedio de 14 años (Núñez-Farfán *et al.* 1996). Es decir,  $\approx 47.66\%$  de la cobertura inicial se ha perdido. Aunque las tasas de deforestación encontradas para el Golfo de México (4.46%), Mar Caribe (4.99%) y Pacífico (4.50%), no difieren significativamente. Esta pérdida es comparable a la reportada para los manglares de Tailandia e Indonesia (50%), y Malasia (30%) (Mooney *et al.* 1995).

Entre las principales causas de la deforestación del manglar están los desarrollos turísticos y urbanos incluyendo los desarrollos carreteros que son construidos sin considerar los flujos de agua que alimentan a los manglares. Con el desarrollo turístico de las costas, en forma de complejos hoteleros, condominios, restaurantes y tiendas, se han rellenado extensas áreas de manglar, eliminando completamente este ecosistema (Trejo-Torres *et al.* 1993). La conversión del manglar a zonas camaroneras también tiene un efecto igualmente devastador sobre los manglares debido a que se deforestan grandes extensiones que traen como consecuencia la alteración de la calidad del agua. En Yucatán la actividad salinera ha provocado la destrucción de grandes extensiones de manglares de franja lagunar como sucede en los bordes de Ría Lagartos (Trejo-Torres *et al.* 1993). Las actividades agrícolas en las zonas más distales del frente del manglar, lo afectan gradualmente generando su deforestación. Los manglares en numerosas ocasiones, se presentan como comunidades monoespecíficas, lo cual los hace muy atractivos para su explotación forestal.

Tan sólo por las funciones que cumplen en los ecosistemas tropicales, los manglares debieran ser protegidos y utilizados de manera sostenible (Mooney *et al.* 1995).

# MATERIALES Y METODOS

## LA ESPECIE DE ESTUDIO

### *Rhizophora mangle*

Crece como árbol o arbusto según las condiciones ambientales alcanzando hasta 30 m de alto. En la Laguna de Sontecomapan, Veracruz alcanza tallas de hasta 30 m de alto y 50 cm de diámetro a la altura del pecho (Núñez-Farfán com. pers.). Típicamente es la especie ubicada en la parte de manglar con mayor influencia de agua salada (*frente del manglar*) y en la que el nivel de inundación es mayor.

Presenta raíces aéreas extensamente desarrolladas que forman un complejo sistema de arcos o columnas.

La corteza posee lenticelas hipertrofiadas en las partes sumergidas de tallos y raíces (Tomlinson, 1994; Ángeles, 1997). La corteza externa es de color claro, fisurada, reticulada que se desprende fácilmente en escamas, dejando una depresión cóncava donde se puede ver el color rojo intenso de la corteza interna. Por su elevado contenido de esclereidas y fibras, la corteza interna es de consistencia granulosa (Ángeles, 1997).

Las hojas son simples, decusadas, aglomeradas en las puntas de las ramas; las láminas son de 8-13 cm de largo y 4-5.5 cm de ancho oblanceoladas o elípticas, con el margen entero, y el ápice agudo a obtuso; la base es aguda o ligeramente decurrente (Vázquez-Yanes, 1980). Las hojas son verde oscuras en el haz y verde amarillentas, con abundantes puntos negros en el envés; la nervación es inconspicua; los pecíolos son ligeramente alados, de 1 a 1.2 cm, y glabros.

Las flores hermafroditas se distribuyen en pares axilares, sobre pedúnculos glabros de 2-4 cm, con pedicelos glabros de 5-25 mm. Las flores son actinomorfas, de 2 a 2.5 cm de diámetro; con cáliz amarillo verdoso, ligeramente tubular en la base, con un lóbulo de 1 a 1.2 cm de largo, los sépalos son angostamente triangulares, agudos, valvados y glabros; los pétalos tienen la mitad inferior blanca y la superior moreno rojiza, de casi 1 cm de largo, angostamente lanceolados, agudos, lanudos en la superficie; los ocho estambres son pardos de aproximadamente de 7 mm de largo;

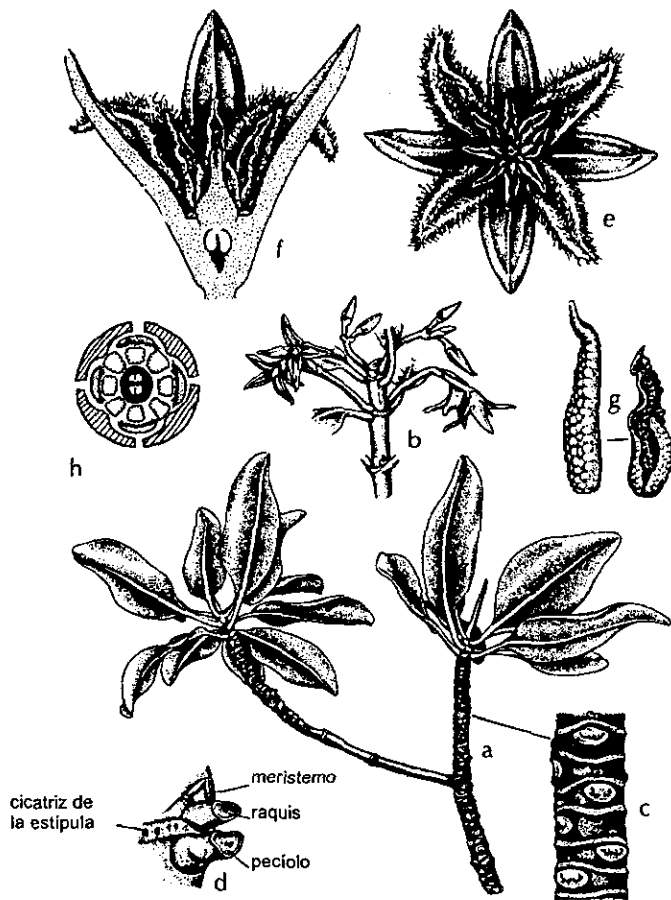


Figura 1. *Rhizophora mangle* (a) tallo ramificado; (b) tallos con inflorescencias axilares; (c) detalle del patrón de cicatrices de un tallo terminal; (d) nodo con meristemo, raquis y peciolo; (e) flor; (f) flor, corte longitudinal; (g) estambres dehiscentes e indehiscentes; h) diagrama floral. (Tomado de Tomlinson, 1994).

las anteras son pardas, alargadas, sésiles, glabras; el ovario es semi-ífero, bilocular, de lóculos biovulares, glabro, acabando en un estilo con dos lóbulos estigmáticos angostos, más corto que los estambres (Figura 1).

Una sola semilla germina en el interior del fruto (ovoviparidad) produciendo una radícula gruesa y verde que llega a medir 10-20 cm de largo, con la punta morena, con grandes lenticelas circulares de color crema a pardo (Ángeles, 1997).

### **Biología floral, sistema reproductivo y mecanismos de dispersión**

En general se sabe muy poco acerca de la biología floral, polinización y sistemas reproductivos del género *Rhizophora*, a pesar de que el conocimiento de los mecanismos florales y aislamiento genético son prerequisites importantes para el estudio de dispersión, establecimiento y la estructura genética poblacional. Los limitados estudios han sido enfocados a la morfología floral y mecanismos de polinización. Asimismo los registros de visitantes florales y polinizadores son escasos (Tomlinson, 1994).

En el caso de *R. mangle* la floración ocurre a través de todo el año, presentándose mayor abundancia de flores en primavera y verano (Vázquez-Yanez, 1980). Al parecer *R. mangle* es polinizada principalmente por viento, ya que presenta las características típicas de especies anémofilas (proporción polen/óvulo alta, polen ligero, ausencia de olor, ausencia de recompensa que no sea el polen, polen efímero y flores invertidas). Sin embargo, el estilo no está elaborado como los de las flores que son anémofilas y el estigma no está diseñado para capturar polen. Por otra parte, existen registros de algunos visitantes florales (Tomlinson, 1994).

Kress (1975), Teas y Handler (1979) (en Lowenfeld y Klekowski, 1992), mediante experimentos que excluían insectos demostraron que éstos no son necesarios para la polinización. El polen está contenido en sacos polínicos septados que dehiscen dentro de la yema floral. No han sido encontradas flores abiertas con sacos polínicos indehiscentes.

La morfología floral *R. mangle*, favorece la autopolinización lo que trae como consecuencia altos niveles de endogamia (Dominguez *et al.* en prensa). Los resultados

de los estudios realizados por Lowenfeld y Klekowski (1992) indican que el sistema de apareamiento de *R. mangle* es predominantemente por autofertilización.

Con base en familias de embriones cuyos árboles parentales son heterocigotos para el fenotipo albino (embriones deficientes en clorofila), determinaron las proporciones de segregación en poblaciones de Florida y Puerto Rico. En caso de que los apareamientos sean producto de autofertilización la proporción esperada de homocigos recesivos letales es del 25% (proporción 3:1) y el coeficiente de endogamia es  $F=0.5$  para cada familia de embriones. Obtuvieron una proporción del 23.8% y el 17.8% de embriones albinos por árbol heterocigoto para Florida y Puerto Rico, respectivamente y los coeficientes de endogamia mínimos correspondientes fueron de  $F=0.467$  y  $F=0.356$  (éstos últimos resultados son muy altos para especies arbóreas). Es decir, en Florida el 95.5% de los embriones fueron el resultado de autofertilización, mientras que en Puerto Rico el 71.2%.

Por otra parte dado que algunas especies colonizadoras son capaces de establecerse como individuos aislados alejados de la planta madre, Primack y Tomlinson (1980), sugieren que algunos mangles, incluyendo *Rhizophora mangle*, pueden ser autocompatibles.

Las unidades de dispersión de *R. mangle* son las plántulas, las cuales tienen la habilidad de flotar y mantener la viabilidad por largos períodos (alrededor de un año). Estas características les confieren un potencial de dispersión a larga distancia. Sin embargo, la mayoría de las plántulas se establecen cerca de la planta madre (Rabinowitz, 1978). De hecho, se ha sugerido que la dispersión a larga distancia y la colonización de nuevos sitios son procesos más bien esporádicos en los que intervienen un número reducido de individuos (Primack y Tomlinson, 1980; Tomlinson, 1994).

### **Distribución mundial**

La distribución de *Rhizophora mangle* está restringida a las zonas intermareales de las lagunas costeras. En el Océano Pacífico se distribuye desde México hasta el norte de Ecuador, mientras que en la costa occidental del Atlántico va desde México hasta Brasil

y existen poblaciones en Africa desde Angola hasta Mauritania (Tomlinson, 1994). *Rhizophora mangle* se distribuye a lo largo de ambas costas de nuestro país, desde Tamaulipas y Baja California, hasta Quintana Roo y Chiapas formando junto con otras dos o a veces tres especies de otros mangles asociaciones conocidas como manglares de *R. mangle* en las lagunas y esteros. El límite norte de la distribución en México está casi a los 24° de latitud norte en el Atlántico, y a los 29° en el Pacífico (Figura 2).

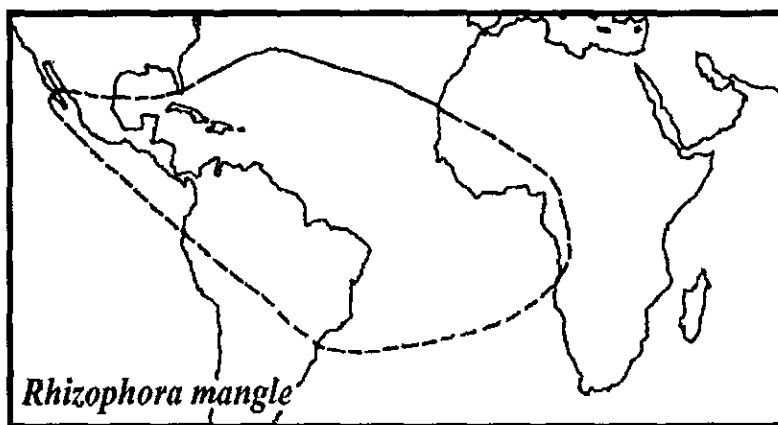


Figura 2. Distribución mundial de *Rhizophora mangle* (Tomado de Tomlinson, 1994).

## SITIOS DE ESTUDIO

Con base en las principales unidades y complejos de bosques mexicanos de manglar definidos según la World Wild Life Foundation/The World Bank y en donde estuviera presente la especie de interés, *Rhizophora mangle*, se seleccionaron ocho localidades representativas del Atlántico (Tabla 2) (Demestein 1995).

Los sitios de estudio se eligieron con este criterio para comparar los resultados arrojados en este proyecto con otros estudios realizados en las mismas unidades de manglar, y pueda ser utilizado en las evaluaciones del estado de conservación de las

regiones ecológicas de América Latina y el Caribe. En la Figura 3 se muestra la ubicación geográfica de los ocho sitios de estudio.

Tabla 2. Complejos y unidades de bosque de manglar definidos según la WWF/World Bank con base en los cuales se eligieron los sitios de estudio de *Rhizophora mangle* ubicados en el Atlántico.

| COMPLEJO                    | UNIDAD                       | LOCALIDAD    | ESTADO       |
|-----------------------------|------------------------------|--------------|--------------|
| Mar de Cortés               | Costa del NW de México       | Bahía Kino   | Sonora       |
|                             | Costa del NW de México       | Topolobampo  | Sinaloa      |
|                             | Marismas Nacionales-San Blas | San Blas     | Nayarit      |
| Pacífico de América Central | Tehuantepec                  | Chacagua     | Oaxaca       |
|                             | Tehuantepec                  | Chantuto     | Chiapas      |
| Golfo de México             | Alvarado                     | Tamiahua     | Veracruz     |
|                             | Alvarado                     | Tuxpan       | Veracruz     |
|                             | Alvarado                     | Sontecomapan | Veracruz     |
|                             | Usumacinta                   | Centla       | Tabasco      |
|                             | Usumacinta                   | Carmen       | Campeche     |
| Yucatán                     | Petenes                      | Celestún     | Yucatán      |
|                             | Ria Lagartos                 | Ria Lagartos | Yucatán      |
|                             | Corredor Maya                | Punta Allen  | Quintana Roo |

Los sitios muestreados en el presente estudio se señalan en negrillas.

La temperatura y la precipitación anual promedio varían ampliamente entre los distintos sitios (Tabla 3). La vegetación, suelo y climas de cada región han sido descritas en detalle por Rzedowski, 1981; Lot y Novelo, 1990.

Tabla 3. Ubicación geográfica, temperatura media anual y precipitación anual promedio de todos los sitios de estudio.

| Localidad    | Longitud          | Latitud           | Temperatura anual promedio ( $^{\circ}$ C) | Precipitación anual promedio (mm/año) |
|--------------|-------------------|-------------------|--|---------------------------------------|
| Tamiahua     | 97 $^{\circ}$ 25' | 21 $^{\circ}$ 21' | 24.8                                       | 1352.4                                |
| Tuxpan       | 97 $^{\circ}$ 24' | 20 $^{\circ}$ 27' | 24.8                                       | 1352.4                                |
| Sontecomapan | 95 $^{\circ}$ 00' | 18 $^{\circ}$ 33' | 24.3                                       | 2016.9                                |
| Centla       | 92 $^{\circ}$ 27' | 18 $^{\circ}$ 28' | 26.6                                       | 1560.2                                |
| Carmen       | 91 $^{\circ}$ 44' | 18 $^{\circ}$ 38' | 26.7                                       | 1540.4                                |
| Celestún     | 90 $^{\circ}$ 20' | 20 $^{\circ}$ 52' | 26.4                                       | 725.5                                 |
| Ria Lagartos | 88 $^{\circ}$ 03' | 21 $^{\circ}$ 35' | 25.6                                       | 550.1                                 |
| Punta Allen  | 87 $^{\circ}$ 26' | 19 $^{\circ}$ 48' | 29.9                                       | 1106.3                                |



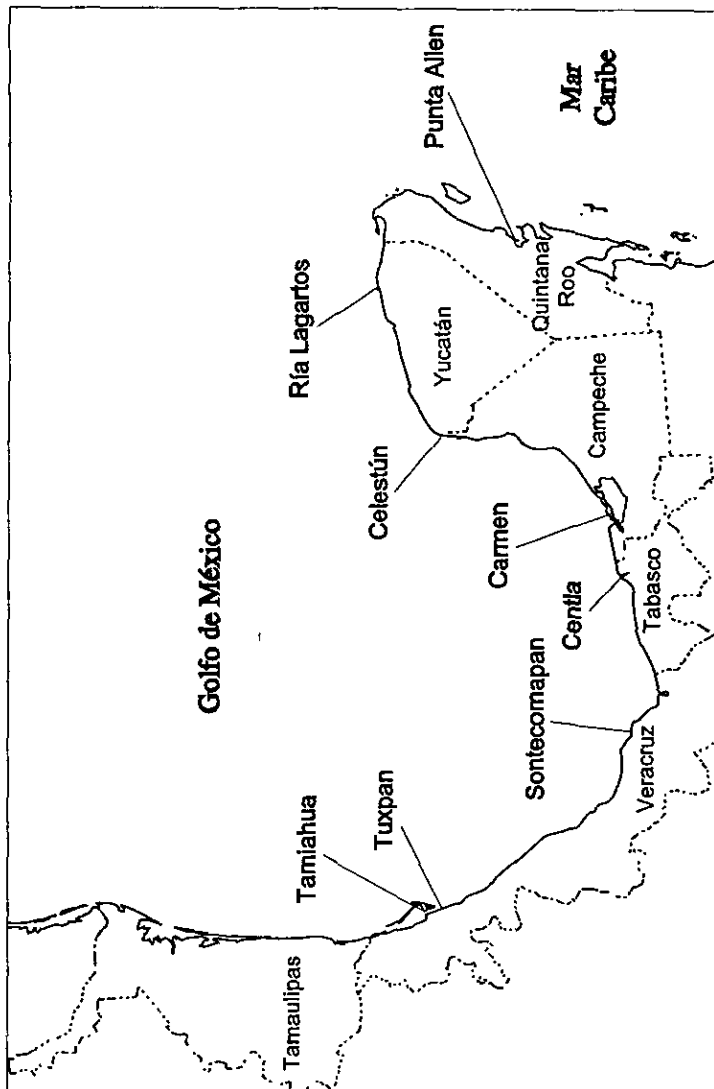


Figura 3. Ubicación geográfica de las poblaciones de *Rhizophora* mangle muestreadas en el Golfo de México y el Mar Caribe.

## COLECCION DE MUESTRAS

Las muestras de tejido foliar y embriones se colectaron en septiembre de 1994 y durante 1995. Las fechas en las que se llevó a cabo el muestreo de las localidades correspondientes a ocho poblaciones del Atlántico se efectuaron del 5 al 12 de septiembre de 1994 en el caso de Sontecomapan, Centla y Carmen; del 25 al 8 de marzo de 1995 se hizo la colecta de Celestún, Ría Lagartos y Punta Allen, finalmente los muestreos de Tamiahua y Tuxpan se realizaron durante el 7 al 11 de septiembre de 1995.

Se colectaron hojas jóvenes y embriones de 50 individuos en cada localidad. El material vegetal fue colocado en bolsas de plástico con su respectiva etiqueta y sumergido en nitrógeno líquido hasta el momento de ser almacenado dentro de un ultracongelador a  $-70^{\circ}\text{C}$  en el Laboratorio de Genética Ecológica y Evolución, Instituto de Ecología de la UNAM.

## ELECTROFORESIS

La electroforesis de proteínas en gel de almidón, consiste en el movimiento de enzimas inmersas en una matriz homogénea, la cual se encuentra bajo la influencia de una corriente eléctrica. La movilidad de las enzimas en la matriz o gel depende de su carga, forma y tamaño. Gracias a esto es posible separar variantes de una misma enzima producto de loci diferentes (isoenzimas), así como enzimas determinadas por alelos de un mismo locus (aloenzimas) (Pasteur y Pasteur, 1988).

Las aloenzimas de una proteína reflejan cambios en la secuencia de aminoácidos. En un gel, se presentan como electromorfos con movilidades distintas. De tal manera, los electromorfos son asignados a alelos de un locus génico y sus frecuencias con frecuencias alélicas. Así, los fenotipos observados en los geles pueden ser interpretados en términos de genotipos, es decir, en términos de genes y sus alelos (Pasteur y Pasteur, 1988).

La electroforesis en gel de almidón tiene cuatro pasos fundamentales: 1) la extracción proteica, 2) la separación de las proteínas, 3) la tinción y 4) la interpretación de los geles.

1) La extracción de proteínas se realiza macerando tejido vegetal mediante un buffer de extracción apropiado. El buffer de extracción evita que las enzimas liberadas de los compartimentos celulares sean inactivadas por metabolitos secundarios como fenoles, taninos, quinonas, resinas, cumarinas e incluso carotenoides (Loomis, 1974). Los extractos obtenidos de cada individuo son absorbidos en papel filtro (wicks) y almacenados en tubos eppendorf dentro de un ultracongelador, hasta su uso posterior.

2) La separación de las enzimas tiene lugar una vez que los extractos son "cargados" en el gel el cual es sometido a un amperaje/voltaje específico durante un tiempo determinado.

3) Después se realiza la tinción, para ello es necesario cortar el gel en rebanadas de 2 mm de grosor. Cada rebanada es sumergida en una solución que contiene un sustrato específico y los cofactores necesarios, para que una única enzima lleve a cabo su reacción.

Los métodos histoquímicos de tinción hacen visible el producto de la reacción enzimática. Las técnicas de tinción más usadas identifican la transferencia de ión hidrógeno del sustrato a NAD o NADP (que pasan a ser NADH o NADPH). Estas reacciones son llamadas deshidrogenasas. El PMS es usado para transferir el ión  $H_2$  de NAD o NADP a alguna sal como MTT o NBT que se reduce dando lugar a formazan insoluble que aparece colorido en el gel, en el sitio donde la reacción tuvo lugar (para mayor información véase Conkle *et al.* 1982; Cheliak y Pitel, 1984; Pasteur y Pasteur, 1988; Soltis y Soltis 1989; Garay, 1991)

4) La interpretación de los geles se hace justo después de la tinción ya que es el momento de resolución óptima para algunas enzimas. Durante la lectura e interpretación genética de los geles es imprescindible tomar en cuenta la estructura cuaternaria de las enzimas. Por ejemplo, en organismos diploides los individuos heterocigotos presentan dos bandas para el caso de enzimas monoméricas y tres para diméricas. En este último caso un individuo con alelos distintos en cada cromosoma puede tener enzimas homodiméricas de uno u otro tipo (con las dos bandas extremas)

y enzimas heterodiméricas que generalmente corren a distancias intermedias entre las bandas de los homodímeros (Pasteur y Pasteur, 1988; Soltis y Soltis 1989; Garay,1991).

Para determinar el buffer de extracción que ofreciera la mejor resolución de los sistemas enzimáticos, se realizaron pruebas con los buffers de extracción reportados para la familia Rhizophoraceae de Australia (Goodall y Stoddart, 1989), el buffer empleado en *Cecropia obtusifolia* (Garay, 1991), una especie tropical con un alto contenido de metabolitos secundarios, y finalmente el buffer de extracción propuesto por Joshi *et al.* (1980) empleado en la extracción de enzimas fotosintéticas de manglares.

En cada gel se probó la actividad de varias enzimas buscando la mejor combinación de buffer de extracción y de corrimiento (sistemas gel-charola) para la expresión de los loci.

Se maceraron muestras de tejido foliar (aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>) en 200-300 µl de buffer de extracción en un mortero de acrílico. El extracto era absorbido en wicks de 1.5 cm de largo por 2 mm de ancho, éstos se almacenaban en un tiempo máximo de una semana para ser utilizados posteriormente en las electroforesis.

Una vez concluida la electroforesis se realizó la lectura de los geles y después se fotografiaron en fresco (en algunos casos se fotografiaron los geles ya fijados). En seguida los geles se fijaron en una solución 1:1 agua-alcohol durante veinticuatro horas. Posteriormente se etiquetaron y almacenaron debidamente dentro del refrigerador.

## ANALISIS DE DATOS

Una especie puede estar constituida por una sola población continua o bien por varias poblaciones. De tal modo, la diversidad genética total contenida dentro de las especies se analiza considerando la diversidad genética contenida en regiones, poblaciones e individuos dentro de las poblaciones. Para ello se han desarrollado varios estadísticos o descriptores de la variación genética.

Se distinguen dos tipos de descriptores: descriptores de la diversidad genética **dentro** de las poblaciones y descriptores de la **variación genética entre** poblaciones. Los primeros indican cuales son los niveles de diversidad genética contenida en las especies y los segundos sugieren cuales serían las fuerzas evolutivas que determinan la forma en que se distribuye esta diversidad genética entre las subpoblaciones.

### **Descriptores de la variación genética dentro de las poblaciones**

Estos incluyen el porcentaje de loci polimórficos, el número promedio de alelos por locus, el número efectivo de alelos por locus, la heterocigosis la esperada.

**Porcentaje de loci polimórficos (P)** . Un locus es llamado polimórfico cuando la frecuencia del alelo más común es menor o igual a 0.95 (Hedrick, 1983). También se considera que una enzima es polimórfica si el alelo más común no excede el 99% de la población o si simplemente se encuentra más de un alelo (Hedrick, 1983; Ledig, 1987).

Se obtiene dividiendo el número de loci polimórficos sobre el número total de loci analizados.

Un valor de cero indica que los loci muestreados son monomórficos y por lo tanto, no existe diversidad genética, mientras que un valor de uno indica que todos los genes muestreados son polimórficos.

**Número promedio de alelos por locus (A)**. Se obtiene dividiendo el número total de alelos observados entre el número total de loci dentro de una población. Es la medida básica de la variación genética y presenta la desventaja de ser muy sensible al tamaño de la muestra (Eguiarte, 1990).

**Número de alelos efectivos por locus ( $A_e$ )** es un análogo del índice de diversidad de Simpson ya que pondera la abundancia relativa de cada alelo. Se obtienen mediante la fórmula:

$$A_e = 1/\sum p_i^2$$

donde  $p_i$  es la frecuencia alélica del  $i$ ésimo alelo de ese locus

Este índice concede poca importancia a alelos raros y mayor importancia a los frecuentes. Un valor de cero indica un bajo número de alelos efectivos por locus (equivalente a baja diversidad genética).

**Heterocigosis esperada ( $H$ ).** Es la proporción estimada de loci (o genes) que se espera sean heterocigotos, de acuerdo con la ley del equilibrio Hardy-Weinberg<sup>1</sup>, en un individuo promedio. Para un locus dado con  $i$  alelos la heterocigosis esperada es igual a

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

donde  $p_i$  es cada una de las frecuencias alélicas para el locus  $i$  (Hedrick, 1983)

**La heterocigosis promedio  $\bar{H}$  esperada.** Es el promedio de la heterocigosis esperada sobre todos los loci estudiados dentro de una subpoblación (es equivalente a la  $\bar{H}_S$  utilizada en los coeficientes de endogamia).

Cuando no se registra variación en todos los loci este índice es igual a cero y cuando todos los loci son polimórficos con un número infinito de alelos con frecuencias alélicas iguales dentro de cada locus (p.e. 0.5 para un locus con dos alelos), la heterocigosis es igual a 1 (Álvarez-Buylla y Garay, 1994).

### **Descriptores de la variación genética entre poblaciones**

Un primer acercamiento al estudio de las posibles fuerzas evolutivas que moldean la composición genética de una población se da a través de la comparación entre las frecuencias genotípicas observadas en dicha población con aquellas esperadas en el equilibrio de Hardy-Weinberg (Garay, 1990).

---

<sup>1</sup> La ley del equilibrio de Hardy-Weinberg establece que en ausencia de cualquier fuerza evolutiva (deriva génica, selección natural, endogamia, mutación, flujo génico) las frecuencias genotípicas y alélicas permanecen constantes a través del tiempo. En cualquier generación, las frecuencias genotípicas esperadas serán  $p^2$ ,  $2pq$  y  $q^2$  para AA, Aa y aa respectivamente, para el caso de un locus con dos alelos.

Así, los descriptores de la variación genética entre poblaciones incluyen los índices de fijación de Wright (llamados también coeficientes de endogamia); flujo génico y patrón de aislamiento por distancia; similitud y distancias genéticas de Nei. A partir de éstas últimas se obtienen las relaciones genéticas que existen entre las poblaciones estudiadas.

**Índice de fijación de Wright ( $F$ ).** La endogamia desvía a las poblaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg hacia un exceso de homocigotos. Por consiguiente, este índice cuantifica la reducción en la heterocigosis observada ( $H_i$ ) de una población dada con respecto a una población con apareamientos al azar, es decir, la heterocigosis esperada ( $H_s$ ) en el equilibrio de Hardy-Weinberg con las mismas frecuencias alélicas (Hartl y Clark, 1989). Se define como:

$$F = 1 - (H_i / H_s)$$

Los valores de  $F$  igual a cero indican que la población está en equilibrio de Hardy-Weinberg. Valores de  $F$  mayores que cero indican un exceso de homocigotos con respecto a una población con apareamientos al azar y valores menores que cero indican un exceso de heterocigotos con respecto a una población con apareamientos al azar (Álvarez-Buylla y Garay, 1994).

El índice de fijación a su vez puede analizarse en varios niveles geográficos: dentro de cada subpoblación ( $F_{IS}$ ), entre subpoblaciones ( $F_{ST}$ ) y en la población completa ( $F_{IT}$ ).

**a)  $F_{IS}$  variación dentro de subpoblaciones.** Mide la reducción en la heterocigosis de un individuo debido a apareamientos no-azarosos dentro de su subpoblación, se obtiene de la siguiente manera:

$$F_{IS} = (H_s - H_i) / H_s$$

donde  $H_i$  es la proporción de heterócigos observados dentro de una subpoblación y  $H_s$  es la proporción de heterócigos esperados a nivel subpoblacional.

Si toma valores positivos señala que existe un exceso de individuos homócigos con respecto a los esperados si se cumplieran los supuestos de Hardy-Weinberg y que posiblemente la endogamia es la fuerza evolutiva que ha ejercido un papel importante sobre la estructura genética en esta subpoblación. Si toma valores negativos indica que existen menos homócigos de los esperados y sugiere que posiblemente la selección favorece a los heterócigos (Hartl y Clark, 1989).

**b)  $F_{ST}$  variación entre poblaciones.** Mide el efecto de la subdivisión poblacional, donde la reducción de la heterocigosis en una subpoblación es debida a deriva génica.

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

donde  $H_s$  y  $H_T$  representan la proporción promedio esperada de heterócigos a nivel subpoblación y a nivel global, respectivamente.

Si  $F_{ST}$  es igual a cero indica que todas las poblaciones son iguales y si vale uno quiere decir que todas las poblaciones son distintas.  $F_{ST}$  refleja también cómo se reparte la variación genética en la especie, es decir, qué proporción de la diversidad genética está contenida dentro y entre las poblaciones. Mientras más cerca de uno estén los valores de  $F_{ST}$  se requerirá un mayor número de poblaciones para tener toda la variación genética de la especie. 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 entre subpoblaciones y que posiblemente esto haya sido generado por mucha deriva génica. Mientras que si la  $F_{ST}$  es elevada sólo para uno loci señala que la diferenciación genética en éstos posiblemente fue generada por adaptación a condiciones locales por selección natural (Slatkin, 1985). Por otro lado, la  $F_{ST}$  refleja qué tanto flujo génico existe entre las poblaciones (Slatkin, 1985).



c)  $F_{IT}$  **variación total**. Mide la reducción en la heterocigosis de un individuo con respecto a la población total ya sea por endogamia o deriva génica, este índice toma valores entre -1 y +1, y está relacionada con  $F_{IS}$  y  $F_{ST}$ .

$$F_{IT} = (H_T - H_O) / H_T \quad \text{ó} \quad F_{IT} = F_{IS} + (1 - F_{IS})F_{ST}$$

donde  $H_T$  y  $H_O$  es la proporción promedio esperada de heterócigos total y dentro de las subpoblaciones respectivamente.

#### **Tasa de entrecruzamiento en equilibrio ( $t_{eq}$ )**

Mediante los índices de fijación  $F$  es posible obtener una estimación indirecta de la tasa de entrecruzamiento que ocurre en una población. La fórmula propuesta por Haldane (1924)

$$t_{eq} = (1 - F) / (1 + F)$$

Esta estimación puede estar fuertemente sesgada si en la población están actuando otras fuerzas evolutivas además de la endogamia por autopolinización. Por ejemplo si se presentan otros tipos de endogamia, la  $F$  dará como resultado un  $t_{eq}$  muy baja. Si por el contrario está operando otra fuerza, como selección a favor de algún tipo de heterocigoto, la  $F$  predecirá un  $t_{eq}$  demasiado alta.

Un valor de uno indica que todos los apareamientos son producto de entrecruzamiento y un valor de cero indica que ninguno de los apareamientos se dan por entrecruzamiento.

**Flujo génico ( $Nm$ ).** El flujo génico (movimiento de genes desde una parte del área de distribución de la especie hacia otra) determina si las subpoblaciones de una especie evolucionarán como una sola unidad o no. Si hay una gran cantidad de flujo génico entre las subpoblaciones, éstas evolucionarán juntas, pero si hay poco flujo génico cada población evolucionará casi de manera independiente (Slatkin, 1994).

Existen métodos directos e indirectos para medir el flujo génico ( $Nm$ ). Los métodos directos son aquellos que dependen de observaciones o experimentos que miden la extensión de la dispersión de las especies. Los métodos indirectos están basados en modelos matemáticos y emplean las frecuencias alélicas u otras características medibles de las especies para deducir qué cantidad de flujo génico debe haber ocurrido para producir los patrones espaciales observados (Slatkin, 1990). Los métodos indirectos tienen la ventaja de que en ellos las estimaciones del flujo génico son para muchos años, no solamente para una o dos generaciones. Por lo tanto, estiman la tasa promedio de dispersión y no la tasa durante un periodo particular (Slatkin, 1990). Los métodos indirectos empleados para medir el flujo génico en *Rhizophora mangle* incluyeron:

a) **Modelo de islas ( $Nm$ )**. Wright consideró que una población grande está dividida en muchas subpoblaciones dispersas geográficamente, como islas en un archipiélago, donde los individuos de las distintas subpoblaciones tienen la misma probabilidad de migrar a cualesquiera de las islas.  $Nm$  se obtiene de manera indirecta a partir de  $F_{ST}$ .

$$F_{ST} = 1/1+4Nm$$

donde  $N$ : tamaño de la población;  $m$ : proporción de inmigrantes;  $F_{ST}$ : se estima a partir del promedio y la varianza de las frecuencias alélicas

Nótese que este método no estima  $m$  independientemente de  $N$ . Hasta ahora no existe ningún método indirecto para calcular  $m$  por separado.

Los estimadores promedio de  $Nm$  requieren, para ser confiables, ser insensibles a la acción de otras fuerzas evolutivas como la mutación y la selección natural. Crow y Aoki (1984) y Tahakata y Nei (1984), han demostrado que  $G_{st}$  (el estimador de  $F_{ST}$  para loci multialélicos) no depende ni de la tasa de mutación  $\mu$ , ni del número de alelos ( $k$ ). La expresión de  $G_{st}$  incluye un factor que toma en cuenta el número de subpoblaciones en la población:

$$G_{st} = 1/4\alpha Nm + 1$$

$$Nm = 1 - F_{ST} / 4F_{ST}\alpha$$

donde  $\alpha = [(n/n-1)]^2$ , siendo  $n$  el número de subpoblaciones. Conforme incrementa el número de subpoblaciones,  $G_{ST}$  se aproxima a la  $F_{ST}$  de Wright a una tasa de  $1/m$  siempre que  $\mu < m$  (Crow y Aoki, 1984; Takahata y Nei, 1984, Hartl y Clark, 1989)

Si  $Nm$  es mucho mayor que uno, el flujo génico es mayor que la deriva génica por lo que se evita la diferenciación local, en cambio si  $Nm$  es menor que uno, la deriva actúa casi independientemente en cada población

**b) Método de los alelos privados  $\bar{p}(1)$ .** En este método se usan las frecuencias de alelos que se encuentran sólo en una de las subpoblaciones muestreadas (Slatkin 1985).

$$\ln \bar{p}(1) = \{(-0.505)(\ln Nm)\} - 2.44$$

$$Nm = e^{(\ln \bar{p}(1) + 2.44) / -0.505}$$

donde  $\bar{p}$  es la frecuencia promedio de alelos privados (private alleles)

Si existe un alto flujo génico entre las poblaciones, cualquier alelo exclusivo de una población debiera tener una frecuencia muy baja en la población en la que se encuentra. Si alcanza frecuencias intermedias o altas entonces el flujo génico no es suficiente para reducir su frecuencia y homogeneizar las poblaciones.

**c) Aislamiento por distancia ( $M$ ).** En este modelo el flujo génico se da entre las subpoblaciones vecinas o adyacentes exclusivamente. Se obtienen un valor de  $F_{ST}$  para cada par de subpoblaciones y se utiliza el valor resultante para obtener  $Nm$  mediante de la ecuación de Wright. Si este estadístico es denotado por  $M$ , entonces se obtiene un valor de  $M$  para cada par de subpoblaciones en la muestra.

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

Slatkin demostró que  $M$  depende de la distancia geográfica entre pares de poblaciones. En el modelo unidireccional de stepping-stone  $M \approx 4Nm/k$  donde  $k$  es la distancia que separa a dos poblaciones y en el modelo bidireccional  $M \approx 4Nm/k^{1/2}$  para distancias relativamente pequeñas.

Los índices de similitud y distancias genéticas sirven para medir la divergencia genética entre las subpoblaciones, se obtienen para todos los posibles pares de subpoblaciones que constituyen una población.

**Índice de similitud genética de Nei ( $I$ ).** Es la medida de distancia genética más usada. Propone que la probabilidad de elegir al azar un alelo en dos poblaciones diferentes es idéntica a la probabilidad de escoger al azar dos alelos distintos dentro de la misma población (Hartl y Clark, 1989).

$$I = J_{XY} / (J_{XX}J_{YY})^{1/2}$$

donde  $J_{XY}$  es la probabilidad de escoger el mismo alelo en dos poblaciones distintas;  $J_{XX}$  probabilidad de elegir al azar dos alelos distintos de la población  $X$  y  $J_{YY}$  probabilidad de elegir al azar dos alelos distintos de la población  $Y$ .

Si las dos poblaciones son idénticas, entonces  $J_{XY} = J_{XX} = J_{YY}$  y la identidad tiene un valor de uno, mientras que vale cero cuando dos poblaciones no comparten alelos.

**Distancia genética entre dos poblaciones ( $D$ ).** A partir de la identidad se puede obtener la distancia genética entre dos poblaciones como:

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

Toma valores de cero si las poblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas entre sí y de  $\infty$  si no comparten ningún alelo (Hedrick, 1985).

## **Fenogramas de las relaciones genéticas**

Con base en las frecuencias alélicas se obtienen matrices de distancias genéticas a partir de las cuales pueden construirse fenogramas.

La distancia genética más utilizada es la de Nei (1972), la cual mide el número de sustituciones de codones por locus que han ocurrido después de la divergencia entre un par de poblaciones. Esta interpretación es válida sólo si la tasa de sustitución génica por locus es uniforme a través de los loci y de los linajes (Hillis, 1984; Swofford y Olsen, 1990; en Castañeda, 1996). Las matrices son agrupadas para construir los fenogramas de las relaciones genéticas, en este trabajo se utilizaron dos métodos de agrupamiento: UPGMA y Neighbor-joining.

El método UPGMA (Unweighted pair group method using arithmetic average) busca en la matriz los elementos que presenten la menor distancia y las poblaciones involucradas se unen en un nodo interno que se dibuja en una posición adecuada a lo largo del eje de distancias. Cada vez que se selecciona un elemento de la matriz se construye una nueva con un número de poblaciones igual al anterior menos uno (puesto que se toman en conjunto las poblaciones que se han unido en el agrupamiento). Se revisa la matriz nuevamente y se busca el siguiente elemento más pequeño. En cada ciclo del proceso de agrupamiento, las poblaciones son agrupadas de acuerdo a la distancia promedio más pequeña (Avice, 1994). El supuesto principal de este método es que la tasa de sustitución de genes es constante a lo largo de todas las ramas del fenograma (Nei, 1987).

En Neighbor-joining se considera que las tasas de cambio molecular entre las ramas son desiguales y que no todos los linajes han divergido en cantidades iguales. El fenograma construye en cada paso una matriz de distancias transformadas que ajusta la longitud de las ramas entre cada par de nodos finalmente une los pares de nodos menos distantes en la matriz de distancias transformadas (Swofford y Olsen, 1990; en Castañeda, 1996).

Con base en los electromorfos (genotipos) observados en los geles y mediante el programa BIOSYS (1989), se obtuvieron las frecuencias alélicas y las frecuencias genotípicas esperadas para cada subpoblación. También se obtuvieron las identidades

genéticas de Nei ( $I$ ), distancias genéticas ( $D$ ) para todos los pares de poblaciones y se construyó el fenograma de las relaciones genéticas entre las poblaciones (método UPGMA). Asimismo se realizaron pruebas de  $\chi^2$  para la heterogeneidad de las frecuencias alélicas y el equilibrio de Hardy-Weinberg para las frecuencias genotípicas.

El árbol construido mediante el método Neighbor-joining se hizo mediante el programa de computo PHYLIP (1993). Para estimar la confianza estadística del fenograma se utilizó el método de remuestreo bootstrap con 100 réplicas. A partir de las cuales se obtuvo un árbol consenso.

Se utilizó la prueba de  $\chi^2$  de Li y Horvitz (1953)  $\{\chi^2 = F^2N(k-1)\}$ ;  $gl = [k(k-1)]/2$ ;  $k =$  número de alelos y  $N =$  tamaño de la muestra} para determinar si los valores de  $F_{IS}$  y  $F_{ST}$  eran significativamente distintos de cero o no y la prueba de Workman y Niswander (1970) para  $F_{ST}$   $\{\chi^2 = 2NF_{ST}(k-1)\}$ ;  $gl = [(k-1)(s-1)]$ ;  $s =$  número de subpoblaciones}. Los intervalos de confianza al 95% para el promedio de los estadísticos  $F$  se calcularon a través de un jackknife (Weir, 1990).

Para estimar los niveles de flujo génico ( $M$  entre pares de poblaciones) se usó el programa desarrollado por Slatkin (1994), el cual está basado en métodos de coalescencia y obtiene  $F_{ST}$  para pares de poblaciones estimando tanto  $\theta$  (Weir y Cockerham, 1984) como  $G_{ST}$  (Nei, 1973).

Las distancias geográficas entre las distintas poblaciones se obtuvieron usando cartas de INEGI a una escala 1:250 000.

## RESULTADOS

### **Determinación del buffer de extracción y sistemas de corrimiento**

Para determinar la mejor combinación del buffer de extracción y sistema de corrimiento fue necesario ensayar un total de 24 geles en 8 sistemas de corrimiento distintos. Para ello se extrajeron enzimas de 216 individuos adultos y 111 embriones. En total se ensayaron 30 enzimas, dentro de las cuales se incluyen algunas de las enzimas reportadas por Goodall y Stoddart (1989), y Garay (1992).

El buffer de extracción Joshi *et al.* 1980, no ofreció buena actividad ni resolución en las enzimas ensayadas (ACPH, APX, CPX, ME, PEP, PGI y RUB). Los sistemas de corrimiento empleados en combinación con este buffer de extracción fueron el Sistema Miles *et al.* 1977, y el Sistema I y II de Goodall y Stoddart (1989).

Las enzimas obtenidas con el buffer de extracción Mitton modificado no presentaban buena resolución ni actividad, debido a la presencia de metabolitos secundarios. Para este buffer de extracción se realizaron pruebas en el sistema de corrimiento 7 (en combinación con las enzimas PGI, MNR, RUB, CE, NADHDH, GOT, GDH y LAP), MC Morfolina (enzimas ensayadas ACO, ACPH, FUM, IDH y 6-PGD) y el sistema 8- (enzimas ensayadas APX, CPX, ACPH, FE, GOT y MNR).

Con el buffer de extracción Goodall y Stoddart (1989) se logró obtener una buena expresión enzimática. La albúmina sérica bovina (ASB) es capaz de mejorar la resolución de algunas enzimas, en la literatura se reporta su uso a una concentración de 40mg/100ml (Soltis y Soltis, 1989). Este compuesto se añadió al buffer de extracción, pero se obtuvo una mejor resolución para las enzimas MDH, ME, MNR, y PGI aumentando la concentración al 1%, por lo que se decidió añadir ASB definitivamente al buffer de extracción.

Cabe mencionar que los primeros ensayos con este buffer de extracción se realizaron macerando las muestras con nitrógeno líquido pero no se detectaron diferencias en la actividad enzimática cuando se maceraba sin este componente.

Entre los sistemas de corrimiento ensayados en combinación con el buffer de extracción Goodall y Stoddart (1989) se encuentran: Mitton, Poulik, y Sistema R. En dichos sistemas no se observó actividad enzimática. Mientras que en el sistema de

corrimiento 2, sistema 7 y MC Morfolina las enzimas presentaron una buena actividad y resolución, así como el mayor número de loci (Tabla 4). Los sistemas enzimáticos que presentaron mejor actividad y resolución fueron ACPH, DIA, GOT, LAP, MDH, ME, MNR y PGI. Para mayor información sobre los buffer de extracción, buffers de corrimiento y tinción enzimática véase Apéndice.

Tabla 4. Resumen de las enzimas ensayadas con el buffer de extracción modificado Goodall y Stoddart, (1989) para *Rhizophora mangle*.

| Enzima   | Actividad | Resolución | Variación | # de loci | Sistema      |
|----------|-----------|------------|-----------|-----------|--------------|
| ACO      | -         | -          | -         | -         | I, II, 7     |
| ACPH     | +++       | ++         | P         | 2         | MC Morfolina |
| ADH      | +++       | +++        | ND        | -         | 7            |
| AK       | -         | -          | -         | -         | 2, 7         |
| APX      | +++       | +          | ND        | 3         | 2            |
| CPX      | +++       | ++         | P         | 3         | I, II        |
| DIA      | +++       | ++         | M         | 3         | 2, 7         |
| EST      | ++        | -          | -         | -         | 2, I, II     |
| FE       | -         | -          | -         | -         | 8-           |
| GDH      | -         | -          | -         | -         | I, II, 2, 7  |
| GOT      | +++       | +++        | P         | 2         | 2            |
| G-6-PD   | -         | -          | -         | -         | I, II        |
| HEX      | -         | -          | -         | -         | I, II, 7     |
| IDH      | +         | ++         | -         | -         | 2            |
| LAP      | +++       | +++        | P         | 1         | 7            |
| MDH      | +++       | +++        | ND        | -         | MC Morfolina |
| ME       | +++       | +++        | P         | 2         | MC Morfolina |
| MNR      | +++       | +++        | P         | 3         | 2            |
| PG (RUB) | +++       | +++        | M         | 3         | 7            |
| 6-PGD    | -         | -          | -         | -         | I, II, 2, 7, |
|          |           |            |           |           | MC Morfolina |
| PGI      | +++       | +++        | P         | 2         | 7            |
| PGM      | -         | -          | -         | -         | I, II, 2, 7  |
| SDH      | +         | -          | -         | -         | I, II, 2, 7  |
| SOD      | +++       | +++        | ND        | -         | 7            |
| TPI      | -         | -          | -         | -         | 2, 7         |

Actividad  
 - Sin actividad  
 + Poco activa  
 ++ Activa  
 +++ Muy activa

Resolución  
 - Sin resolución  
 + Poca resolución  
 ++ Con alguna dificultad  
 +++ Bandas legibles

Variación  
 M Monomórfica  
 P Polimórfica  
 ND No determinada

### Frecuencias alélicas

Con base en los patrones isoenzimáticos observados en las ocho poblaciones fue posible interpretar cinco enzimas. Se eliminó el sistema enzimático MDH (MDH-1 y MDH-2) debido a la dificultad de interpretar los patrones de bandeo. Las isoenzimas DIA, GOT y ME-2 se omitieron del análisis porque no fueron consistentes en todas las



poblaciones. Los sistemas enzimáticos empleados para el análisis de la estructura genética poblacional fueron ACPH, LAP, ME, MNR y PGI (los zimogramas que muestran los patrones de bandeo pueden observarse en la Figura 4).

La ACPH exhibió dos zonas de bandeo. La ACPH-1 (anódica) fue interpretada como un locus único con un alelo fijo en todas las poblaciones del Atlántico. La ACPH-2 (catódica) presentó tres alelos, el primero (el más rápido), fue el más común en la mayoría de las poblaciones. Solamente en Carmen se presentó el tercer alelo, que se utilizó para determinar el flujo génico mediante el método de alelos privados (Figura 4).

LAP presentó un locus único con dos alelos, donde el alelo más rápido fue el más común en las poblaciones estudiadas. En Tuxpan, Centla, Carmen, Ría Lagartos y Punta Allen LAP fue polimórfica mientras que en el resto fue monomórfica (Figura 5).

La isoenzima ME-1 exhibió dos alelos, de los cuales el más común fue el segundo, esta enzima fue polimórfica en todas las poblaciones estudiadas (Figura 5).

La isoenzima MNR presentó tres zonas de bandeo, cada locus presentó un alelo el cual estaba fijo en todas las poblaciones del Atlántico (Figura 4).

PGI mostró dos zonas de bandeo, de éstas la primera exhibió un alelo fijo en todas las poblaciones y en la segunda se encontraron dos alelos, de los cuales el primero fue el más común en la mayoría de las poblaciones (Figura 5).

Por otro lado, el análisis de  $\chi^2$  para la heterogeneidad de las frecuencias alélicas de locus polimórficos indicó que las frecuencias alélicas varían significativamente entre las poblaciones (Tabla 5). La ACPH-2 mostró la heterogeneidad más grande ( $\chi^2 = 291.258$ ;  $P < 0.001$ ). Para esta enzima, la frecuencia del alelo más común varió desde 1.000 en Tuxpan, Sontecomapan y Ría Lagartos hasta 0.378 en Carmen. PGI-2 también mostró una amplia variación en sus frecuencias alélicas ( $\chi^2 = 222.968$ ;  $P < 0.001$ ), el alelo más común presentó valores desde 1.000 (Sontecomapan y Ría Lagartos) hasta 0.433 (Carmen). En ME-1 el rango de valores del alelo más común fue de 0.755 (Celestún) a 0.184 (Tuxpan), para esta enzima, a excepción del resto, no se observaron frecuencias alélicas iguales a uno ni cero. En LAP se observó la menor heterogeneidad ( $\chi^2 = 101.329$ ;  $P < 0.001$ ), el alelo más común mostró valores desde 1.000 en Tamiahua, Sontecomapan y Celestún hasta 0.750 en Punta Allen (Tabla 5).

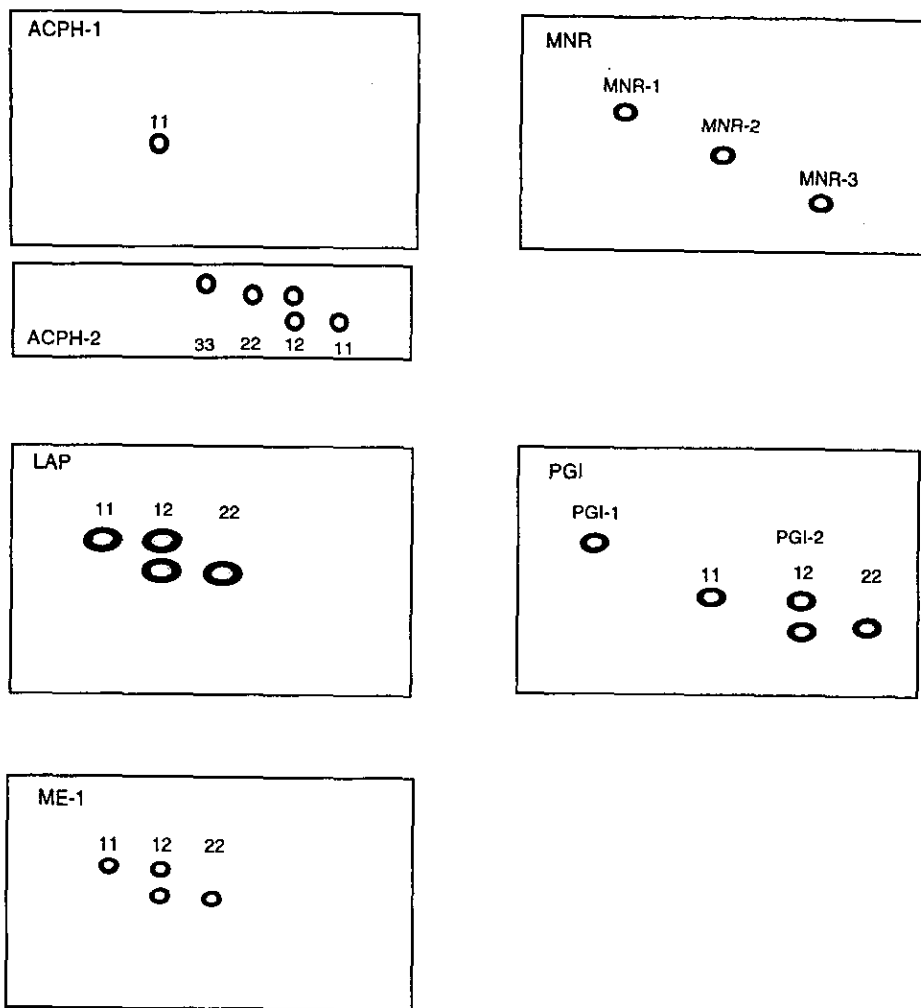
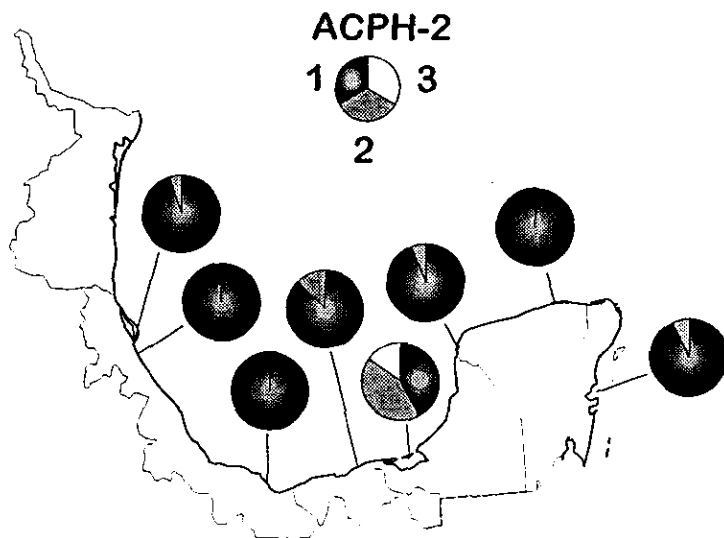


Figura 4. Patrones de bandeo de los genotipos isoenzimáticos observados en *Rhizophora mangle* (los números sobre las bandas representan los genotipos asignados a cada enzima).

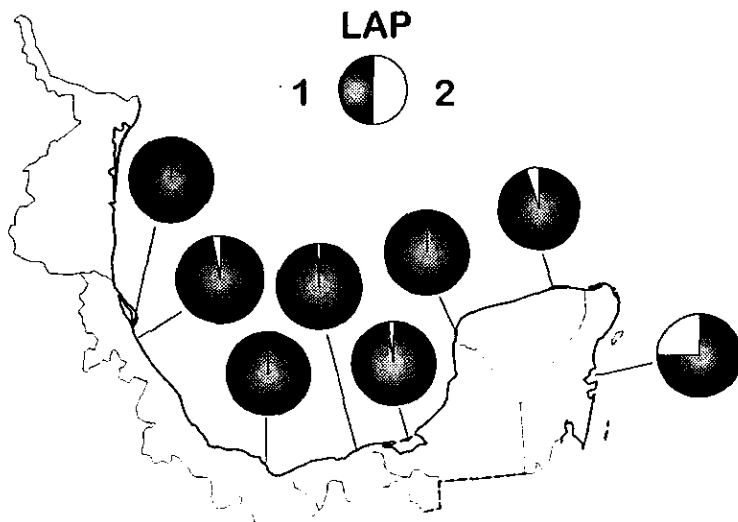
Tabla 5. Tamaños de muestra (N), frecuencias alélicas y análisis de  $\chi^2$  para la heterogeneidad de las frecuencias alélicas de ocho loci isoenzimáticos analizados en ocho poblaciones de *Rhizophora mangle* muestreadas en el Golfo de México y Mar Caribe. Entre paréntesis se muestran los intervalos de confianza al 95%.

| LOCUS  | TAM               | TUX               | SON               | CEN               | CAR               | CEL               | R.L.              | P.A.              | $\chi^2$ |
|--------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|----------|
| MNR-1  |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |          |
| (N)    | 41                | 45                | 46                | 50                | 45                | 49                | 50                | 50                |          |
| 1      | 0.000             | 0.000             | 0.000             | 0.000             | 0.000             | 0.000             | 0.000             | 0.000             |          |
| 2      | 1.000             | 1.000             | 1.000             | 1.000             | 1.000             | 1.000             | 1.000             | 1.000             |          |
| MNR-2  |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |          |
| (N)    | 42                | 45                | 46                | 50                | 45                | 49                | 50                | 50                |          |
| 1      | 1.000             | 1.000             | 1.000             | 1.000             | 1.000             | 1.000             | 1.000             | 1.000             |          |
| MNR-3  |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |          |
| (N)    | 42                | 45                | 46                | 50                | 45                | 49                | 50                | 50                |          |
| 1      | 1.000             | 1.000             | 1.000             | 1.000             | 1.000             | 1.000             | 1.000             | 1.000             |          |
| LAP    |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |          |
| (N)    | 38                | 35                | 43                | 48                | 45                | 49                | 49                | 44                |          |
| 1      | 1.000             | 0.971<br>(0.0066) | 1.000             | 0.990<br>(0.0028) | 0.978<br>(0.0045) | 1.000             | 0.949<br>(0.0062) | 0.750<br>(0.0136) | 101.32*  |
| 2      | 0.000             | 0.029<br>(0.0066) | 0.000             | 0.010<br>(0.0028) | 0.022<br>(0.0045) | 0.000             | 0.051<br>(0.0062) | 0.250<br>(0.0136) |          |
| PGI-1  |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |          |
| (N)    | 39                | 39                | 46                | 41                | 45                | 36                | 50                | 50                |          |
| 1      | 1.000             | 1.000             | 1.000             | 1.000             | 1.000             | 1.000             | 1.000             | 1.000             |          |
| PGI-2  |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |          |
| (N)    | 39                | 39                | 46                | 41                | 45                | 36                | 50                | 50                |          |
| 1      | 0.436<br>(0.0176) | 0.538<br>(0.0177) | 1.000             | 0.488<br>(0.0168) | 0.433<br>(0.0152) | 0.486<br>(0.0192) | 1.000             | 1.000             | 222.96*  |
| 2      | 0.564<br>(0.0176) | 0.462<br>(0.0177) | 0.000             | 0.512<br>(0.0168) | 0.514<br>(0.0152) | 0.514<br>(0.0192) | 0.000             | 0.000             |          |
| ACPH-1 |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |          |
| (N)    | 40                | 45                | 46                | 50                | 45                | 49                | 50                | 50                |          |
| 1      | 1.000             | 1.000             | 1.000             | 1.000             | 1.000             | 1.000             | 1.000             | 1.000             |          |
| ACPH-2 |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |          |
| (N)    | 40                | 45                | 46                | 50                | 45                | 49                | 50                | 48                |          |
| 1      | 0.950<br>(0.0075) | 1.000             | 1.000             | 0.880<br>(0.0090) | 0.378<br>(0.0025) | 0.939<br>(0.0067) | 1.000             | 0.927<br>(0.0075) | 291.25*  |
| 2      | 0.050<br>(0.0075) | 0.000             | 0.000             | 0.120<br>(0.0090) | 0.489<br>(0.0037) | 0.061<br>(0.0067) | 0.000             | 0.073<br>(0.0075) |          |
| 3      | 0.000             | 0.000             | 0.000             | 0.000             | 0.133<br>(0.0032) | 0.000             | 0.000             | 0.000             |          |
| ME-1   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |                   |          |
| (N)    | 36                | 38                | 43                | 46                | 45                | 49                | 45                | 27                |          |
| 1      | 0.361<br>(0.0184) | 0.816<br>(0.0141) | 0.581<br>(0.0159) | 0.370<br>(0.0145) | 0.300<br>(0.0141) | 0.245<br>(0.0121) | 0.311<br>(0.0142) | 0.815<br>(0.0199) | 112.75*  |
| 2      | 0.639<br>(0.0184) | 0.184<br>(0.0141) | 0.419<br>(0.0159) | 0.630<br>(0.0145) | 0.700<br>(0.0141) | 0.755<br>(0.0121) | 0.689<br>(0.0142) | 0.185<br>(0.0199) |          |

\* Valores estadísticamente distintos de cero  $P < 0.001$



(a)



(b)

Figura 5. Frecuencias alélicas para las cuatro enzimas polimórficas encontradas en poblaciones de *Rhizophora mangle* distribuidas en el Golfo de México y el Mar Caribe. a) ACPH-2. b) LAP. c) PGI-2. d) ME-1.

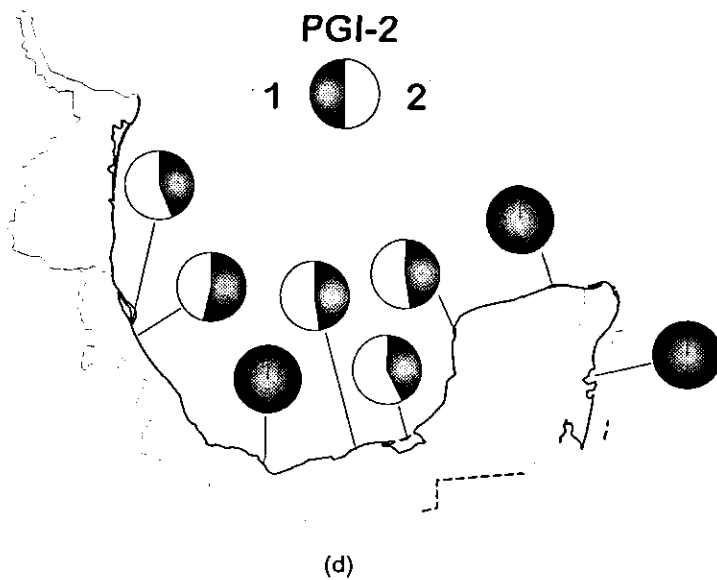
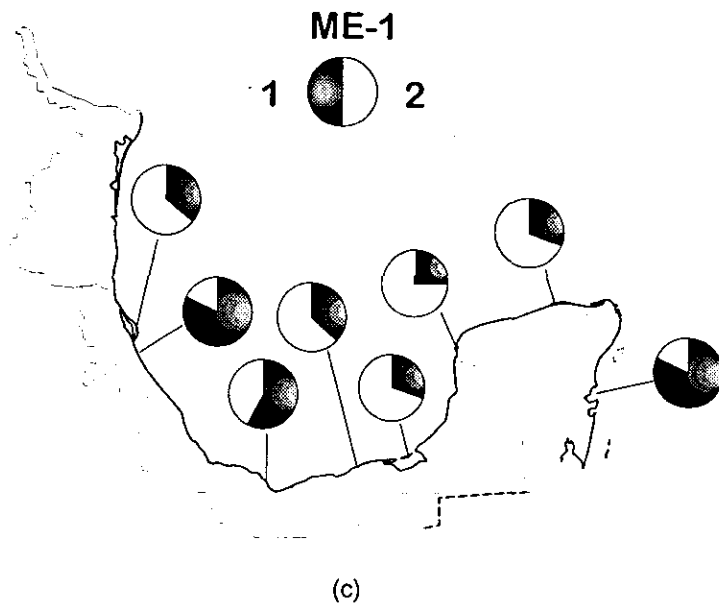


Figura 5. Continuación ...

Las poblaciones que mostraron mayor similitud, en cuanto a frecuencias alélicas se refiere, fueron Centla y Carmen (la mayor diferencia se observó en ACPH-2), Tamiahua y Celestún. Mientras que el resto de las poblaciones mostraron menos semejanzas en sus frecuencias alélicas.

### **Diversidad genética**

En la Tabla 6 se muestran los estimadores de la diversidad genética en cada población éstos se obtuvieron incluyendo a todos los locus polimórficos y monomórficos.

El número promedio de alelos por locus para todas las poblaciones fue  $A = 1.31$  (Tabla6), el valor más alto se observó en Carmen ( $A = 1.6$ ), mientras que el valor más bajo se observó en Sontecomapan ( $A \approx 1.1$ ).

El porcentaje de loci polimórficos promedio fue  $P = 27.75\%$  (Tabla 6). El porcentaje de loci polimórficos más alto se observó en Tamiahua, Centla, Carmen, Celestún y Punta Allen ( $P = 33.3\%$ ), le siguieron Tuxpan y Ría Lagartos ( $P = 22.2\%$ ), mientras que Sontecomapan presentó el valor más bajo ( $P = 11.1\%$ ).

El valor de la heterocigosis promedio observada por población varió entre  $H_i = 0.000$  y  $H_i = 0.110$ , el primer valor se registró en Sontecomapan y el segundo en Centla, es decir, en Sontecomapan ninguno de los genotipos observados en las enzimas presentó heterocigotos. El promedio de la heterocigosis observada sobre todas las poblaciones fue  $\bar{H}_i = 0.058$  (Tabla 6).

Por otro lado, la heterocigosis promedio esperada sobre todas las poblaciones fue la  $\bar{H}_s = 0.150$ . La heterocigosis promedio esperada más alta se registró en Carmen con un valor de  $H_s = 0.175$  y el valor más bajo  $H_s = 0.055$  para Sontecomapan (Tabla 6). En otras palabras, Sontecomapan es la población con menos diversidad genética mientras que Carmen es la más diversa, en ésta última también se observó el número promedio de alelos por locus y número efectivo de alelos por locus más alto de todas las poblaciones.

Cabe mencionar que, de las poblaciones con mayor diversidad genética, Centla y Tamiahua mostraron menor diferencia entre la heterocigosis promedio observada y la esperada comparada con los valores obtenidos en Carmen (Tabla 6).

Tabla 6. Estimadores de la diversidad genética encontrados para ocho poblaciones *Rhizophora mangle*. Los errores estándar se muestran entre paréntesis.

| POBLACION    | Tamaño de la muestra (N) | Número promedio de alelos por locus (A) | Número efectivo de alelos por locus ( $A_e$ ) | Porcentaje de loci polimórficos (P) | Heterocigosis promedio observada ( $H_i$ ) | Heterocigosis promedio esperada ( $H_s$ ) |
|--------------|--------------------------|---|---|-------------------------------------|--|---|
| Tamiahua     | 39.8<br>(0.6)            | 1.3<br>(0.2)                            | 1.21  | 33.3                                | 0.109<br>(0.109)                           | 0.133<br>(0.077)                          |
| Tuxpan       | 42.4<br>(1.3)            | 1.3<br>(0.2)                            | 1.16  | 22.2                                | 0.086<br>(0.079)                           | 0.096<br>(0.061)                          |
| Sontecomapan | 45.3<br>(0.4)            | 1.1<br>(0.1)                            | 1.10  | 11.1                                | 0.000<br>(0.000)                           | 0.055<br>(0.055)                          |
| Centla       | 48.3<br>(1.0)            | 1.4<br>(1.2)                            | 1.22  | 33.3                                | 0.110<br>(0.097)                           | 0.135<br>(0.071)                          |
| Carmen       | 45<br>(0.0)              | 1.6<br>(0.2)                            | 1.35  | 33.3                                | 0.064<br>(0.056)                           | 0.175<br>(0.085)                          |
| Celestún     | 47.6<br>(1.4)            | 1.3<br>(0.2)                            | 1.19  | 33.3                                | 0.090<br>(0.090)                           | 0.111<br>(0.064)                          |
| Ria Lagartos | 49.3<br>(0.6)            | 1.2<br>(0.1)                            | 1.09  | 22.2                                | 0.002<br>(0.002)                           | 0.059<br>(0.048)                          |
| Punta Allen  | 46.6<br>(2.5)            | 1.3<br>(0.2)                            | 1.14  | 33.3                                | 0.016<br>(0.016)                           | 0.091<br>(0.050)                          |
| PROMEDIO     | 45.5                     | 1.31                                    | 1.18  | 27.75                               | 0.058                                      | 0.105                                     |

### Indices de fijación y equilibrio de Hardy-Weinberg

Estos índices se obtuvieron mediante la Heterocigosis promedio observada y esperada de los locus polimórficos encontrados en cada población, permiten determinar junto con el análisis de  $\chi^2$  para el equilibrio de Hardy-Weinberg de las frecuencias genotípicas qué poblaciones están en equilibrio y cuáles se alejan de éste.

En la Tabla 7 se muestran los índices de fijación y el valor de  $\chi^2$  obtenidos para cada locus dentro de cada población. Ambos resultados fueron congruentes e indicaron que la mayoría de los locus y por ende, las poblaciones no estaban en equilibrio genético.

La mayor parte de los valores obtenidos fueron positivos y señalan un exceso de individuos homocigotos dentro de las poblaciones. Los índices de fijación de las enzimas ACPH-2 y LAP mostraron un único valor cercano a cero que no difiere de cero

significativamente (Punta Allen y Centla, respectivamente), el resto de los valores en dichas enzimas fueron cercanos a uno o iguales a uno y estadísticamente distintos de cero. En la enzima ME-1 los valores obtenidos fueron positivos y cercanos a uno, el análisis estadístico mostró que éstos eran significativamente distintos de cero. Fue notable que de los cuatro locus analizados la enzima PGI-2 mostró en todas las poblaciones valores negativos, que son indicadores de un exceso de heterocigotos, favorecidos probablemente por la selección natural.

El promedio de los índices de fijación en cada población fue positivo e indica un exceso de homocigotos que, probablemente son originados por endogamia local. Cuando se obtienen los promedios de los índices de fijación excluyendo a la PGI-2, los valores de la endogamia aumentan considerablemente.

En el análisis de  $\chi^2$  para el equilibrio de Hardy-Weinberg, al igual que los índices de fijación, mostró que ninguna de las poblaciones se encontraban en equilibrio, había un exceso de homocigotos en todas las enzimas a excepción de PGI-2 (Tabla 7). La proporción de heterocigotos observados y los esperados en la mayor parte de las enzimas, difirieron significativamente (Figura 6). Hubo un déficit de heterocigotos para ACPH-2, LAP y ME-1 pero en PGI-2 hubo un exceso de éstos.

Tabla 7. Índices de fijación por locus en cada población de *Rhizophora mangle* en el Atlántico. El análisis estadístico se hizo de acuerdo con Li y Horvitz (1953). Entre paréntesis se muestran los valores de  $\chi^2$  para el equilibrio de Hardy-Weinberg de las frecuencias genotípicas. Este análisis se hizo empleando la corrección de Yates para muestras pequeñas.

| LOCUS                 | TAM                  | TUX                 | SON                 | CEN                  | CAR                 | CEL                  | R.L.                | P.A.                |
|-----------------------|----------------------|---------------------|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| ACPH-2                | 1.000*<br>(22.520*)  |                     |                     | 1.000*<br>(41.098*)  | 1.000*<br>(78.295*) | 1.000*<br>(34.013*)  |                     | -0.079<br>(0.000)   |
| LAP                   |                      | 1.000*<br>(8.857)   |                     | -0.011<br>(0.000)    | 1.000*<br>(11.361*) |                      | 0.789*<br>(17.029*) | 1.000*<br>(39.783*) |
| ME-1                  | 1.000*<br>(32.751*)  | 0.825*<br>(21.418*) | 1.000*<br>(39.953*) | 0.813*<br>(27.821*)  | 0.841*<br>(28.770*) | 1.000*<br>(44.700*)  | 1.000*<br>(41.416*) | 1.000*<br>(21.687*) |
| PGI-2                 | -0.773*<br>(20.984*) | -0.444*<br>(6.425)  |                     | -0.757*<br>(21.292*) | -0.041<br>(0.007)   | -0.612*<br>(11.730*) |                     |                     |
| Promedio              | 0.422                | 0.460               | 1.000               | 0.261                | 0.700               | 0.463                | 0.895               | 0.640               |
| Promedio<br>sin PGI-2 | 1.000                | 0.913               | 1.000               | 0.601                | 0.947               | 1.000                | 0.895               | 0.640               |

\* Valores estadísticamente distintos de cero  $P < 0.001$

\* Valores observados estadísticamente distintos de los esperados.



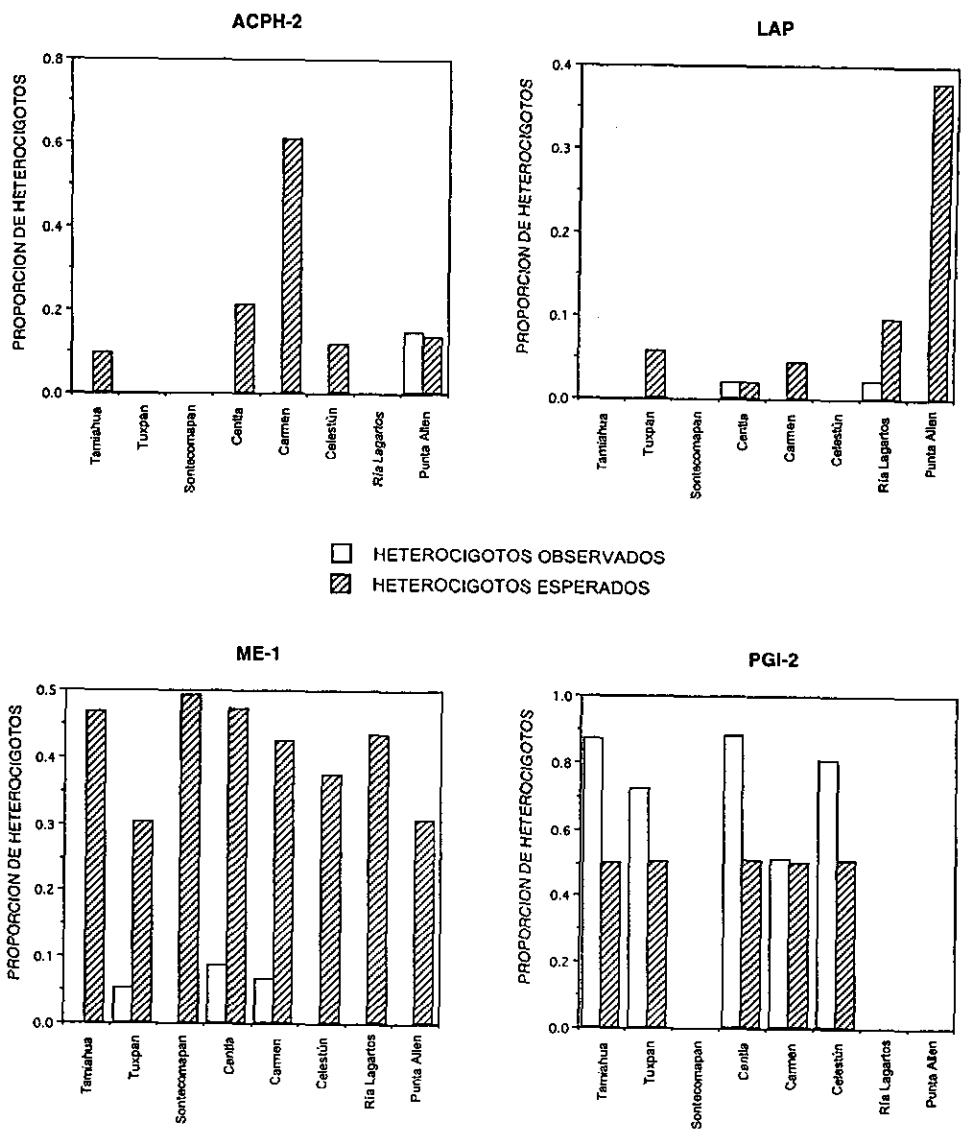


Figura 6. Proporción de heterocigotos observados y esperados de las cuatro enzimas polimórficas analizadas en *Rhizophora mangle*.

En la Tabla 8 se muestran los resultados de los coeficientes de endogamia dentro de las subpoblaciones ( $F_{IS}$ ), entre las poblaciones ( $F_{ST}$ ) y en la población total ( $F_{IT}$ ) obtenidos mediante los programas de computación BIOSYS y Weir y Cockerham. Ambos resultados fueron muy similares y mostraron un alto nivel de endogamia dentro de las poblaciones y diferenciación interpoblacional.

Los índices de fijación promedio  $F_{IS}$  y  $f$  indican un exceso de homocigotos en todas las enzimas excepto en PGI-2. En ésta última el valor fue negativo y significativamente distinto de cero, lo cual corrobora que este locus está expuesto a selección natural. Sin embargo, cuando se obtiene el promedio de  $F_{IS}$  eliminando a la PGI-2, el valor se aproxima a uno aumentando considerablemente el nivel de endogamia.

El promedio de  $F_{ST}$  y  $\theta$  positivo así como los valores de positivos y significativamente distintos de cero para ACPH-2 y PGI-2 señalan una alta diferenciación genética entre subpoblaciones, la cual se generó, posiblemente, por deriva génica.

Los promedios de  $F_{IT}$  y  $F$  señalaron que la estructura poblacional de *Rhizophora mangle*, está determinada posiblemente por la deriva génica y la endogamia. Los valores fueron positivos, cercanos a uno y significativamente distintos de cero, a excepción de PGI-2. Al igual que en  $F_{IS}$ , cuando se eliminó del promedio a PGI-2, disminuye el valor de  $F_{IT}$ .

Tabla 8. Estadísticos  $F$  de Wright para *Rhizophora mangle* obtenidos mediante el programa de Weir y Cockerham (1990) y a través de BIOSYS. El promedio y error estándar se obtuvieron mediante un jackknife sobre todos los loci. Los intervalos de confianza (al 95%) se obtuvieron mediante un bootstrap sobre todos los loci. El análisis estadístico se hizo de acuerdo con Li y Horvitz (1953) para  $F_{IS}$  y  $F_{IT}$ ; y de acuerdo con Workman y Niswander (1970) para  $F_{ST}$ .

| LOCUS                   | $F$           | $F_{IT}$ | $\theta$      | $F_{ST}$ | $f$            | $F_{IS}$ |
|-------------------------|---------------|----------|---------------|----------|----------------|----------|
| ACPH-2                  | 0.9123        | 0.912*   | 0.3157        | 0.305*   | 0.8718         | 0.874*   |
| LAP                     | 0.9359        | 0.940*   | 0.1430        | 0.145    | 0.9251         | 0.930*   |
| ME-1                    | 0.9461        | 0.948*   | 0.1722        | 0.189    | 0.9348         | 0.936*   |
| PGI-2                   | 0.0203        | -0.074   | 0.3488        | 0.296*   | -0.5044        | -0.526*  |
| PROMEDIO                | 0.6124        | 0.682    | 0.2570        | 0.234    | 0.4784         | 0.554    |
| PROMEDIO<br>(sin PGI-2) |               | 0.933    |               | 0.213    |                | 0.913    |
| Error estándar          | 0.3585        |          | 0.0696        |          | 0.5229         |          |
| I. C. al 95%            | 0.1038-0.9452 |          | 0.1646-0.3423 |          | -0.3376-0.9340 |          |

\* Valores significativamente distintos de cero  $P < 0.001$

### Tasa de entrecruzamiento en equilibrio

La tasa de entrecruzamiento en equilibrio obtenida indirectamente a partir de la  $F$  promedio en cada población (véase Tabla 6) indicó que en *Rhizophora mangle* la mayor parte de los apareamientos se dan por endogamia. Cuando se obtuvo la tasa de entrecruzamiento considerando a PGI-2 el valor  $t_{eq} = 0.2725$  mostró que el 27.25% de los apareamientos se dan por entrecruzamiento mientras que el 72.75% son resultado de la autopolinización. Sin embargo, cuando se obtiene el promedio de  $t_{eq}$  ignorando a la PGI-2, este valor es considerablemente menor  $t_{eq} = 0.0746$ , es decir, el 7.46% de los apareamientos se dan por entrecruzamiento y el resto por autofertilización (Tabla 9).

Los valores de  $t_{eq}$  por población, considerando a la PGI-2, variaron entre  $t_{eq} = 0.000$  (Sontecomapan) y  $t_{eq} = 0.586$  (Centla). En cambio los valores de entrecruzamiento para cada población, ignorando a PGI-2, resultaron ser mucho menores. En Tamiahua, Sontecomapan y Celestún,  $t_{eq} = 0.000$  y la tasa mayor se observó en Centla  $t_{eq} = 0.249$ . Ambos promedios mostraron que en Centla una parte importante de los apareamientos se dan por entrecruzamiento (Tabla 9).

Tabla 9. Tasa de entrecruzamiento en equilibrio obtenida indirectamente a partir del promedio de  $F$  para cada población de *Rhizophora mangle*.

| POBLACION    | $t_{eq}$ | $t_{eq}$ sin PGI-2 |
|--------------|----------|--------------------|
| Tamiahua     | 0.406    | 0.000              |
| Tuxpan       | 0.370    | 0.046              |
| Sontecomapan | 0.000    | 0.000              |
| Centla       | 0.586    | 0.249              |
| Carmen       | 0.176    | 0.027              |
| Celestún     | 0.367    | 0.000              |
| Ría Lagartos | 0.056    | 0.056              |
| Punta Allen  | 0.219    | 0.219              |
| PROMEDIO     | 0.2725   | 0.0746             |

Un valor de  $F$  cercano a uno hace que la tasa de entrecruzamiento se aproxime a cero por lo que los valores de  $F$  (negativos) de la PGI-2 contribuyeron a aumentar la tasa de entrecruzamiento.

Estos resultados coinciden con los resultados reportados por Lowenfeld y Klekowski (1992, 1994) en cuanto a los altos niveles de endogamia encontrados en *Rhizophora mangle*.

## Flujo génico

### Modelo de islas y alelos privados

El flujo génico obtenido mediante el modelo de Wright y el método de alelos privados fue menor que uno ( $Nm = 0.708$  y  $Nm = 0.433$  respectivamente). En el modelo de Islas LAP mostró el flujo génico más alto pero en el resto de los locus los valores fueron menores que uno (Tabla 10). El método de alelos privados podría reflejar que la frecuencia del alelo exclusivo en Carmen fue mas bien alta debido a que el fujo génico es bajo.

Por consiguiente, puede considerarse que el flujo génico que se ha estado llevando a cabo entre las poblaciones es escaso y probablemente no disminuye los efectos de deriva (como muestran los índices de fijación).

Tabla 10. Flujo génico obtenido a través del modelo de islas de Wright y mediante el método de alelos privados para ocho poblaciones de *Rhizophora mangle*. En el primer caso se utilizó el valor de  $F_{ST}$  de cada locus obtenido a través del programa de Weir y Cockerham (1990) y en el segundo se empleó la frecuencia del tercer alelo de la enzima ACPH-2 encontrado solamente en Carmen.

| LOCUS    | Nm                | Nm                |
|----------|-------------------|-------------------|
|          | (Modelo de islas) | (Alelos privados) |
| ACPH-2   | 0.415             | 0.433             |
| LAP      | 1.147             |                   |
| ME-1     | 0.920             |                   |
| PGI-2    | 0.357             |                   |
| PROMEDIO | 0.708             | 0.433             |

### Aislamiento por distancia

En la Tabla 11 pueden observarse la matriz de distancias geográficas entre todos los posibles pares poblaciones (arriba de la diagonal) y el valor de  $M$  correspondiente (abajo de la diagonal), obtenido a través del programa de computo Slatkin (1994). La distancias geográficas entre los pares de poblaciones varían entre 42 Km (Tamiahua y Tuxpan) y 1775 Km (Punta Allen y Tamiahua).

Los datos obtenidos para  $M$  fueron heterogéneos. Se obtuvieron valores de  $M = 58.627$ ,  $M = 34.15$  y  $M = -53.394$  (los dos primeros corresponden a los pares Carmen-Centla y Carmen-Sontecomapan). Slatkin considera que los valores de  $M$  mayores que 10 no son muy confiables ya que indican niveles de flujo génico muy altos o

poblaciones panmíticas. Asimismo, Slatkin consideró que valores de  $M$  negativos no son erróneos ( $M = -53.394$ , correspondiente a Sontecomapan-Celestún) simplemente indican que los valores de  $F_{ST}$  para los pares de poblaciones correspondientes, son extremadamente pequeños y muy probablemente no difieren de cero significativamente.

El valor promedio de flujo génico obtenido entre pares de poblaciones fue igual a  $M = 2.142$ . Sin embargo, no puede decirse que el flujo génico que se ha dado entre las poblaciones sea intenso porque los valores de  $M$  fueron menores que uno para la mayor parte de los pares de poblaciones (alrededor del 75%). Por otra parte el análisis de correlación no fue significativo (prueba de Mantel).

Los pares de poblaciones que tuvieron un valor mayor que uno fueron Tamiahua-Celestún ( $M = 1.430$ ), Tuxpan-Ría Lagartos ( $M = 1.822$ ), Sontecomapan-Ría Lagartos ( $M = 1.270$ ), Sontecomapan-Punta Allen ( $M = 1.752$ ), y Punta Allen-Ría Lagartos ( $M = 1.289$ ). A excepción de Punta Allen-Ría Lagartos (con cierta reserva), los valores de  $M$  no fueron congruentes, ya que el resto de los pares de poblaciones presentan distancias geográficas muy grandes que probablemente no favorezcan el flujo génico.

Tabla 11. Arriba de la diagonal se muestran las distancias geográficas (en Kilómetros) y abajo de la diagonal pueden observarse los valores de  $M$  obtenidos para los pares de poblaciones de *Rhizophora mangle* estudiadas en el Golfo de México y Mar Caribe.

|      | CEL   | R.L.  | P. A. | SON     | CEN   | TAM   | TUX   | CAR    |
|------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|--------|
| CAR  | 288   | 563   | 977   | 374     | 80    | 798   | 756   | *****  |
| TUX  | 1044  | 1319  | 1733  | 382     | 676   | 42    | ***** | 0.576  |
| TAM  | 1086  | 1361  | 1775  | 424     | 718   | ***** | 0.405 | 0.719  |
| CEN  | 368   | 643   | 1057  | 294     | ***** | 0.340 | 0.368 | 58.627 |
| SON  | 662   | 937   | 1351  | *****   | 0.363 | 0.812 | 0.599 | 35.636 |
| P.A. | 689   | 414   | ***** | 1.763   | 0.641 | 0.400 | 0.794 | 0.503  |
| R.L. | 275   | ***** | 1.289 | 1.276   | 0.525 | 0.499 | 1.825 | 0.354  |
| CEL  | ***** | 0.525 | 0.148 | -53.394 | 0.691 | 1.429 | 0.576 | 0.712  |

Los resultados señalan que en *Rhizophora mangle* no existe un patrón claro de aislamiento por distancia, es decir, el flujo génico entre las poblaciones no disminuye conforme aumenta la distancia geográfica (Figura 7).

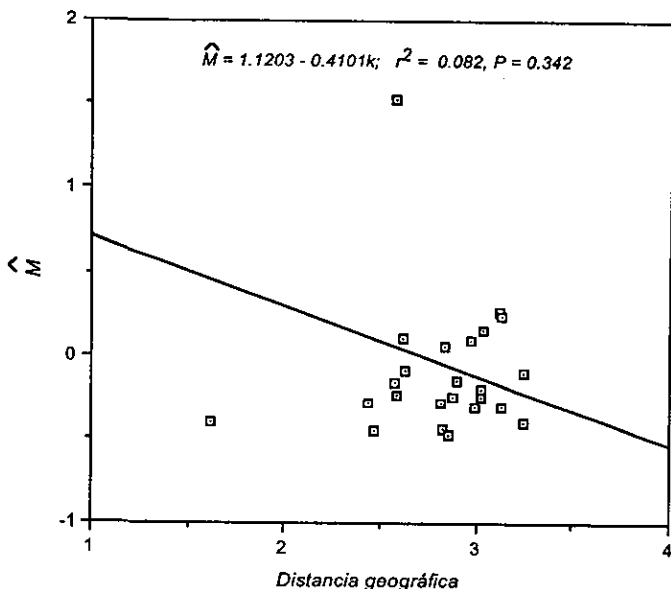


Figura 7. Flujo génico estimado entre pares de poblaciones en función de la distancia geográfica.  $\log_{10} M$  [ $M = (11F_{ST}-1)/4$ ] graficada contra  $\log_{10}$  distancia geográfica entre pares de poblaciones (en Km) para *Rhizophora mangle* colectada en ocho sitios de estudio.

### Indices de identidad y distancias genéticas

Las identidades genéticas para pares de poblaciones se muestran en la Tabla 12. Los valores de identidad obtenidos variaron entre  $I = 1.000$  y  $I = 0.890$ . El valor más alto se observó entre los pares Tamiahua-Celestún y Tamiahua-Centla; y el valor más bajo en Punta Allen-Carmen. Esto significa que Tamiahua-Celestún y Tamiahua-Centla comparten, todos sus alelos entre sí y por lo tanto pueden considerarse idénticas, mientras que Punta Allen-Carmen comparten menos alelos entre sí. En la literatura, los valores de identidad genética reportados son mayores a los encontrados en *Rhizophora mangle*. En el caso de *Cecropia obtusifolia* este índice varió entre  $I = 1.000$  y  $I = 0.964$  y en *Astrocaryum mexicanum* se observaron valores entre  $I = 0.999$  y  $I = 0.963$

Tabla 12. Matrices de identidad genética (arriba de la diagonal) y distancias genéticas (abajo de la diagonal) entre pares de poblaciones de *Rhizophora mangle* establecidas en el Atlántico.

|      | CEL   | R. L. | P.A.  | SON   | CEN   | TAM   | TUX   | CAR   |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| CEL  | ***** | 0.968 | 0.921 | 0.955 | 0.999 | 1.000 | 0.960 | 0.968 |
| R.L. | 0.032 | ***** | 0.965 | 0.992 | 0.967 | 0.962 | 0.945 | 0.922 |
| P.A. | 0.082 | 0.035 | ***** | 0.987 | 0.937 | 0.929 | 0.969 | 0.890 |
| SON  | 0.046 | 0.008 | 0.014 | ***** | 0.963 | 0.957 | 0.969 | 0.913 |
| CEN  | 0.001 | 0.033 | 0.065 | 0.038 | ***** | 1.000 | 0.975 | 0.975 |
| TAM  | 0.000 | 0.039 | 0.074 | 0.044 | 0.000 | ***** | 0.974 | 0.967 |
| TUX  | 0.041 | 0.057 | 0.032 | 0.032 | 0.026 | 0.026 | ***** | 0.926 |
| CAR  | 0.032 | 0.081 | 0.117 | 0.091 | 0.026 | 0.034 | 0.077 | ***** |

Las distancia genéticas (Tabla 13) entre pares de poblaciones para los cuatro loci polimórficos varían entre  $D = 0.000$  y  $D = 0.117$ . Los pares de poblaciones que tienen valores de  $D = 0.000$  y por lo tanto tienen las mismas frecuencias alélicas entre sí son Tamiahua-Celestún, Tamiahua-Centla y Centla-Celestún. Mientras que los pares de poblaciones que presentan las distancias genéticas más grandes tienen valores de  $D = 0.117$  y  $D = 0.091$  para Punta Allen-Carmen y Carmen-Sontecomapan respectivamente. Estos últimos valores ( $D$ ) son muy altos comparados con otras especies tropicales arbóreas. En el caso de *A. mexicanum* los valores de las distancias genéticas reportados fueron  $D = 0.0003$  y  $D = 0.0373$  (Eguiarte *et al.* 1992); mientras que en *C. obtusifolia* los valores obtenidos fueron  $D = 0.000$  y  $D = 0.037$  (Álvarez-Buylla y Garay, 1994) finalmente en *Enterolobium cyclocarpum* se reportaron los siguientes valores  $D = 0.0019$  y  $D = 0.0737$  (Rocha y Lobo, 1996).

### Relaciones genéticas

Los fenogramas construidos a partir de las distancias genéticas mostraron algunas diferencias. En UPGMA se observaron dos agrupamientos principales (Figura 8). Las poblaciones que forman el primer agrupamiento y presentaron las distancias genéticas más pequeñas dentro de este grupo fueron Celestún, Centla y Tamiahua las cuales se unen a Carmen con una distancia  $D = 0.030$ . En el segundo agrupamiento Ría Lagartos y Sontecomapan presentaron la distancia genética menor ( $D = 0.008$ ), éstas se unieron a Punta Allen con una distancia  $D = 0.024$  y finalmente Tuxpan se unió a estas poblaciones con una distancia  $D = 0.040$ . Ambos agrupamientos estuvieron unidos con una distancia genética  $D = 0.057$

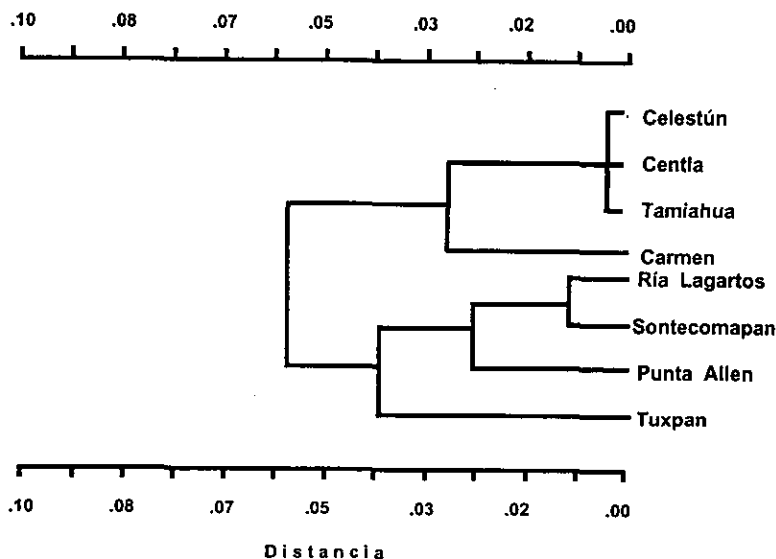


Figura 8. Fenograma construido a partir de las distancias genéticas entre las poblaciones de *Rhizophora mangle* (método UPGMA).

En el método Neighbor-joining se observaron tres agrupamientos principales. En el primer agrupamiento las poblaciones que mantuvieron las distancias genéticas más pequeñas fueron Carmen y Centla que se unen a su vez con Celestún. En segundo agrupamiento Sontecomapan y Punta Allen presentaron las distancias genéticas más pequeñas, a éstas se unen a Ría Lagartos y finalmente se unen a Tuxpan. El último agrupamiento estuvo formado por Tamiahua (Figura 9).

En ambos fenogramas se observan agrupaciones entre poblaciones que geográficamente son distantes (por ejemplo Sontecomapan-Punta Allen, Tuxpan-Ría Lagartos, en el árbol de Neighbor-joining) pero que presentan distancias genéticas menores que poblaciones con distancia geográficas menores (Tamiahua-Tuxpan por ejemplo). Estos resultados pueden ser un reflejo de la acción de la deriva génica sobre la estructura genética de *Rhizophora mangle*.



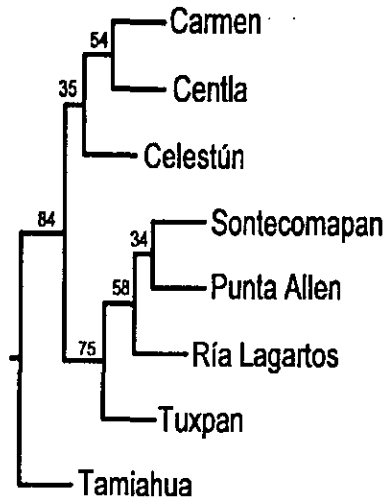


Figura 9. Fenograma consenso construido con el método Neighbor-joining y la técnica de remuestreo bootstrap, los números sobre las bifurcaciones muestran el número veces que las poblaciones permanecen unidas después de 100 réplicas.

## DISCUSION

En este estudio se encontró que *Rhizophora mangle*, una especie leñosa de vida larga, alberga poca diversidad genética dentro de sus poblaciones y mantiene una importante diferenciación entre éstas. Los resultados arrojados contrastan con aquellos reportados para otras especies arbóreas tropicales (Tabla 13).

El porcentaje de loci polimórficos y número promedio de alelos por locus de *Rhizophora mangle* es menor que el reportado para especies leñosas de vida larga, especies tropicales con un amplio rango de distribución (excepto *Acacia mangium* y *Pentaclethra maculoba*) y especies tropicales mexicanas (Tabla 13). Además, *Rhizophora mangle* se distingue del resto de las especies arbóreas tropicales por presentar el nivel de diversidad genética más bajo (excepto en *A. mangium*).

Goodall y Stoddart (1989), reportaron poca diversidad genética en poblaciones australianas de *R. stylosa*. Solamente se encontraron dos enzimas polimórficas de las cuales fue posible interpretar una, la 6-PGD, partir de ésta última se obtuvo una  $F = 0.023$ .

Los índices de fijación de especies arbóreas templadas generalmente son bajos y en especies arbóreas tropicales son bajos o negativos. Los índices de fijación positivos encontrados para *Rhizophora mangle* indican que existe un alto nivel de endogamia pocas veces observado en especies tropicales (Tabla 13). *Rhizophora mangle* presenta los niveles de diferenciación genética ( $F_{ST}$ ) más grandes dentro de las especies con un amplio rango de distribución geográfica, excepto en *Pentaclethra maculoba*. Pero comparada con especies mexicanas muestra mayor diferenciación interpoblacional. Estos resultados señalan que muy probablemente la endogamia determina la forma en que se distribuye la diversidad genética en esta especie y además explicaría la baja diversidad genética encontrada.

La excepción al patrón de variación genética observado es la PGI-2, donde se encontró que había un exceso de heterocigotos en la mayoría de las poblaciones. Al parecer, la selección natural favorece a los genotipos heterocigotos. En estudios realizados con moluscos se ha observado una alta heterocigosis en loci isoenzimáticos asociados con componentes de la adecuación (eficiencia metabólica,

Tabla 13. Diversidad genética de plantas tropicales. Los intervalos de confianza al 95% se muestran entre paréntesis.

| Referencia   | P               | A               | H                | F <sub>IS</sub>    | F <sub>ST</sub>   | F <sub>IT</sub>    | N <sub>m</sub> |
|--|-----------------|-----------------|------------------|--------------------|-------------------|--------------------|----------------|
| Plantas leñosas de vida larga<br>Hamrick 1992                            | 65.0<br>(3.724) | 2.22<br>(0.117) | 0.177<br>(0.011) |                    | 0.084<br>(0.015)  |                    |                |
| 38 estudios de árboles tropicales<br>Hamrick y Loveless, 1992            | 39.8<br>(6.86)  | 1.51<br>(0.098) | 0.125<br>(0.245) |                    | 0.119<br>(0.049)  |                    |                |
| <i>Rhizophora mangle</i><br>Cormejo, 1998                                | 27.75           | 1.31            | 0.105            | 0.6124             | 0.2570            | 0.4784             | 0.705          |
| <i>Enterolobium cyclocarpum</i><br>Rocha y Lobo, 1996 <sup>a</sup>       | 64.70           | 2.2             | 0.365            | 0.001              | 0.039             | 0.040              |                |
| <i>Cordia alliodora</i><br>Chase et al. 1992 <sup>a</sup>                | 44.00           | 1.72            | 0.143            |                    | 0.117             |                    |                |
| <i>Acacia mangium</i><br>Moran et al. 1989 <sup>a</sup>                  | 12.70           | 1.14            | 0.017            |                    | 0.008             |                    |                |
| <i>Pentaclethra macroloba</i><br>Hall, 1994 <sup>a</sup>                 | 31.0            |                 | 0.074            | 0.130              | 0.0259            |                    | 0.219          |
| <i>Asrocaryum mexicanum</i><br>Eguarte et al. 1992 <sup>b</sup>          | 31.80           | 1.36            | 0.153            | -0.4169<br>(0.162) | 0.0396<br>(0.015) | -0.3585<br>(0.136) |                |
| <i>Psychotria faxlucens</i><br>Pérez-Nasser et al. 1993 <sup>b</sup>     | 40.00           | 2.5             | 0.495            | 0.115              | 0.026             | 0.138              |                |
| <i>Cecropia obtusifolia</i><br>Alvárez-Buylla y Garay, 1994 <sup>b</sup> | 58.13           |                 | 0.380            | 0.034<br>(0.014)   | 0.029<br>(0.012)  | 0.061<br>(0.022)   |                |
| <i>Bursera hindsiana</i><br>Vargas, 1998 (manuscrito) <sup>b</sup>       | 90.90           | 2.35            | 0.287            | 0.118              | 0.169             | 0.267              |                |
| <i>Erythroxylum havense</i><br>Ibarra, 1998 (manuscrito) <sup>b</sup>    | 80.60           | 1.7             | 0.387            | -0.165             | 0.263             | 0.127              | 0.515          |

<sup>a</sup> estudios realizados en árboles y arbustos tropicales con un amplio rango de distribución geográfica

<sup>b</sup> estudios realizados en árboles tropicales mexicanos.

tasa de crecimiento). En dichos estudios se concluye que el polimorfismo isoenzimático (en virtud de su influencia sobre rutas metabólicas centrales), por sí mismo es la base de diferencias energéticas fisiológicas. La selección balanceadora sobre loci polimórficos puede oponerse a la influencia de la deriva génica causada por eventos históricos o restricciones actuales en el flujo génico (Karl y Avise, 1992).

Es importante mencionar que las comparaciones entre estudios deben realizarse considerando que el número de loci, número de individuos, número de poblaciones muestreadas, así como la distancia entre poblaciones son muy variables y probablemente afecten las estimaciones de la variación genética de las especies, por lo que solamente se toman como un marco de referencia. Tampoco debe olvidarse que la historia evolutiva particular de una especie, juega un papel determinante en su estructura genética.

Por otra parte, las tasas de entrecruzamiento obtenidas muestran que los apareamientos en *Rhizophora mangle* son, en su mayoría, producto de la autofertilización, la cual reduce la diversidad genética y promueve la diferenciación poblacional vía deriva génica.

*Rhizophora mangle* forma densos bosques que son muy pobres en especies, muy frecuentemente estos bosques consisten únicamente de *R. mangle*, la cual forma tanto el dosel como el sotobosque. Si la autofecundación es el sistema de apareamiento predominante a lo largo del rango de distribución de esta especie entonces muchos de los ecosistemas de manglar pueden estar constituidos por una fundación genéticamente precaria, es decir, los bosques de manglar son monoespecíficos y con poca diversidad genética (Lowenfeld y Klekowski, 1992).

La baja diversidad genética de *Rhizophora mangle*, la tasa de entrecruzamiento alta y la diferenciación poblacional puede ser consecuencia de su condición como especie colonizadora.

Los datos señalan que la diferenciación genética de las poblaciones de *R. mangle*, también pueden deberse a la deriva génica y factores históricos. Repetidos eventos de colonización y extinción han resultado de los cambios en la temperatura durante el Pleistoceno, la extinción local y subsecuente colonización de nuevas poblaciones a partir de un número reducido de individuos (evento fundador) ha sido un evento común (Toledo, 1982; Graham, 1995; Ricklefs y Latham, 1993), además se

considera que las comunidades de manglar americanas son un subgrupo formado de las especies de manglar provenientes de la región Indo-Asiática (Ricklefs y Latham, 1993; Tomlinson, 1994) . Lo anterior aunado un régimen de autofertilización originarían una reducción en la variación genética dentro de las poblaciones y la divergencia entre éstas.

La deriva genera diferenciación al azar independientemente de las condiciones locales, lo cual explicaría el comportamiento de los índices de similitud y las distancias genéticas encontrados, donde poblaciones que geográficamente son muy distantes mantienen una mayor similitud que poblaciones cercanas.

Por otro lado, los valores obtenidos para el flujo génico muestran que éste es escaso entre las poblaciones de *R. mangle* lo cual podría favorecer que las poblaciones evolucionen de manera independiente.

La diferenciación poblacional y el flujo génico encontrado pueden explicarse considerando las observaciones hechas por Rabinowitz (1980) quien estableció que las plántulas migran cerca de la planta madre y que los eventos de colonización a gran distancia son más bien esporádicos. Si los propágulos migrantes provienen de poblaciones cercanas, entonces el escaso flujo génico que pueda darse entre las poblaciones no disminuye los efectos de la deriva génica e incrementa la diferenciación poblacional.

En la literatura se han reportado algunos estudios, donde se propone que los eventos ocurridos durante el Pleistoceno han sido factores históricos determinantes de la estructura genética de especies tropicales. Wolff y Jefferies (1987) (en Barret, 1990), señalan que la ausencia de variación isoenzimática en poblaciones de la planta halófila *Salicornia europea* (presente en los humedales del Norte de América), puede ser resultado de un severo cuello de botella asociado con la destrucción de hábitats costeros después de la glaciación del Pleistoceno. Asimismo Moran *et al.* 1989, establecen que la distribución de las comunidades modernas donde se desarrolla la especie colonizadora *Acacia mangium* (hábitats costeros y ribereños) se debe a una serie de glaciaciones ocurridas durante el Cuaternario.

Los resultados de este estudio también coinciden con las ideas de Tomlinson y Primack, 1980 y Tomlinson, 1994 quienes sugieren que los eventos de extinción de poblaciones locales es un evento común en las comunidades de manglar así como la

colonización de nuevas poblaciones a partir un número reducido de individuos; pese a que los propágulos de mangles tienen un gran potencial de dispersión (Rabinowitz, 1978).

La diversidad genética en *Rhizophora mangle*, no está contenida dentro de una única población, sino que está distribuida entre las poblaciones debido a su diferenciación. En este sentido, cada población local puede considerarse única y la pérdida de ellas significa la pérdida de esa diversidad genética.

La conservación de la diversidad genética de especies arbóreas tropicales es crítico para el mantenimiento de la biodiversidad. La deforestación a gran escala de los manglares puede llevar a la reducción en el tamaño efectivo de la población y al aislamiento genético debido a la fragmentación de poblaciones. Consecuentemente la variabilidad genética de las especies constitutivas del manglar puede verse erosionada, causando pérdida de la biodiversidad (Chase *et al.* 1995b).

Las poblaciones más diversas genéticamente (y por lo tanto de mayor importancia para conservar la biodiversidad contenida en la especie) son Centla y Carmen. En el caso de Centla se observó también el mayor flujo génico y la tasa de entrecruzamiento con menor proporción de endogamia asimismo en esta población se encontró el índice de fijación promedio más bajo ( $F = 0.261$ ). Cabe destacar que Centla fue la población que presentó mayor diversidad florística (Tabla 1).

Independientemente de la baja diversidad genética encontrada, existe una amplia diversidad en lo que se refiere a las características estructurales y morfológicas, de esta especie. El tamaño de los árboles, la densidad y abundancia relativa de *Rhizophora mangle* varía ampliamente entre los sitios muestreados incluyendo las poblaciones estudiadas en el Pacífico. Por ejemplo, la altura promedio de los árboles en cada comunidad difirió significativamente entre las comunidades del Pacífico y el Atlántico. En el Golfo de México y Mar Caribe las alturas máximas se observaron en Centla y Celestún (hasta 20m) y las menores en Punta Allen (12 m). La capacidad que presenta esta especie para establecerse en ambientes tan diversos geomorfológicamente se refleja en la heterogeneidad estructural de las comunidades. Esta heterogeneidad estructural, puede ser a su vez un reflejo de la plasticidad fenotípica de las especies que constituyen las comunidades de manglar y en particular de *R. mangle*. Algunos autores (Barret, 1989; Barret y Husband, 1990)

consideran que la plasticidad fenotípica compensa de alguna manera la uniformidad genética de los individuos y las poblaciones (principalmente especies endogámicas).

Dadas las funciones que cumplen los manglares en cuanto a la protección de la costa, como hábitat para mamíferos, reptiles y aves, como áreas de crianza para peces y crustáceos, y como importantes contribuyentes a la productividad de las áreas costeras, es urgente proponer sistemas de aprovechamiento que preserven la biodiversidad de estos ecosistemas (Snedaker y Getter, 1985; Cintrón-Molero y Schaeffer-Novelli, 1992; Mooney *et al* 1995).

La información de esta tesis puede emplearse para diseñar áreas de conservación para preservar la variación genética y morfológica de esta especie y por consiguiente de las comunidades vegetales en las que habita.

## CONCLUSIONES

- Las poblaciones de *Rhizophora mangle* establecidas en el Atlántico presentan poca diversidad genética y alta diferenciación poblacional.
- Los índices de fijación, tasa de entrecruzamiento y flujo génico encontrados señalan, que muy probablemente la deriva y la endogamia son las principales fuerzas evolutivas que determinan la estructura genética de esta especie. Sin embargo, *la selección natural puede ejercer un papel importante en algunos loci.*
- Las poblaciones que mostraron mayor diversidad genética y deben ser consideradas prioritarias para la conservación de la especie en la región del Atlántico son Carmen, Centla y Tamiahua.
- Cada población representa una fracción la diversidad genética contenida dentro de esta especie, cada población es única, por lo que la pérdida de éstas significaría la pérdida de esa fracción de la diversidad.



## BIBLIOGRAFIA

- Álvarez-Buyila, E. R. y A. A., Garay. 1994. Population genetic structure of *Cecropia obtusifolia*, a tropical pionner tree species. *Evolution* 48(2):437-453
- Ángeles, A. G. 1997. Parte II: Las plantas (Listados). En González, S. E., Dirzo, R. y R. C., Vogt (eds), Historia Natural de los Tuxtlas, 148-149. UNAM, Instituto de Biología, Instituto de Ecología y CONABIO. México.
- Avise, J. C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman and Hall, New York. 511
- Barret, S. C. H. y B. C., Husband. 1990. The genetics of plant migration and colonization. In Brown, A. H. D., Clegg, M. T., Kahler, A. L., and B. S., Weir (eds), Plant population genetics, breeding and genetic resources, 254-277. Sinauer Associates, Sunderland, M.A.
- Barret, 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.
- Bawa, K. D. 1992 Mating Systems, genetic differentiation and speciation in tropical rain forest plants. *Biotropica* 24(2b):250-255
- Castañeda, S. A. N. 1996. Estructura genética en el complejo "jethys" (Lepidoptera: Papilionoidea; *Enantia*) en México. Tesis Doctoral. Instituto de Ecología, UNAM. 161
- Chase, M. R., Boshier, D. H. and K. S. Bawa. 1995a. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 1. Genetic variation in natural populations. *American Journal of Botany*. 82(4):468-475.
- Chase, M. R., Boshier, D. H. and K. S. Bawa. 1995b. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 3. Gene flow, neighborhood, and population substructure. *American Journal of Botany*. 82(4):484-490.
- Cheliak, W. M. y J. A., Pitel. 1984. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. Petawawa National Forestry Institute, Canadian Forestry Service Canada, Agryculture Canada. Canada. 49
- Cintrón-Molero, G. y Y., Schaeffer-Novelli. 1992. Ecology and management of New World mangroves. In Coastal Plant Communities of Latin America. Academic Press, Inc. 233-256.

- Cintron-Molero, G. Lugo, A. E. y R., Martínez. 1989. Structural and functional properties of mangrove forests. *In* Darcy, W.G. and M.D., Correa (eds.), *The Botany and Natural History of Panama*, 10:53-66. Monogr. Bot St. Louis Missouri. Botanical Garden
- Conckle, M.T., Hodgskiss, P. D, Nunnally, L. B. and S. C., Hunter. 1982. Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual. Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, Berkeley California. U.S.A. 18
- Denirstein, E. 1995. Conservation Assessmente of mangrove eocsystem. *In* A conservation assessment of the terrestrial ecoregions of latin America and the Caribbean. The World Bank Foundation/WWF. 36-41
- Domínguez, Q. C. A., Eguiarte, L. E., Núñez-Farfán, J. S. and R., Dirzo. (*en prensa*). Flower morphometry of *Rhizophora mangle* (Rizophoraceae): geographical variation in Mexican populations. *American Journal of Botany*.
- Eguiarte, F. L. E. 1988. Una guía para principiantes en la genética de poblaciones. *En*: Polémicas contemporáneas en evolución. AGT Editor, S.A. México. 41-56.
- Eguiarte, F. L. E. 1990. Genética de poblaciones de *Astrocaryum mexicanum* Liebm. *en* Los Tuxtlas, Veracruz. Tesis Doctoral. Centro de Ecología, UNAM. 189
- Eguiarte, L. E.; Pérez-Nasser, N. y Piñero, D. 1992. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocarym mexicanum* (tropical palm): implications for evolution and conservation. *Heredity* 69:217-288.
- Flores-Verdugo, F., González-Farías, F. Zamorano, D. S. y P., Ramírez-García. 1992. 17 Mangrove ecosystems of the Pacific Coast of Mexico: Distribution, structure, litterfall, and detritus dynamics. *In* Seelinger, U. (ed), *Coastal Plant Communities of Latin America*, 269-288. Academic Press, Inc. U.S.A.
- Garay, A. A. 1991. Montaje de un sistema de loci polimórficos para una especie arbórea neotropical *Cecropia obtusifolia*. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, UNAM. 66
- Goodall, J. A. and J. A., Stoddart. 1989. Techniques for the electrophoresis of mangrove tissue. *Aquatic Botany*, 53:197-207
- Graham, A. 1995. Diversification of Gulf/Caribbean mangrove communities through Cenozoic Time. *Biotropica*. 27(1):20-27.
- Hall, P., Chase, M. R. y K. S., Bawa. 1994. Low genetic variation but high population differentiation in a common tropical forest tree species. *Conservation Biology*. 8(2):471-482

- Hamrick, J. L., y M. D., Loveless. 1986. Isozyme Variation in tropical trees: procedures and preliminary results. *Biotropica* 18(3):201-207.
- Hamrick, J. L., Godt, M. J. W. and S. L., Sherman-Broyles. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forest*. 6:95-142
- Hamrick, J. L., Godt, M. J. W., Murawski, D. A. y M. D., Loveless. 1991. Correlations between species traits and allozyme diversity: implications for conservations biology. In Falk, D.A. and K., Holsinger (eds.), Genetic and conservation of rare plants, 5 75-86. Oxford University Press, New York.
- Hamrick, J. L. y M. J. W., Godt. 1996. Effects on life history traits on genetic diversity in plant species. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*. 351:1291-1298
- Hartl, D. L. y A. G., Clarck. 1989. Principles of populations genetics. Sinauer Associates, Inc. Publishers. USA. 682.
- Hedrick, P. W. 1983. Genetics of populations. Science Books International. USA. 629.
- Izquierdo, L. Y. 1995. Estructura y variación genética en cuatro especies de *Achmea* (Bromeliaceae) en México: *A. mexicana* (Baker), *A. lueddemanniana* (K. Koch), Brongn. ex Mez in Engl., Pflanzanr., *A. macvaughii* L. B. Smith y *A. tuitensis* (P. Magaña y E. Lott). Tesis Doctoral. Centro de Ecología, UNAM. 129
- Joshi, G. V., Sontakke, D. y L. J., Bhosale. 1980. Studies in photosynthetic enzymes from mangroves. *Botanica marina*. Vol. XXIII 745-747
- Karl, S. A. y J. C., Avise. 1992. Balancing selection at allozyme loci in oysters: implications from nuclear RFLP's. *Science*. 256: 100-103.
- Li, C. C. y D. G., Horvitz. 1953. some methods of estimating the inbreeding coefficient. *American Journal of Human Genetics*. 5:107-117.
- Lot, A., and A., Novelo. 1990. Forested wetlands of Mexico. In Lugo, A. E.; Brison, M. and S., Brown (eds), Ecosystems of the world 15 Forested Wetlands, 287-298.
- Lot-Helgueras, A., Vázquez-Yanes, C. y F., Menéndez. 1975. Physiognomic and floristic changes near the northern limit of mangroves in the Gulf coast of Mexico. In Snedaker W. C. and H. Teas (eds), Proceeding of the International Symposium on Biology and Management of Mangroves, 52-61. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville.
- Loomis, W. 1974. Overcoming problems of phenolics and quinones in the isolation of plant enzymes and organelles. *Methods in Enzimology*. 3:528-544

- Lowenfeld, R. y E. J. Klekowski, Jr. 1992. Mangrove genetics. I. Mating system and mutation rates of *Rhizophora mangle* in Florida and San Salvador Island, Bahamas. *Int. Journal Plant Science*. 153(3):394-399.
- Lowenfeld, R. and E. J., Klekowski, Jr. 1994. Mangrove genetics. II. Outcrossing and mutation rates in Puerto Rican *Rhizophora*. *Int. Journal Plant Science*. 155(3):373-381.
- Lugo, A. E. and S. C., Snedaker. 1974. The ecology of mangroves. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 5:39-64
- McMillan, C. 1986. Isozyme patterns among populations of black mangrove, *Avicennia germinans*, from the Gulf of Mexico-Caribbean and Pacific Panama. *Contributions in Marine Science*. 29:17-25
- Mitton, J., Linhart, Y., Sturgen, K. y J., Hamrick. 1979. Allozyme polymorphisms detected in mature needle tissue of ponderosa pine. *The Journal of heredity*. 70:86-89.
- Mitsch, W. J. and J. G., Gosselink. 1986. Wetlands. Van Nostand Reinhold, New York. 539
- Mooney, H. A., Lubchenco, J. Dirzo, R. y O. E., Sala. 1995. Biodiversity and ecosystems functioning: ecosystem analyses. *In* Global biodiversity Assessment, 387-393. UNEP. Cambridge University Press.
- Moran, G. F., Muona, O. and J.C., Bell. 1989. *Acacia mangium*: a tropical forest tree of the coastal lowlands with low genetic diversity. *Evolution*. 43(1):231-235.
- Moran, G. F. y D. R., Marshall. 1978. Allozyme uniformity within and variation between races of the colonizing species *Xanthium strumarium* L. (Noogoora Burr). *Australian Journal of Biology Sciences*. 31:289-291
- Murphy, R. W., Sites, J. W., Buth, D. G. y C. H., Haufler. 1990. Proteins I. Isozyme electrophoresis. *In* Hillis, D. M. y C., Moritz (eds.), Molecular Systematics. Sinauer Associates Inc Publishers. Massachusetts, USA. 588.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*. 221:40-42
- Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York. 512
- Núñez-Farfán, J. S., Eguiarte, F. L. F., Domínguez, Q. C. A. y R., Dirzo. 1996. Estudio Ecológico de las poblaciones de *Rhizophora mangle* en México. Informe Final del Proyecto CONABIO NO. B007. Instituto de Ecología, UNAM, México. 95

- Núñez-Farfán, J. S., Eguiarte, F. L. F., Domínguez, Q. C. A. y R., Dirzo. 1996. Estudio genético de las poblaciones de *Rhizophora mangle* en México. Informe Final del Proyecto CONABIO NO. B007. Instituto de Ecología, UNAM, México. 73
- Pasteur, N. and G., Pasteur. 1988. Isozyme genetics. Ellies Horwood Limited & John Wiley and sons. Great Britain. 215
- Pérez-Nasser, N., Eguiarte, L. E. and D., Piñero. 1993. Mating system and genetic structure of the distylous tropical tree *Psychotria faxlucens* (Rubiaceae). *American journal of Botany*. 80(1): 45-52
- Primack, R. B., and P. B., Tomlinson. 1980 Variation in tropical forest breeding systems. *Biotropica*. 12:229-231
- Rabinowitz, D. 1978. Dispersal properties of mangrove propagules. *Biotropica*. 10(1):47-57
- Rzedowski, J. 1981. Vegetación de México. Editorial Limusa S.A. México. 432
- Ricklefs, R. E. and R. E., Latham. 1993. Global pattens of diversity in Mangrove Floras. In Ricklefs, R. E. and D. S., Schluter (eds.), Species diversity in ecological communities, 215-229. The University of Chicago Press.
- Rocha, O. J. y J. A., Lobo. 1996. Genetic variation and differentiation among five populations of the guanacaste tree (*Enterolobium cyclocarpum* Jacq.) in Costa Rica. *Int. J. Plant. Sci.* 157(2):234-239
- Saenger, P., Hergerl, E. y J., Davie. 1983. Global status of Mangrove Ecosystems. The Environmentalist 3. Supplement 3
- Slatkin, M. 1985. Rare alleles as indicator of gene flow. *Evolution*. 39:53-65
- Slatkin, M. 1990. Flujo génico en poblaciones naturales. *Ciencias*. 17:10-14
- Slatkin, M. 1994. Gen flow and population structure. In L. A. Real, (ed.), Ecological genetics, 3-17. Princenton University Press, Princenton.
- Snedaker, S. y C. D., Getter. 1985. Costas: Pautas para el manejo de los recursos costeros. Research Plannina Institute, Inc. U.S.A. 286
- Soltis, D. E. and P. S., Soltis. 1989. Isozyme in Plant Biology. Advances in plant science series. Vol. 4. U.S.A.
- Sytsma, K. J. y B. A., Schaal. 1985. Genetic variation, differentiation, and evolutin in a species complex of tropical shrubs based on isozymic data. *Evolution*. 39(3):582-593

- Toledo, V. 1982. Pleistocene changes of vegetation in tropical Mexico. *In* G. T. Prance (ed), Biological diversification in the tropics, 93-111. Columbia University Press, New York, NY.
- Tomlinson, P. B. 1994. The botany of mangroves. Cambridge University Press. 419
- Trejo-Torres, J. C., Durán, R. y E. L., Olmsted. 1993. Manglares de la península de Yucatán. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 662-672
- Vargas, G. J. 1998. Variación genética de *Bursera hindsiana* (Betham) Engl. en la Península de Baja California y Sonora.
- Vázquez-Yanes. C. 1980. Rhizophoraceae. En: Flora de Veracruz. Fascículo 12. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos, Xalapa, Veracruz.
- Weir, B. S. y C. C., Cockerham. 1984. Estimating F statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 38:1358-1370.
- Wendel, J. F. 1989. Visualization and interpretation of plant isozyme. *In* Soltis, D. E. and P. S., Soltis (eds.), Isozyme in Plant Biology, 5-45. Advances in plant science series Vol. 4. U.S.A.
- Workman, P. L. y J. D., Niswander. 1970. Populations studies on southwestern Indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. *American Journal of Human Genetics*. 22:24-49.

# APENDICE

## BUFFERS DE EXTRACCION

### Buffer de extracción para la familia Rhizophoraceae (Modificado)

Goodall y Stoddart, 1989.

#### Solución stock

- 0.1M buffer de fosfatos pH 6.8

Para 100 ml de buffer de fosfatos

a)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.978 g

b)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.489 g

Añadir a 100 ml de solución stock

- PVP-40 7 g

- PVP-360 1 g

#### Buffer de trabajo

Para 50ml de solución stock

- Borato de sodio 400 mg

- DIECA 450 mg

- NADP<sup>+</sup> 10 mg

- NAD<sup>+</sup> 20 mg

- ASB 500 mg

### Milton Modificado

Garay, 1991.

- Dioxido de germanio 0.38 g

Hervirlo en 38 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

- DIECA 0.137 g

- Bisulfito y metabisulfito

de sodio 0.15 g

- PVP-40 6 g

- L-Acido ascórbico 2 g

- 0.16M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7.0 4 ml

- Tetraborato de sodio 0.55 g

g

A la hora de moler añadir

- DMSO 4 ml

- 2-fenoxietanol 2.5 ml

- DTT 0.075 g

- 2-Mercaptoetanol 0.3 ml

### Buffer de extracción para enzimas

#### fotosintéticas de manglares

Joshi *et al.* 1980.

Para 50 ml

- 50 mM Tris-HCl pH 7.5 0.302 g

- 2 mM  $\text{MgCl}_2$  0.02 g

- 1 M EDTA 0.018 g

- 1.5 % PVP-40 0.75 g

- 10 mM Metabisulfito

de sodio 0.095 g

- 40 mM Mercapatoetanol 140  $\mu\text{l}$

(Añadir justo antes de teñir)

## SISTEMAS DE CORRIMIENTO

### SISTEMA R

May, 1992.

#### Buffer de la charola pH 8.1

- 0.06M Hidróxido de sodio 2.51 g

- 0.03M Acido bórico 18.54 g

Ajustar el pH con 1M LiOH o 1M  $\text{H}_3\text{BO}_3$ .

Aforar a 1lt con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

#### Buffer del gel pH 8.5

- Trizma base 3.63 g

- Acido cítrico 0.96 g

- Buffer de la charola 10 ml

Aforar a 1lt con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

Correr a 60 mA durante 3-4 hr.

### SISTEMA 2

Miles *et al.* 1977.

#### Buffer de la charola pH 9

- 0.15M Sigma 7-9 18.17 g

- 0.075M Ac. cítrico monohidratado 1.58g

Ajustar el pH con 1M Sigma o 1M Acido

cítrico. Aforar a 1lt con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

#### Buffer del gel

- 1:9 buffer de la charola- $\text{H}_2\text{O}$  destilada

No se ajusta el pH.

Correr a 200V durante 6-7hr.

### SISTEMA MC MORFOLINA

Wyatt, 1989.

#### Buffer de la charola pH 6.1

- 0.04M Ac. Cítrico monohidratado 8.4.g

Ajustar el pH con

N-3-aminopropylmorfolina 10ml (aproximadamente)

Aforar a 1lt con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

#### Buffer del gel pH 6.1

- 1:19 buffer de la charola-  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.

Ajustar el pH con microgotas de

N-3-aminopropylmorfolina

Correr a 60mA durante 6-7hr.

### SISTEMA 7

Garay, 1991.

#### Buffer de la charola pH 8.3

- Hidróxido de litio 1.6 g
- Acido bórico 11.6 g

Ajustar el pH con 1M LiOH o 1M H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>

Aforar a 1lt con H<sub>2</sub>O destilada.

#### Buffer del gel pH 8.3

- Sigma 7-9 5.45 g
- Ac cítrico monohidratado 1.3 g
- Buffer de charola 100 ml

Ajustar el pH con 1M NaOH.

Correr a 60 mA durante 3-4 hr.

### SISTEMA POULIK

Hakim-Elahi, 1976.

#### Buffer de la charola pH 8.6

- Acido bórico 18.55 g
- NaOH 4 g

Ajustar el pH con 1M Acido bórico o 1M NaOH.

Aforar a 1l con H<sub>2</sub>O destilada.

#### Buffer del gel pH 8.1

- Acido cítrico monohidratado 0.63 g
- Sigma 7-9 2 g

Ajustar pH con 4M Acido cítrico.

Aforar a 1l con H<sub>2</sub>O destilada.

Correr a 60 mA durante 4-5hr.

### SISTEMA 8-

Garay, 1991.

- Parte A 76.8 ml
- Parte B 326.4 ml

Ajustar el pH a 7.6 con HCl diluido.

Aforar a 1l con H<sub>2</sub>O destilada.

#### Parte A

- LiOH 2.4 g
- Acido bórico 23.4 g

Ajustar a pH 8.0 con LiOH.

#### Parte B

- Tris 7-9 12.36 g
- Acido cítrico 3.36 g

Correr a 60 mA hasta que el frente del gel alcance 7 cm

### SISTEMA I

Goodall y Stoddart, 1989.

#### Buffer de la charola pH 7.2

- 167 mM Trizma base 20.22 g
- 52 mM Acido cítrico 9.98 g

Ajustar el pH con 1M Trizma base o 1M Acido cítrico.

Aforar a 1 lt con H<sub>2</sub>O.

#### Buffer del gel

- Buffer de la charola 9.5 ml
- H<sub>2</sub>O destilada 270 ml

No se ajusta el pH.

Correr a 200 V durante 4 hr.

### SISTEMA II

Goodall y Stoddart, 1989.

#### Buffer de la charola pH 7.78

- 135 mM Tris 7-9 20.22 g
- 4 mM EDTA 1.48 g

- 32 mM Acido cítrico 9.98 g

Ajustar el pH con 1M Tris o 1M Acido cítrico.

Aforar a 1 lt con H<sub>2</sub>O.

#### Buffer del gel

- Buffer de la charola 23 ml
- H<sub>2</sub>O destilada 270 ml

No se ajusta el pH.

Correr a 200 V durante 4.5 h.

### ENZIMAS

#### ACO (ACONITASA; E.C. 4.2.1.3)

Murphy *et al.* 1990.

Pesar:

- Acido cis-Aconítico 75 mg

Añadir:

- 0.2M Tris-HCl pH 8.0 50 ml
- 1M MgCl<sub>2</sub> 2 ml
- IDH deshidrogenasa 5 u
- TPN (NADP<sup>+</sup>) 1% 1 ml
- MTT 1% 1 ml
- PMS 1% 0.5 ml

Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente.



**ACPH (FOSFATASA ACIDA E.C. 3.1.3.2)**

Hakim-Elahi, 1976.

**Pesar:**

- Fast Garnet GBC 150 mg

**Añadir:**

- 1M Acetato de sodio pH 5.0 6 ml

- H<sub>2</sub>O destilada 90 ml- MgCl<sub>2</sub> 10% 1 ml

- Acido fosfórico de α-naftilo al 1% 3 ml

Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente.

**ADH (ALCOHOL DESHIDROGENASA****E.C. 1.1.1.1)**

Conckle et al. 1982.

**Pesar:**- NAD<sup>+</sup> (β-DPN) 10 mg

- NBT 10 mg

**Añadir:**

- 0.2M Tris-HCl pH 8 40 ml

- Etanol al 95% o al 100% 5 ml

- PMS 1% 0.5 ml

Incubar en la obscuridad a 30°C.

**AK (ADENILATE KINASE E.C. 2.7.4.3)**

Cheliak y Pitel, 1984.

**Pesar:**

- D-(+)Glucosa 50 mg

- Adenosina 5'-difosfato 25 mg

**Añadir:**

- 0.2M Tris-HCl pH 8.0 25 ml

- Hexoquinasa 125 u

- Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa,

(G-6-PD 10u/ml) 2.5 ml

- 1M MgCl<sub>2</sub> 0.5 ml- TPN (NADP<sup>+</sup>) 1% 0.5 ml

- MTT 1% 0.5 ml

- PMS 1% 0.5 ml

Incubar en la obscuridad a 37°C

aproximadamente 2 h

**APX (PEROXIDASA ANODICA E.C.****1.11.1.7)**

Hakim-Elahi, 1976.

**Pesar:**

- 3-Amino-9-etilcarbazolio 100mg

**Añadir:**

- Dimetilformamida 7 ml

- H<sub>2</sub>O destilada 90 ml

- Peróxido de hidrógeno al 3% 1 ml

- Ca<sub>2</sub>Cl 1% 2 ml

- 1M Acetato de sodio pH 5.0 5ml

Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente.

**CPX (PEROXIDASA CATODICA; E.C. 1.11.1.7)**

Hakim-Elahi, 1976.

**Pesar:**

- 3-Amino-9-etilcarbazolio 100 g

**Añadir:**

- Dimetilformamida 7 ml

- H<sub>2</sub>O destilada 90 ml

- Peróxido de hidrógeno al 3% 1 ml

- Ca<sub>2</sub>Cl 1% 2 ml

- 1M Acetato de sodio pH 5 5ml

Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente.

**DIA (DIAFORASA; E.C. 1.6.4.3)**

Cheliak y Pitel, 1984.

**Pesar:**

- 2,6-Dichlorofenol-indofenol 0.5 mg

- β-NADH 13 mg

**Añadir:**

- 0.2M Tris-HCl pH 8.0 25 ml

- MTT 1% 0.5 ml

Incubar en la obscuridad a 37°C durante 45 minutos.

**EST (ESTERASA; E.C. 3.1.1.1)**

Murphy et al, 1990.

**Pesar:**

- Fast blue BB salt 50 mg

**Añadir:**

- 0.2M Tris-HCl pH 7 50 ml

- Acetato de α-naftilo 1% 3 ml

Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente.

**FE (ESTERASA FLUORESCENTE; E.C. 3.1.1.1)**

Cheliak y Pitel, 1984.

**Pesar:**

- Metilumbeliferil acetato 0.83 g

**Añadir:**

- Sustrato FE 25 ml

- Acetato de sodio pH 5 18 ml

- Agua destilada 82 ml

- Acetona 500 ml

Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente durante 5 minutos. Checar el gel bajo luz ultravioleta.

**G D H (GLUTAMATO DESHIDROGENASA; E.C. 1.4.1.2)**

Wendel y Weeden, 1989.

**Pesar:**

|                                 |       |
|---------------------------------|-------|
| - Acido L-Glutámico, sal sódica | 0.4 g |
| - NAD <sup>+</sup>              | 10 mg |
| - NBT                           | 10 mg |

**Añadir:**

|                        |       |
|------------------------|-------|
| - 0.05M Tris-HCl pH 8  | 50 ml |
| - CaCl <sub>2</sub> 1% | 5 ml  |
| - PMS 1%               | 1 ml  |

Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente.

**GOT (GLUTAMATO OXALACETATO TRANSAMINASA; E.C. 2.6.1.1)**

Wyatt, 1989.

**Pesar:**

|                       |       |
|-----------------------|-------|
| - Pyridoxal 5-fosfato | 4 mg  |
| - Fast Blue BB salt   | 150mg |

**Añadir:**

|                      |       |
|----------------------|-------|
| - 0.2M Tris-HCl pH 7 | 50 ml |
| - Sustrato GOT pH 7  | 5 ml  |

Incubar en la oscuridad a 37<sup>o</sup> C aproximadamente 30 minutos.

**G-6-PDH (GLUCOSA 6-FOSFATO DESHIDROGENASA; E.C. 1.1.1.49)**

Cheliak y Pitel, 1984.

**Pesar:**

|                                     |        |
|-------------------------------------|--------|
| - Glucosa 6-fosfato, sal monosódica | 100 mg |
|-------------------------------------|--------|

**Añadir:**

|                               |        |
|-------------------------------|--------|
| - 0.2M Tris-HCl pH 8          | 25 ml  |
| - MgCl <sub>2</sub> 1%        | 0.5 ml |
| - TPN (NADP <sup>+</sup> ) 1% | 0.5 ml |
| - MTT 1%                      | 0.5 ml |
| - PMS 1%                      | 0.5 ml |

Incubar en la oscuridad a 37<sup>o</sup> C aproximadamente 90 minutos.

**HEX (HEXOQUINASA; E.C. 2.7.1.1)**

Murphy, *et al* 1990.

**Pesar:**

|                |        |
|----------------|--------|
| - D(+)-Glucosa | 5 g    |
| - ATP          | 250 mg |
| - β-NAD (DPN)  | 10 mg  |
| - NBT          | 10 mg  |

**Añadir:**

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| - 0.2M Tris-HCl pH 8     | 50 ml  |
| - 0.1M MgCl <sub>2</sub> | 1 ml   |
| - G-6-PD                 | 80 u   |
| - PMS 1%                 | 0.5 ml |

Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente.

**I D H (ISOCITRATO DESHIDROGENASA; E.C. 1.1.1.42 )**

Soltis *et al.* 1983.

**Pesar por separado:**

|   |        |
|---|--------|
| 1) Acido DL-Isocitrónico, sal trisódica | 100 ml |
| 2) Agar                                 | 0.36 g |

**Añadir por separado:**

|                          |        |
|--------------------------|--------|
| 1) 0.2M Tris-HCl pH 8    | 25 ml  |
| - 0.1M MgCl <sub>2</sub> | 1 ml   |
| - TPN 1%                 | 1 ml   |
| - MTT 1%                 | 0.5 ml |
| - PMS 1%                 | 0.2 ml |
| 1) 0.2M Tris-HCl pH 8    | 25 ml  |

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

**LAP (LEUCINA AMINOPEPTIDASA; E.C. 3.4.11.1)**

Werth, 1985.

**Añadir:**

|  |       |
|--|-------|
| - 0.2M Tris-maleato pH 5.2             | 50 ml |
| - L-Leucina β-naftilamida-HCl al 2.5 % | 1 ml  |

Incubar en la oscuridad a 37<sup>o</sup> C durante 30 minutos. Posteriormente añadir el Fast Black Salt\*.

**\* Pesar:**

|                     |        |
|---------------------|--------|
| - Fast Black K salt | 100 mg |
|---------------------|--------|

Disolverlo muy bien en 5 ml de H<sub>2</sub>O destilada justo antes de teñir.

Incubar en la oscuridad a 37<sup>o</sup> C hasta que aparezcan las bandas (aproximadamente 15 minutos).

**MDH (MALATO DESHIDROGENASA; E.C. 1.1.1.37)**

Vallejos, 1983.

**Pesar:**

|                      |       |
|----------------------|-------|
| - $\beta$ -NAD (DPN) | 15 mg |
| - NBT                | 15 mg |
| - NaCN               | 50 mg |

**Añadir:**

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| - 0.2M Tris-HCl pH 8  | 100 ml |
| - 1M DL-Malato pH 7.8 | 10 ml  |
| - PMS 1%              | 0.2 ml |

Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente.

**ME (ENZIMA MALICA; E.C. 1.1.1.40)**

Soltis, 1983.

**Mezclar:**

|                      |        |
|----------------------|--------|
| - 0.2M Tris-HCl pH 8 | 90 ml  |
| - 1M DL-Malato pH 8  | 8 ml   |
| - 1M $MgCl_2$        | 2 ml   |
| - TPN 1%             | 1.5 ml |
| - MTT 1%             | 1.5 ml |
| - PMS 1%             | 0.5 ml |

Incubar en la oscuridad a 30°C.

**MNR (MENADION REDUCTASA; E.C. 1.6.99.2)**

Cheliak y Pital, 1984.

Cheliak y Pital, 1984.

**Pesar:**

|  |       |
|--|-------|
| - $\beta$ -NADH, forma reducida                          | 25 mg |
| - NBT (Nitro blue tetrazolium) (o bien 1ml de NBT al 1%) | 10 mg |
| - Menadione sodium bisulfite                             | 25 mg |

**Añadir:**

|                      |       |
|----------------------|-------|
| - 0.2M Tris-HCl pH 7 | 75 ml |
|----------------------|-------|

Incubar en la oscuridad a 37°C hasta que las bandas aparezcan.

**PG (PROTEINA GENERAL)**

Cheliak y Pital, 1984.

**Pesar:**

|                            |        |
|----------------------------|--------|
| - Naphtol blue black (NBB) | 0.01 g |
|----------------------------|--------|

**Preparar:**

|                    |       |
|--------------------|-------|
| - Acido acético    | 10 ml |
| - Metanol          | 40 ml |
| - $H_2O$ destilada | 40 ml |

Mezclar el NBB con la solución, agitar perfectamente, vaciar sobre el gel. Incubar 1h en la oscuridad a temperatura ambiente. Retirar la solución del gel sin lavar éste, agregar un nueva solución (sin NBB). Hacer dos cambios de 60 minutos. (Esta enzima fue considerada como RUB)

**6-PGD (6-FOSFOGLUCONATO DESHIDROGENASA; E.C. 1.1.1.44)**

Wyatt, 1989.

**Pesar:**

|  |        |
|--|--------|
| - Acido 6-fosfogluconico, sal de bario | 0.03 g |
|--|--------|

**Añadir:**

|                      |         |
|----------------------|---------|
| - 1M Tris-HCl pH 8.0 | 75 ml   |
| - 1M $MgCl_2$        | 1.5 ml  |
| - TPN 1%             | 0.75 ml |
| - MTT 1%             | 0.75 ml |
| - PMS 1%             | 0.2 ml  |

Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente.

**P G I (FOSFOGLUCOSA ISOMERASA; E.C. 5.3.1.9)**

Vallejos, 1983.

**Pesar:**

|   |       |
|---|-------|
| - D-Fructuosa 6-difosfato, sal disódica | 30 mg |
|---|-------|

**Añadir:**

|                        |        |
|------------------------|--------|
| - 0.1M Tris-HCl pH 7.5 | 80 ml  |
| - G6-PD (10u/ml)       | 4.5 ml |
| - 1M $MgCl_2$          | 2 ml   |
| - TPN 1%               | 1.5 ml |
| - MTT 1%               | 1.5 ml |
| - PMS 1%               | 1 ml   |

Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente.

**PGM (FOSFOGLUCOMUTASA; E.C. 2.7.5.1)**

Conkle *et al.* 1982.

**Pesar:**

|                                     |        |
|-------------------------------------|--------|
| - D-Glucosa 1-fosfato, sal disódica | 140 mg |
|-------------------------------------|--------|

**Añadir:**

|  |       |
|--|-------|
| - 0.05M Tris-HCl pH 8.0                | 75 ml |
| - D-Glucosa 1,6-difosfato (10mg/100ml) | 1 ml  |
| - $MgCl_2$ 1%                          | 5 ml  |

|                       |        |
|-----------------------|--------|
| - TPN ( $NADP^+$ ) 1% | 1 ml   |
| - NBT 1%              | 1 ml   |
| - PMS 1%              | 0.5 ml |
| - G-6-PD (10u/ml)     | 2 ml   |

Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

**S D H (SHIKIMATO DESHIDROGENASA;****E.C. 1.1.1.25)**

Werth, 1985.

**Pesar por separado:**

- |                        |        |
|------------------------|--------|
| 1) Acido (-) shikimico | 40 mg  |
| 2) Agar                | 360 mg |

**Añadir por separado:**

- |                               |        |
|-------------------------------|--------|
| 1) 0.2M Tris-HCl pH 8         | 15 ml  |
| - TPN 1%                      | 1 ml   |
| - MTT 1%                      | 1 ml   |
| - PMS 1%                      | 0.3 ml |
| 2) H <sub>2</sub> O destilada | 25 ml  |

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

Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente.

**SOD (SUPEROXIDO DISMUTASA;****E.C. 1.15.1.1)**Conkle *et al*, 1982.**Pesar:**

- |           |        |
|-----------|--------|
| - Glucosa | 0.75 g |
|-----------|--------|

**Añadir:**

- |                      |        |
|----------------------|--------|
| - 0.2M Tris-HCl pH 8 | 75 ml  |
| - DPN 1%             | 4.5 ml |
| - NBT 1%             | 1.5 ml |
| - PMS 1%             | 1.5 ml |

Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente.

**TPI (TRIOSA FOSFATO ISOMERASA;****E.C. 5.3.1.1.)**

Wendel y Weeden, 1989.

**Pesar:**

- |                    |         |
|--------------------|---------|
| - EDTA             | 0.01 g  |
| - Acido arsénico   | 0.15 g  |
| - Dihidróxiacetato | 0.0015g |

**Añadir:**

- |  |        |
|--|--------|
| - 0.1M Tris-HCl pH 8                                   | 6 ml   |
| - Gliceraldehído 3-fosfato<br>deshidrogenasa (500u/ml) | 75 u   |
| - MTT 1%   | 0.4 ml |
| - PMS 1%   | 1 ml   |
| - NAD <sup>+</sup> 1%                                  | 1 ml   |
| - Agar 1%  | 6 ml   |

Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente.