

1092E1



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTRUCTURA GENÉTICA DE TRES ESPECIES ENDÉMICAS DE *Caesalpinia* (Leguminosae: Caesalpinioideae) EN LA DEPRESIÓN DEL RÍO BALSAS Y VALLE DE TEHUACÁN-CUICATLÁN, MÉXICO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G A
P R E S E N T A :
JENY SOLANGE SOTUYO VÁZQUEZ

2111101



DIRECTOR DE TESIS: DR. ALBERTO KEN OYAMA NAKAGAWA

MÉXICO D., F.



ABRIL 1999

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENMA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: Estructura genética de tres especies endémicas de Caesalpinia (Leguminosae: Caesalpinioideae) en la Depresión del Río Balsas y Valle de Tehuacán-Cuicatlán, México. realizado por

Jeny Solange Sotuyo Vázquez
con número de cuenta 9 004628- 9 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa

Propietario

Biól. José Luis Regino Contreras Jiménez

Propietario

Biól. Antonio González Rodríguez

Suplente

M en C. Pedro Mercado Ruaro

Suplente

M en C. Jaime Jiménez Ramírez

[Handwritten signatures and stamps]
FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología
[Handwritten signature]
Dra. Edna María Suárez Díaz



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

¿Qué otra cosa vislumbra en la oscura
lejanía, allá en el abismo del tiempo?

SHAKESPEARE
La Tempestad

La naturaleza mi querido señor, es sólo una
hipótesis.

RAOUL DUFY

AGRADECIMIENTOS

En primer término quisiera agradecer al siempre amable Dr. Ken Oyama, quien fungió como director de este trabajo, por las facilidades, indicaciones y consejos aún en mis deserciones repentinas. Al biólogo José Luis Contreras por haber confiado en mí para la realización de este proyecto y porque es uno de los responsables de que me decidiera a estudiar plantitas.

Para Antonio González Rodríguez, Jaime Jiménez y Pedro Mercado por aceptar ser mis sinodales y por sus acertados comentarios al manuscrito.

A Rosaura Luna (mi hermana) por enseñarme la técnica de electroforesis enzimáticas, por la paciencia, la ayuda con el montaje de la técnica para mis plantas y los buenos momentos que he pasado en su compañía.

A Nidia Perez-Nasser, por ayudarme con la lectura de los zimogramas, los consejos y los buenos y malos momentos que pasamos juntas con el montaje del laboratorio de Ecología Genética y Molecular en Morelia.

Para los kenecitos: Adriana, Alejandra, Antonio, Eneida, Euler, Lola, Pablo, Paty, Pauline, Rafael, Sergio, Sofía, Toño y Víctor por los buenos ratos que me hicieron pasar.

A Josefina Herrera, del laboratorio de Química de la Facultad de Ciencias, por permitirme ir de agregado cultural a su recolecta y aceptar que de paso recolectara *C. hintonii*.

Al Dr. Alfonso Valiente-Banuet, por desviar su salida al campo y prestarme a sus alumnos para recolectar *Caesalpinia melanadenia*.

A mis amigos del alma: Benjamin, Dalia, Ere, Fer, Flor, Georgina, Hugo (Clark Kent), Itzel, María Ventura, Mariana y Monse; por los chismes, porras, amores y desamores compartidos por correo electrónico; por su amistad incondicional y porque estuvieron en los momentos más difíciles durante la elaboración ésta tesis.

A mi sobrinas Eunice y Loida por los buenos momentos que hemos pasado juntas, por su apoyo en la elaboración de imágenes para la tesis, por la confianza que siempre han depositado en mí. A Elizabeth (mi enana) y Mariana por hacerme la más feliz de las tías.

A mis hermanos Arturo, Benjamin, Gonzalo, Hans, Hugo, Jaime, Paul y Shamir por haber contribuido de manera importante durante mi formación (o deformación) profesional, por los buenos momentos y los consejos.

A mi madre y mi padre por los consejos; por enseñarme a conseguir lo que me propongo a pesar de los momentos difíciles.

A Adrián Reuter, Fany, Leo y Octavio por enseñarme a amar las aves y aunque no voy a dedicarme a ellas serán siempre mi pasatiempo preferido.

CONTENIDO

Agradecimientos

Resumen

Introducción.

- Genética de poblaciones 1
- Variación genética 2
- Marcadores isoenzimáticos en sistemática..... 5
- Conservación y endemismo..... 7
- Antecedentes..... 8
- Planteamiento del problema y justificación..... 12

Objetivos..... 14

Área de Estudio.

- Valle de Tehuacán- Cuicatlán 15
- Depresión del Río Balsas 17

Descripciones morfológicas.

- *Caesalpinia hintonii* (Cuenca media)..... 22
- *Caesalpinia hintonii* (Cuenca alta)..... 23
- *Caesalpinia macvaughii* 25
- *Caesalpinia melanadenia* 27

Materiales y Métodos 28

Resultados 39

Discusión 50

Conclusiones 63

Referencias 64

Apéndices

- Recetas de preparación de sistemas de amortiguación y geles..... 85
- Buffer de extracción 86
- Recetas de tinción de enzimas para *Caesalpinia*..... 87
- Georeferencias de las especies..... 98
- Frecuencias alélicas 100
- Patrones de bandedo de las enzimas ensayadas..... 101

RESUMEN

Se analizó la variación y estructura genética de tres especies endémicas de *Caesalpinia*, de amplia distribución (*C. hintonii*) y de distribución restringida (*C. macvaughii* y *C. melanadenia*), con el fin de estimar sus niveles de diversidad y estructura genética, así como analizar las relaciones genéticas entre poblaciones y especies. Se empleó el método de electroforesis enzimática en geles de almidón. La variación y estructura genética de *C. hintonii* se estudió con base en 19 loci (16 polimórficos) para 150 individuos en cinco poblaciones. Para el caso de *C. macvaughii* y *C. melanadenia* los análisis se hicieron con 12 (6 polimórficos) y 15 (10 polimórficos) loci respectivamente para 30 individuos en cada especie. La heterocigosidad promedio (H) por población para *C. hintonii* fue de 0.249. Para el caso de *C. macvaughii* y *C. melanadenia* los valores de heterocigosis fueron de 0.260 y 0.268 respectivamente. El mayor porcentaje de polimorfismo (P) lo presentó *C. hintonii* (58.96%) y el menor *C. macvaughii* (50%). Las dos especies de distribución restringida presentan mayor diversidad genética que el promedio encontrado para especies endémicas. El estadístico Fis revela indicios de endogamia en las poblaciones de *C. hintonii*, Fst (0.207) muestra que existe estructuración y el $N_e m$ promedio (0.612) indica que existe escaso flujo génico; las poblaciones se comportan como unidades evolutivas independientes. El dendograma de distancias genéticas de Nei para *C. hintonii* no concordó con la agrupación de poblaciones propuesta en la literatura con caracteres morfológicos; el patrón de diferenciación se correlaciona con la distribución geográfica. El dendograma para todas las poblaciones y especies muestra que *C. macvaughii* es la especie más relacionada con *C. hintonii*, esta especie forma dos grupos diferenciados genéticamente aunque el patrón de diferenciación no se correlaciona con su distribución geográfica. La distribución de la variación genética entre las poblaciones de *C. hintonii* no presenta un patrón de aislamiento por distancia; la diferenciación observada podría explicarse por el aislamiento geográfico. Los tamaños poblacionales bajos en las poblaciones de *C. hintonii* y el aislamiento geográfico, sobre todo de la población El Infiernillo, hacen suponer que la deriva génica es probablemente la principal fuerza evolutiva que está moldeando la estructura genética encontrada.

INTRODUCCIÓN

Genética de poblaciones.

El análisis genético de las poblaciones naturales de plantas así como el conocimiento de las causas que determinan la variación genética de éstas ha sido centro de atención de genetistas y evolucionistas durante las últimas tres décadas (Bradshaw, 1984; Nevo *et al.*, 1986; Hamrick y Godt, 1989).

Los niveles y patrones de variación genética tienen un papel importante para determinar el potencial evolutivo de una especie. Dichos patrones están determinados por los efectos de cinco procesos evolutivos fundamentales: 1) mutación, 2) migración, 3) selección, 4) deriva génica y 5) sistemas de apareamiento. De acuerdo con lo anterior, se ha determinado que para entender la biología evolutiva de una especie, se debe tener conocimiento de la variación genética de ésta (Lewontin, 1974; Endler, 1977; Hamrick y Godt, 1989).

Un método empleado para la evaluación de la variabilidad genética de las poblaciones naturales lo constituye el análisis de la variación enzimática (Chesser, 1983; Soltis y Soltis, 1991; Hoey y Parks, 1991; Hillis *et al.*, 1996). Con la técnica de electroforesis se estiman las frecuencias alélicas para cada locus y población; a partir de éstas se calculan una serie de parámetros como el número de loci polimórficos, así como la heterocigosis, que se refiere a la proporción de genotipos diploides compuestos por alelos distintos (Lewontin, 1974; Hedrick, 1983; Hartl y Clark, 1989; Hamrick y Godt, 1989);

dichos parámetros permiten evaluar la cantidad de variación genética dentro y entre poblaciones. A esto último se le denomina estructura genética (Loveless y Hamrick, 1984).

La estructura genética es un rasgo combinado que incluye no sólo el arreglo espacial de los alelos y genotipos en un momento particular sino también los procesos determinísticos de multiplicación y flujo génico que alteran su arreglo espacial, durante cada periodo reproductivo (Loveless y Hamrick, 1984). Existen factores que determinan de manera importante la estructura genética de las poblaciones como los sistemas reproductivos, la morfología floral, los mecanismos de polinización, el tiempo de generación, la distribución geográfica y la dispersión de semillas (Hamrick *et al.*, 1979; Loveless y Hamrick, 1984; Karron, 1987; Hamrick y Godt, 1986b).

Variación genética.

El primer paso para el entendimiento de la estructura genética de una población consiste en describir la cantidad de variabilidad genética presente. La variación genética, describe los niveles de cambio de las frecuencias alélicas y genotípicas en las poblaciones.

Los promedios encontrados en los niveles y patrones de variación aloenzimática y la gran variedad de características de las especies, incluyendo, estatus taxonómico, distribución, forma de vida, modo de reproducción, sistemas de apareamiento, dispersión de semillas y estatus sucesional nos permite hacer predicciones sobre la variación genética de las especies.

La revisión de Hamrick *et al.* (1979) así como la de Loveless y Hamrick (1984) muestran que las especies que se autofecundan poseen niveles de variación genética menores a los de especies que predominantemente se entrecruzan. Con respecto al

mecanismo de dispersión de semillas, se encontró una mayor heterocigosis promedio (H) en las especies cuyas semillas son ingeridas y dispersadas por animales, que en aquellas diseminadas por gravedad (Loveless y Hamrick, 1984, 1987).

Las especies de plantas leñosas mantienen mayor variación genética dentro de sus poblaciones que las especies herbáceas (Hamrick *et al.*, 1979); las especies polinizadas por el viento presentan un índice de polimorfismo mayor que las polinizadas por animales (Hamrick y Godt, 1989). Las especies arbóreas son las que exhiben los más altos niveles de variación con respecto a otros grupos (Hedrick, 1983; Ledig y Conkle, 1983).

Los niveles de variación a nivel isoenzimático se pueden correlacionar con patrones de distribución geográfica, agrupando a las especies en cuatro tipos: 1) especies con distribución continua, 2) especies con distribución discontinua, 3) especies con distribución discontinua pero en áreas pequeñas y 4) especies con distribución restringida (Muller *et al.*, 1992).

Los dos últimos agrupamientos de especies caen dentro de lo que Rabinowitz *et al.* (1986) denominan especies raras. La rareza es un término relativo, en ocasiones es utilizado como sinónimo de endémico, el endemismo es un tipo de rareza y las especies raras son más susceptibles a la extinción que las comunes.

Los estudios comparativos sobre la distribución geográfica de las plantas muestran que las especies con distribución geográfica restringida (especies endémicas o raras) por lo general presentan bajos niveles de diversidad genética con relación a las especies ampliamente distribuidas (Ledig y Conkle, 1983; Karron, 1987, 1997; Van Treuren *et al.*, 1991; Spencer *et al.*, 1991; Bawa y Ashton, 1991). Sin embargo, no es posible saber si la especificidad en el hábitat es una causa o consecuencia de los bajos niveles de diversidad

genética, aunque, la especificidad de éste puede ser independiente de la amplitud geográfica.

Una excepción a los bajos niveles de variación genética hallados en especies endémicas sería *Pinus rzedowskii*, donde se encontraron altos niveles de variación, probablemente debida a las condiciones ecológicas del lugar, la historia de vida (especie longeva de crecimiento tardío) y al comportamiento reproductivo (Delgado, 1990).

Las causas que determinan el endemismo y la rareza en especies de plantas vasculares pueden ser diferentes y deberse a diversos factores ecológicos, de dinámica poblacional, genética del taxón, historia evolutiva, historia taxonómica y perturbaciones humanas (Fiedler, 1986; Fiedler y Ahouse, 1996).

Desde una perspectiva genética, la rareza puede ser producida por el efecto fundador, deriva génica (Karron, 1987, 1997), tamaños poblacionales pequeños (Hedrick, 1983; Hartl y Clark, 1989), eventos de cuello de botella o por ser especies nuevas (Foster, 1991). Todos los factores se encuentran íntimamente relacionados.

El efecto fundador se define como el establecimiento de nuevas poblaciones por algunos individuos que llevan sólo una fracción del total de la variación genética de los parentales. A la reducción en el número de individuos de una especie en un momento y lugar determinado se le denomina cuello de botella. Cuando la disminución en el número va acompañada con una disminución significativa de variación genética se emplea el término cuello de botella genético (Fiedler, 1986).

La disminución en la variación genética puede atribuirse a la ausencia o reducción del número de alelos raros en el grupo fundador y a un cuello de botella posterior a la colonización (Ellstrand y Elam, 1993). La pérdida de alelos es mucho más grande que la

disminución de heterocigosidad y la variación genética *per se*. Si el tamaño poblacional se incrementa rápidamente la reducción promedio de heterocigosidad es mínima aunque el número de fundadores sea pequeño (Cox, 1997). En contraste, la pérdida en el promedio del número de alelos por locus es fundamentalmente afectado por el tamaño del cuello de botella. La diferencia ocurre porque la deriva génica elimina algunos de los alelos con frecuencia baja (Fiedler y Ahouse, 1996).

Aunque las especies endémicas presentan una disminución de loci polimórficos y diversidad genética con respecto a los de más amplia distribución, es interesante notar que la diferenciación entre poblaciones (F_{st} / G_{st}) en las especies endémicas es similar al de especies con amplia distribución (Hamrick y Godt, 1990).

En conclusión, las especies con distribuciones geográficas restringidas, bajas densidades poblacionales y que crecen aisladas son más propensas a experimentar los efectos de la deriva y presentar altos niveles de divergencia poblacional, en comparación con aquellas especies con poblaciones grandes, ampliamente distribuidas y que se encuentran menos aisladas (Hamrick *et al.*, 1979; Godt y Hamrick, 1993; Karron, 1997).

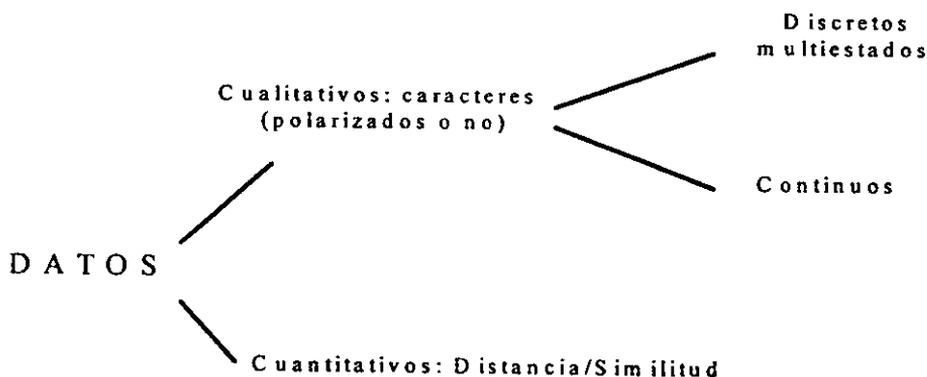
No obstante, este patrón de estructura genética puede modificarse dependiendo de los niveles de flujo génico que ocurran entre las poblaciones y el sistema de cruzamiento predominante de la población.

Marcadores isoenzimáticos en sistemática.

Los sistemáticos se han concentrado en resolver problemas de especiación, variación geográfica y filogenias (Hillis y Moritz, 1996).

Se ha presentado un debate sobre la validez de los caracteres moleculares y morfológicos como principios de información para reconstruir filogenias (Patterson *et al.*, 1993). Algunos critican que los caracteres moleculares son relativamente débiles (*e.g.* Kluge, 1983), mientras que otros aducen que varios de los caracteres morfológicos empleados son no informativos (*e.g.* Frelin y Vuilleumier, 1979; Sibley y Ahlquist, 1987).

El establecer las relaciones filogenéticas para un grupo de especies, implica elaborar una hipótesis evolutiva en base a los caracteres que comportan a los diferentes taxa. Para elaborar una filogenia, la información con la que se debe contar puede ser morfológica, ADN (hibridización, análisis de fragmentos de restricción y secuenciación) o de proteínas (inmunológicos y aloenzimáticos). En general, pueden agruparse dentro del siguiente esquema (Swofford y Olsen, 1990):



La electroforesis de aloenzimas ha sido una herramienta útil en la sistemática (Gottlieb, 1973, 1974; Buth, 1984a y b; Wendel y Weeden, 1989). La aplicación ha generado controversias, pues no detecta todos los polimorfismos bioquímicos que existen en los organismos, debido a que el 90% del genoma es ADN que no codifica; hay diferencias en los nucleótidos que no se transcriben (intrones, secuencias flanqueantes), ni

se traducen (extremidades no codificantes de ARNm) y además, porque las terceras bases de los codones rara vez son informativas debido a la redundancia del código genético (Nevo, 1978; Hartl y Clark, 1989).

Bush y Kito (1978, citado en Buth, 1984 a y b) así como Lewontin (1985) concluyen que es sumamente confiable para estimar la variación de aminoácidos en poblaciones naturales, para comparar razas, especies o géneros estrechamente relacionados y en algunos casos permite plantear hipótesis acerca de la evolución de especies intragenéricas. No existe una relación clara entre las similitudes genéticas y los tiempos de divergencia desde el ancestro común. Sin embargo, la divergencia promedio entre loci si puede reflejar una relación funcional con el tiempo o el número de generaciones particularmente cuando largos periodos de tiempo están involucrados (Awise, 1974; Crawford, 1990).

Si contamos con información de proteínas, podemos seguir dos procedimientos: a) elaborar una matriz de distancias genéticas ya sea como medida de identidad genética (Nei, 1978) o de similitud (Rogers, 1972) y b) construir una matriz de presencia ausencia de alelos (Swofford y Olsen, 1990).

Conservación y endemismo.

México posee más de 300 géneros de plantas vasculares endémicas (Rzedowski, 1993). Dentro de las leguminosas, Sousa y Delgado (1993) reportan tres tribus con 88 géneros como endémicos (896 especies endémicas); el género *Caesalpinia* posee menos de 31 especies bajo ese estatus, las cuales mayoritariamente se distribuyen en la costa del Pacífico y en la Depresión del Río Balsas.

Conocer los niveles de variación genética en especies representadas por poblaciones reducidas y/o fragmentadas es de suma importancia. Por un lado, la información es útil para comparar la relación entre la distribución de la especie y su variación genética y por otro, los estudios aloenzimáticos nos proveen de datos para establecer estrategias de conservación, preservación y manejo de los recursos génicos (Hopper y Coates, 1989; Hamrick y Godt, 1990; Eguiarte y Piñero, 1990; Eguiarte, 1990; Barrett y Kohn, 1991; Spencer *et al.*, 1991; Wyatt, 1992).

Los análisis de la variación enzimática en las poblaciones naturales son necesarios para la conservación y para cotejar con las evidencias encontradas que predicen una baja diversidad genética en las especies con distribución geográfica restringida o endémica (van Treuren *et al.*, 1991). Al poseer un mayor número de registros sobre la variación y estructura genética de las especies endémicas se pueden hacer predicciones más realistas de la variación genética.

Antecedentes.

Dentro de las plantas, las leguminosas son de las que mayor importancia económica poseen, de ellas se extraen un gran número de compuestos empleados en la industria como tintes, gomas, resinas, madera, etcétera, también son empleadas como forraje y alimento para el hombre; pero sin duda una de las características más importantes es su capacidad de establecer simbiosis con bacterias (*e.g. Rhizobium*) y fijar nitrógeno atmosférico. Se sabe que un cultivo de leguminosas puede fijar 500 kg/ha/año de nitrógeno (NAS, 1977).

La familia Leguminosae es una de las tres más diversas dentro de las Magnoliophyta, contiene aproximadamente 650 géneros y 18 000 especies (Polhill *et al.*,

1981), agrupadas en tres subfamilias: Caesalpinioideae, con 150 géneros y 2800 especies (cinco tribus), Mimosoideae, con 60 géneros y 4200 especies (cuatro tribus) y Papilionoideae, con 440 géneros y 12 000 especies aproximadamente (\approx 47 tribus); cada una con caracteres florales definidos y con géneros que se consideran de transición entre ellas (Contreras, 1991).

La taxonomía en las leguminosas se ha visto modificada continuamente (Tucker y Douglas, 1994), debido a la gran diversidad del grupo y a la gran variabilidad de estructuras (*e.g.* florales y vegetativas). Además, de que los estudios actuales se basan en caracteres morfológicos, los que al parecer son insuficientes para dilucidar las relaciones taxonómicas del grupo; por lo tanto se requiere de herramientas adicionales, diferentes a las morfológicas, para establecer con mayor precisión las relaciones filogenéticas de las especies.

Estudios recientes sobre el desarrollo floral (Kantz y Tucker, 1994), ontogenia (Tucker y Douglas, 1994), quimiotaxonomía (Kite y Lewis, 1994; Contreras *et al.* 1995) y marcadores moleculares (Doyle, 1995; Liston, 1995; Simpson y Miao, 1997) han generado hipótesis sobre la radiación adaptativa del grupo y géneros relacionados.

La subfamilia Caesalpinioideae es considerada el grupo basal del que derivan las otras dos subfamilias; sus especies están agrupadas en cinco tribus: Caesalpinieae, Cassieae, Cercideae, Detarieae y Amherstieae (Cowan, 1981). Muchos de los géneros son monotípicos o contienen pocas especies y están restringidos principalmente a regiones tropicales de Africa, Asia y Sudamérica.

La tribu Caesalpinieae, es considerada como la base de toda la subfamilia constituida por 47 géneros, divididos en ocho grupos fenéticos (Polhill y Vidal, 1981), sin

asignación taxonómica determinada, que indican distintas direcciones de divergencia a partir de lo que parece ser la organización floral más simple (Contreras, 1991).

El grupo fenético *Caesalpinia sensu* Polhill y Vidal (1981), en el que se ubica el género *Caesalpinia*, contiene 16 géneros distinguibles por el sépalo abaxial modificado y por presentar estructuras de defensa (aguijones, glándulas y tricomas glandulares) en hojas, tallos y frutos. Los miembros del grupo son árboles o arbustos predominantemente de selvas secas y desiertos de trópicos y subtropicos del viejo y nuevo mundo (Kantz y Tucker, 1994).

Caesalpinia sensu lato contiene aproximadamente 150 especies (menos de 45 en México), siendo el género más grande dentro del grupo. Las Caesalpinieae son aparentemente una mezcla de relictos y complejos de especiación reciente; algunos de los grupos de leguminosas superiores son transiciones de Caesalpinieae (Lewis y Schrire, 1995; Lewis, 1998).

Las flores de *Caesalpinia* y de géneros relacionados presentan una gran diversidad de formas en sus estructuras y se deben considerar entre las más especializadas de la subfamilia, en algunos casos son más especializadas que algunas Mimosoideae (Contreras, 1991). Se reporta que las flores son típicamente melitófilas, visitadas por abejas de los géneros *Centris* y *Xylocopa* (Lewis, 1994). Para el caso de *C. hintonii* se han observado colibríes visitando activamente sus flores (Lewis, 1994, 1998; J. L. Contreras, com. pers.).

La gran variación morfológica que presentan las estructuras florales, frutos y partes vegetativas de las especies de *Caesalpinia*, han propiciado que las relaciones entre éstas aún sean confusas; algunos autores las consideran como un solo género en tanto que otros lo

han segregado en varios géneros. Se sugiere que el género es polifilético y que pueden reconocerse grupos distintivos dentro de este (Polhill y Vidal, 1981; Lewis y Schrire 1995).

Hasta la fecha no existen estudios con marcadores isoenzimáticos para las especies del género *Caesalpinia*; la mayor parte de los trabajos realizados se centran en la descripción morfológica (Contreras, 1991), desarrollo floral (Tucker *et al.*, 1985), síndrome floral (Cocucci *et al.*, 1992), en el número cromosómico y cariotipo de las especies (Zhao, 1996; M. Ibarra-González en prep.), aminoácidos no protéicos (Nageshwar *et al.*, 1984; Kite y Lewis, 1994; Contreras *et al.*, 1995) y sistemática (Lewis, 1994; 1998).

Todos los trabajos, exceptuando los de número cromosómico y cariotipo, han pretendido dilucidar las relaciones filogenéticas del grupo *Caesalpinia sensu lato* y géneros relacionados como *Brassilettia*, *Hoffmannseggia* y *Haematoxylum*. Las afinidades químicas encontradas por Kite y Lewis (1994) así como los estudios moleculares (Simpson y Miao, 1997) apoyan la idea de redefinir el grupo *Caesalpinia sensu lato*.

Por otro lado, Kite y Lewis (1994) realizaron un análisis cladístico de aminoácidos no protéicos en *Caesalpinia s.l.* encontrando correlaciones con los grupos macromorfológicos de las especies apoyando también la idea de redefinición del género. Algunos de los grupos informales poseen afinidades químicas estrechas con otros géneros como *Brasilettia*. En el mismo análisis, se encontró divergencia entre las especies de México y Centroamérica dentro del grupo *Poicianaella* basada en la presencia de ácido 4-metilglutámico; las diferencias químicas observadas en los segregados geográficos tal vez tengan importancia ecológica y/o taxonómica.

Kantz y Tucker (1994) encontraron que *Caesalpinia* es grupo hermano de *Haematoxylum* y *Hoffmannseggia*. La especie *Haematoxylum brasiletto* y el grupo

infragenerico Poincianella de *Caesalpinia s. l.* son afines segun los estudios morfologicos, de quimica de semillas y ontogenia floral. Los mismos autores sugieren afinidades estrechas entre los taxa, pero los analisis filogeneticos no apoyan dicha hipotesis. Ha resultado dificil caracterizar en terminos de sinapomorfias a los taxa basales de la tribu Caesalpiniae-Haematoxylon, ya que la tribu incluye taxa con estructuras florales no especializadas.

Lewis y Schrire (1995) encontraron que el grupo de *Caesalpinia* es polifiletico, aunque reconocen que las relaciones que proponen entre los taxa son altamente especulativas por no involucrar a todas las especies.

Respecto a los estudios cromosomicos se ha postulado que el numero cromosomico basico en *Caesalpinia sensu lato* es de $x=12$ (Goldblatt, 1981; Lewis, 1994). Guerra (citado en Lewis, 1994) reporta poliploidia en *Caesalpinia ferrea* (grupo Libidibia) con $2n= 24, 48$ y *C. bracteosa* (grupo Poincianella) con $2n= 48$.

Planteamiento del problema y justificacion.

En ciertas especies del genero *Caesalpinia* (e.g., *C. exostemma*, *C. epifanioi*, *C. velutina*) se ha observado gran variabilidad morfologica en las estructuras florales y vegetativas (Contreras, 1991; Kantz y Tucker, 1994).

En *C. hintonii*, Contreras (1991) encontro tres variantes morfologicas, a lo largo de la Depresion del Rio Balsas. La primera corresponde a la porcion oriental de la depresion, que incluye a las poblaciones que se localizan entre Acatlan de Osorio, Puebla y Valerio Trujano, Guerrero; la segunda forma corresponde a la porcion media en donde se ubica la

localidad tipo de esta especie; la última se localiza en la porción occidental en los alrededores de Infiernillo entre los estados de Guerrero y Michoacán.

Las tres variedades no pueden considerarse como especies distintas aunque se encuentren aisladas geográficamente, por lo que son necesarios más estudios para decidir si las variaciones tienen una base genética, se deben a plasticidad fenotípica (Contreras, 1991; J.L. Contreras en prep.) o a una combinación de ambas.

Por otro lado, considerando que una población grande no es panmíctica sobre toda su área de distribución es de esperarse que la población total de *C. hintonii* se encuentre estructurada genéticamente debido a la dispersión limitada de la progenie. De esta manera, se pueden esperar ciertos niveles de variación y divergencia entre las poblaciones en virtud del aislamiento geográfico.

La mayoría de los intentos por caracterizar la variación genética en las poblaciones naturales se han realizado a una escala local, o en poblaciones que se encuentran muy cercanas entre sí (Sytsma y Schaal, 1985; Hamrick y Loveless, 1986a; Hamrick y Godt, 1989). El hecho de incrementar la amplitud de la escala geográfica permite de alguna manera analizar la relación existente entre los caracteres genéticos observados y los parámetros ambientales (Chase *et al.*, 1995).

Las tres especies de *Caesalpinia* ofrecen una excelente oportunidad para evaluar la variación genética y la distribución geográfica. *C. hintonii* presenta una distribución geográfica amplia; *C. melanadenia* sólo se encuentra en las partes bajas de la Cuenca del Valle de Tehuacán-Cuicatlán y a *C. macvaughii* únicamente se le encuentra en la región de Infiernillo, Michoacán.

En cuanto al tipo de hábitat, las especies tropicales de selvas secas han sido menos estudiadas que las de trópicos húmedos y son escasos los estudios enfocados a evaluar cómo el conocimiento de la variación genética encontrada en poblaciones naturales puede ser utilizado en la conservación (Oyama, 1993).

Finalmente, para la biología de la conservación el estudio y análisis de las especies raras o endémicas como *Caesalpinia hintonii*, *C. melanadenia* y *C. macvaughii* es fundamental por ser éstas las más vulnerables y con mayor riesgo (potencial) a desaparecer.

Objetivos:

- Analizar y comparar la variación genética de tres especies endémicas de *Caesalpinia* (*C. hintonii*, *C. macvaughii* y *C. melanadenia*) relacionándola con su distribución geográfica.
- Describir la estructura genética de *Caesalpinia hintonii* y evaluar si la distancia genética de las poblaciones se ajusta al modelo de aislamiento por distancia.
- Analizar las relaciones genéticas entre poblaciones y especies de *Caesalpinia*.

En cuanto al tipo de hábitat, las especies tropicales de selvas secas han sido menos estudiadas que las de trópicos húmedos y son escasos los estudios enfocados a evaluar cómo el conocimiento de la variación genética encontrada en poblaciones naturales puede ser utilizado en la conservación (Oyama, 1993).

Finalmente, para la biología de la conservación el estudio y análisis de las especies raras o endémicas como *Caesalpinia hintonii*, *C. melanadenia* y *C. macvaughii* es fundamental por ser éstas las más vulnerables y con mayor riesgo (potencial) a desaparecer.

Objetivos:

- Analizar y comparar la variación genética de tres especies endémicas de *Caesalpinia* (*C. hintonii*, *C. macvaughii* y *C. melanadenia*) relacionándola con su distribución geográfica.
- Describir la estructura genética de *Caesalpinia hintonii* y evaluar si la distancia genética de las poblaciones se ajusta al modelo de aislamiento por distancia.
- Analizar las relaciones genéticas entre poblaciones y especies de *Caesalpinia*.

ÁREA DE ESTUDIO

La selva baja caducifolia cubre el 2% del territorio del país (Ramírez, 1994), posee alrededor de 6000 especies de fanerógamas, de las que el 40% son endémicas a México (Rzedowski, 1992 a y b). El mismo autor considera que la mayor proporción de endemismos se concentran en la Cuenca del Río Balsas, Península de Yucatán y noroeste de México.

Para el caso de las Caesalpinioideas la mayor concentración de especies se da en la costa del Pacífico y en la Depresión del Río Balsas, siendo ésta la que posee una mayor heterogeneidad ambiental (Toledo, 1982), lo que genera alta diversidad de especies, razas y variantes clinales. Debido a la conexión que mantuvieron en el pasado la Cuenca del Balsas y el Valle de Tehuacán-Cuicatlán un gran número de especies de ambas zonas se encuentran estrechamente relacionadas (Contreras com. pers.).

Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

Fisiografía y geología.

El valle se localiza entre los estados de Puebla y Oaxaca, mide 10, 000 Km². La historia geológica comprende cuatro fases: 1) la formación del complejo basal que data del Paleozoico-Mesozoico, 2) Una inmersión de la cuenca a principios del Cretácico Inferior, la cual formó el portal del Balsas y el aislamiento del Valle de Tehuacán respecto del Golfo de

México con una depositación de sedimentos marinos ricos en material salino, 3) Una serie de movimientos orogénicos aislan la cuenca y por tanto, el Valle de Tehuacán-Cuicatlán pierde conexión con la Depresión del Río Balsas dando origen a un lago endorréico que data del Cretácico Inferior a finales del Terciario, 4) la captación por parte del Río Santo Domingo, afluente del Papaloapan, del Río Salado y sus tributarios por erosión remontante (Berinstain, *et al.*, 1996). Estos procesos formaron cerros de cimas planas con rocas calizas como roca madre, zonas de ladera con lutitas, zonas de depositación aluvial a lo largo del Río Salado, así como áreas de material ígneo (Toledo, 1982; Ferrusquía-Villafranca, 1996).

Clima.

Cálido, temperatura media anual de 21°C presentando canícula bien definida a mitad del periodo de lluvias, precipitación media anual de 400- 450 mm (Valiente, 1991).

Vegetación.

La zona ha sido estudiada desde hace 60 años desde el punto de vista florístico y fitogeográfico (Villaseñor *et al.*, 1990; García, 1991; Dávila *et al.*, 1993). El número de especies encontradas oscila alrededor de las 2 800 (1% de la flora a nivel mundial); existe un elevado grado de endemismo (Toledo, 1982; Dávila, *et al.*, 1993) y tiene una gran afinidad florística con el Desierto Sonorense, lo cual indica que hubo una conexión tiempo atrás.

En la región pueden distinguirse los siguientes tipos de vegetación: matorral espinoso, tetchera de *Neobuxbaumia tetetzo*, selva baja espinosa perenifolia, tetchera

cardonal, cardonal de *Stenocereus stellatus*, cardonal de *Cephalocereus columna-trajani* y selva baja caducifolia (Berinstain *et al.*, 1996).

En el matorral espinoso *Neobuxbaumia tetetzo* es la especie dominante y en menor proporción se encuentran *Mimosa luisana*, *Cordia curassavica*, *Caesalpinia melanadenia*, *Bursera aloexylon*, *Fouquieria formosa* e *Ipomea arborescens*; también se encuentran suculentas y rosetófilas como *Mammillaria carnea*, *Opuntia fillifera*, *Coryphantha pallida* y *Ferocactus flaviovirens* (Berinstain *et al.*, 1996).

Depresión del Río Balsas.

Ubicación.

La cuenca está comprendida entre los meridianos 97°30' y 103°15' de longitud oeste y los paralelos 17° y 20° latitud norte; la limitan al norte el Eje Neovolcánico desde los límites de Michoacán y Jalisco hasta el cerro de la Malinche, al este la Sierra Madre de Oaxaca; al sur y al oeste se encuentra la Sierra Madre del Sur.

Fisiografía, Hidrología y Geomorfología.

La Depresión de Río Balsas mide 105 900 Km² se encuentra en la parte central de la República; el Río Balsas tiene un curso de 840 Km, con un escurrimiento medio anual de 15 mil millones de metros cúbicos. Lo forman tres corrientes principales: el Atoyac que nace en la Sierra Nevada, en los estados de Puebla y Zahuapan; el Mixteco, que nace en

Oaxaca, y el Tlapaneco, que se origina en las montañas limítrofes de esta entidad con Guerrero. El Mixteco y el Atoyac se unen en las proximidades del poblado de San Juan del Río Oaxaca; y más adelante, por la margen izquierda, confluye el Tlapaneco. Hasta la población del Balsas el río lleva el nombre de Mezcala. Desemboca en las Bocas de Zacatula y marca el límite entre los estados de Michoacán y Guerrero. Sus principales afluentes, por la margen derecha, son los ríos Nexapa Amacuzac, Cutzmala, de la montaña o Poliutla, Tacámbaro y Tepalcatepec; y por la izquierda, los de Ajuchitlán y el Oro.

La hidrografía pertenece a la vertiente del Océano Pacífico, en ella se reconoce una cuenca interior denominada del Balsas cuyo eje de avenamiento es el río del mismo nombre. En la cuenca ocurre una precipitación media anual de 978 mm; 1050 mm en las partes altas y 810 mm en la central. Las mayores precipitaciones (2317 mm) se han registrado en Tetela del Volcán.

La Depresión del Río Balsas se encuentra dividida en la Depresión Oriental y Occidental por un estrechamiento ocasionado por la Sierra de Taxco-Teloloapan. Es un gran sinclornio que comenzó a levantarse en el periodo Mesozoico (Cretácico) y se plegó posteriormente para formar la depresión (durante el Terciario y Cuaternario) en el periodo Cenozoico.

Por algún tiempo esta depresión se formó como una meseta de rellenamiento cerrado, debido a los movimientos tectónicos y por la presencia de numerosas fallas por donde salieron corrientes de lava que la cubrieron parcialmente. La meseta contenía una serie de lagos internos, pero los movimientos orogénicos que afectaron la Sierra Madre del Sur originaron fracturamientos en la cuenca, convirtiéndose en una meseta de denudación.

El relieve está caracterizado por un sistema montañoso, con altitudes desde los 900 a los 1800 msnm, de pendientes abruptas (entre 20° y 40°) y numerosas cañadas (López, 1984).

Geología.

Se divide en dos cuencas sedimentarias separadas por una lengüeta de esquistos pertenecientes al complejo basal, que se desprende del macizo de la Sierra Madre del Sur, atravesando la parte oriental del estado de Guerrero extendiéndose hasta el estado de Puebla. Fisiográficamente se distinguen las formas de origen volcánico; en adición a las rocas y cuerpos estrictamente volcánicos se encuentran algunas rocas de tipo sedimentario (*e.g.* arenisca, conglomerado) del Terciario y Cuaternario con algunos restos fósiles (Ferrusquía-Villafranca, 1996).

En el estado de Michoacán se encuentran esquistos, gneiss y calizas del Paleozoico-Mesozoico, en el estado de Guerrero se encuentran esquistos con biotita, gneiss y calizas. El grado de metamorfismo en la zona es elevado, con cuerpos de intrusión graníticos, granodioríticos y plutónicos dioríticos de diferentes edades. Por ejemplo, las de Guerrero-Oaxaca pertenecen al Paleozoico y las de Michoacán al Cenozoico temprano. En general las unidades Paleozoicas en la región son predominantemente de tipo metamórfico (*e.g.* Río Tacámbaro). Las formaciones del Jurásico se encuentran en el estado de Guerrero y el sureste de Michoacán (*e.g.* área de Huetamo) mientras que las pertenecientes al Cretácico, predominantemente medio sedimentario marino, se les encuentran en el estado de Guerrero (*e.g.* Tetela del río) (Toledo, 1982).

Vegetación.

La vegetación característica se define como bosque tropical caducifolio (Rzedowski, 1978). De acuerdo con Rzedowski (1978) pertenece a la región fitogeográfica Caribeña incluida en el reino florístico Neotropical; la depresión se encuentra considerada como un ramal de la provincia de la costa del Pacífico. El número de endemismos, sobre todo a nivel de especie, es alto (Rzedowski, 1978; Toledo, 1982).

Las familias dominantes del paisaje corresponden a Burseraceae, Fabaceae y Moraceae. En cuanto a las cactáceas columnares candelabroformes, los géneros más comunes son: *Stenocereus*, *Neobuxbaumia*, *Pachycereus* y *Cephalocereus* (Jiménez, 1977).

La Cuenca del Balsas constituye el área de máxima concentración de especies de *Bursera*. Las asociaciones se encuentran dominadas por este género. Por ejemplo, en la parte oriental se conocen *Bursera morelensis*, *B. longipes*, *B. lancifolia*, *B. schlechtendali*, *B. chemopodicta*, *B. aptera*, *B. boliviari*, *B. xochipalensis*, *B. aleoxylon*, *B. rzedowski* (Toledo, 1982; Contreras, 1991).

Clima.

La temperatura media anual más cálida se encuentra en el fondo de la Depresión, cerca de la desembocadura del Río Balsas (30°C) y las más frías se encuentran en la Sierra Madre (12°C). La Depresión del Balsas es más seca que la costa, debido a que los vientos pasan por ahí después de haber hecho una primera descarga de humedad en la Sierra Madre. Existe una menor precipitación en las zonas más bajas (partes cercanas al cauce del Río Balsas); además de ser las más cálidas, son también las más secas.

La variación altitudinal de la cresta de la Sierra Madre influye significativamente en la distribución longitudinal de la humedad (Toledo, 1982), por lo que la parte más seca de la Depresión se encuentra cerca de la desembocadura del Río, donde la Sierra tiene un mínimo de altitud, a su vez la parte más húmeda se localiza a la misma longitud (100°) que es el filo más alto de la Sierra de Taxco.

La Depresión Oriental de la Depresión (Puebla y Oaxaca) presenta una tercera zona de poca humedad que está separada del cañón del Zopilote por una franja relativamente más húmeda (Jiménez, 1980).

Los climas del Balsas pueden agruparse en dos tipos, el estepario Bs y el cálido subhúmedo Aw. Los climas de tipo estepario existen en las tres zonas de escasa humedad referidas anteriormente; en la zona de Infiernillo se localizan dos subtipos, el Bs₁ y el Bs₀, es decir el menos seco y el más seco de los esteparios; la segunda zona se encuentra en el cañón del Zopilote, donde existe un Bs₁. La tercera zona se encuentra en los alrededores de Huamuxtitlán, donde se presenta un Bs₁, que difiere de los anteriores por presentar temperaturas más bajas (Toledo, 1982).

Del tipo Aw, existen dos subtipos, el Aw₀ que es el más ampliamente distribuido; el Aw₁ lo encontramos en una franja que corre por la Depresión Occidental del Balsas en las estribaciones de la Sierra de Taxco y la Sierra Madre del Sur, a lo largo de la costa, generalmente junto al litoral y en zonas de mediana altitud hacia el lado occidental.

DESCRIPCIONES MORFOLÓGICAS

Caesalpinia hintonii Sandwith, en Kew Bull. 5: 303-304. (1937) Tipo: México, Guerrero (Michoacán): Coyuca, municipio de San Lucas, Cuajilote, 9 de mayo de 1935, Hinton 7746 (holotipo K!, isotipos, A!, F!, GH!, MEXU) Cuenca Media. Figura 1A.

Árboles o arbustos de 2-4 m de alto. Hojas de 5.7-22.5 cm de largo, terminando en una pinna; estípulas glandular-ciliadas; peciolo glandular-setoso o glabro; raquis de 2.5-15.7 cm de largo; con 3-13 pinnas, de 1-7.7 cm de largo, puberulentas o glabras; foliolos 3-10 yugados, obovados, elípticos u oblongo elípticos, de 0.6-2.5 cm de largo y 0.3-1.3 cm de ancho, ápice obtuso o redondeado, margen entero con puntos glandulares negros, base oblicua adpresamente pubescentes o glabros en la madurez. Inflorescencias axilares o terminales, arqueadas o erectas, densamente pubescentes o pilosas; brácteas rojas, ovado-acuminadas; pedicelos casi horizontales, gráciles articulados en $\frac{1}{2}$ o menos de su longitud, en ocasiones torcidos y las flores resupinadas; cáliz rojo púrpura; el tubo calicino obcónico, comprimido lateralmente, de 4.3-6.5 mm de largo; sépalos ovados u oblongo-ovados, de 5.4-9 mm de largo y 2.5-4.5 mm de ancho; el abaxial cimbitiforme, agudos y glandular ciliados; pétalos rojo salmón, de 5.2-8.7 mm de largo y de 3.5-5.5 mm ancho, unguiculados con androceo de filamentos curvados, de 6.5-11 mm de largo, densamente vellosos hasta $\frac{1}{2}$ - $\frac{3}{4}$ de su longitud, el resto con glándulas estipitadas verde limón; pistilo sésil o estipitado, ovario densamente sericeo y cubierto por glándulas cupuliformes rojas.

Legumbre plana, falcada, de 3-5.7 cm de largo y 1-1.7 cm de ancho, valvas cartáceas, la superficie pilosa con abundantes glándulas estipitadas cupuliformes rojas, elásticamente dehiscentes. Semillas 1-3, planas, anchamente ovadas, de 9-11 mm de largo, de color castaño claro, con margen rojo.

Hábitat: En laderas rocosas en el bosque tropical caducifolio, frecuente en vegetación secundaria, a lo largo de los caminos, en suelos aluviales cerca de arroyos estacionales o permanentes; 150 a 750 msnm.

Floración y fructificación: De diciembre a abril

Nombre común y usos: Trompetilla, Juancanchiere, usado como cerca viva.

Distribución: Conocida únicamente en la Depresión media del Río Balsas en los estados de Guerrero y Michoacán.

Notas: Especie característica por sus pedicelos gráciles, casi horizontales o en ocasiones reclinados, con indumento de tricomas simples y glándulas; pedicelos articulados en o cerca de la base del tubo calicino, flores escarlata, fruto con glándulas estipitadas cupuliformes rojas.

***Caesalpinia aff hintonii*, Cuenca alta. Figura 1B.**

Árboles o arbustos de 2-6 m de alto. Hojas de 7.5 -22.5 cm de largo, terminando en una pinna; raquis de 3-15.7 cm de largo; foliolos 3-10 yugados, ovados, elípticos u oblongo elíptico con margen entero generalmente con puntos glandulares negros, base redondeada. Inflorescencias axilares o terminales, paniculadas o racemosas, de 6-36 cm de largo; brácteas rojas, generalmente con glándulas en el margen; cáliz rojo oscuro, sépalos

adaxiales ovados u oblongo ovados, de 5.5-7 mm de largo y 2.5-4.1 mm de anchos, ligeramente cóncavo, margen glandular ciliado; pétalos de color rojo salmón con glándulas en la superficie; androceo con los filamentos curvados, con glándulas estipitadas de color verde limón en el tercio superior; anteras oblongo elípticas. Legumbre plana, falcada de 3.5-5.7 cm de largo y 1.1-1.7 cm de ancho, las valvas cartáceas con glándulas cupuliformes o anulares de color verde limón en la base y hasta 2/3 de su longitud o las glándulas ausentes, de color castaño amarillento con tintes vináceos o sin ellos, elásticamente dehiscente; semillas 1-3 por fruto, planas, anchamente ovadas, de 8.6-11 mm de largo y 7.5-9.6 mm de ancho y 1.7-2.4 mm de grosor, lustrosas, castaño claras y oliváceas.

Hábitat: Se le encuentra en el bosque tropical caducifolio y en vegetación secundaria derivada de éste, en laderas o cañadas, o cerca de corrientes de agua temporales o permanentes, sobre suelos calizos de 500-1200 msnm.

Floración y fructificación: Florece de enero a abril y fructifica de febrero a mayo.

Distribución: Conocida únicamente en la Depresión Oriental del Balsas en los estados de Guerrero y Puebla.

Notas: Se distingue por sus vistosas flores de color rojo salmón, foliolos elípticos u obovados, en su mayoría con puntos negros en el margen, legumbre falcada con glándulas estipitadas cupuliformes o anulares, de color verde limón en la mitad inferior. Está relacionada con *Caesalpinia aff hintonii* cuenca baja, de la que se diferencia principalmente por que ésta tiene flores resupinadas, el color y la forma de las glándulas en la legumbre. *C. hintonii* y *C. macvaughii* son especies endémicas y simpátricas en la Depresión Occidental del Balsas, en tanto que *C. aff. hintonii* es alopátrica respecto a aquellas y es endémica a la Depresión Oriental del Balsas.

Caesalpinia macvaughii J. L. Contreras & G. P. Lewis., en Kew Bull. 47: 309 (1992).

Tipo: México, Guerrero, municipio Zirándaro de Chávez, 8 de marzo de 1988, Contreras 2343 (Holotipo FCME, isotipos K!, MEXU) Figura 2.

Árboles o arbustos de 2-8 m de alto, corteza gris pruinosa, exfoliante a fisurada, ramas jóvenes glabras, rojizas. Hojas de 10-29 cm de largo, terminando en una pinna, pilosas cuando jóvenes, glabras en la madurez, con los pulvínulos rojos; con estípulas caducas, triangular-ovadas, de 3-5.5 mm de largo y 1.5-2.7 mm de ancho, margen fimbriado con puntos glandulares negros, ápice agudo, pilosas en ambas superficies; peciolo de 1-8.5 cm de largo; raquis de 0.9-16.7 cm de largo; pinnas 5-15 cm de largo; folíolos 4-11 pares, oblongos a elípticos, de 5-19 mm de largo y 2-8 mm de ancho, ápice obtuso a redondeado, margen con puntos glandulares negros, base oblicua, pilosos cuando jóvenes, glabros en la madurez. Inflorescencias racemosas o paniculadas, de 6-40 cm de largo, puberulentas; brácteas ovadas, de 3.3-5 mm de largo y 1.6-2.4 mm de ancho, largamente acuminadas, escuarrosas, puberulentas; pedicelos ascendentes, de 6-8 mm de largo articulados cerca del pedúnculo, o en 1/4-1/5 de su longitud, puberulentos; sépalos oblongo-ovados; los adaxiales de 4.7-6 mm de largo y 2.8-4.4 mm de ancho, los laterales de 4.6-5.8 mm de largo y 2.9-4 mm de ancho, ligeramente cóncavos; el abaxial cimbiforme, de 5-6.2 mm de largo y 3.3-5 mm de ancho, ápices obtusos, márgenes amarillos, ciliados; pétalos amarillos, base cuneada, ápice agudo, uña de 7-1.5 mm de largo, con glándulas estipitadas, verdes en la superficie abaxial de la uña y base del limbo; androceo con los filamentos curvados, de 6-10 mm de largo, densamente vellosos en la base, pilosos hasta ½ de su longitud, el resto cubierto con glándulas estipitadas verdes, anteras elípticas de 1.2-

1.5 mm de largo y 0.8-1.1 mm de ancho. Legumbre falcada, de 3.2-4.9 cm de largo y 1-1.4 cm de ancho, valvas subleñosas castaño claro y rojizas, pilosas y con o sin glándulas estipitadas en forma de anillo o copa, elásticamente dehiscentes. Semillas 1-3 planas, anchamente ovadas, de 8-9 mm de largo, 6-8 mm de ancho y 0.15-0.22 mm de grosor, lustrosas, amarillo verdosas a castaño claro.

Hábitat: Se le encuentra en bosque tropical caducifolio sobre laderas rocosas y en las orillas de ríos, en ocasiones formando parte de cercas vivas en potreros o campos de cultivo; 100 a 250 msnm.

Floración y fructificación: De mediados de diciembre a abril.

Distribución: Conocida únicamente en la Depresión del Río Balsas y Tepalcatepec, en los estados de Guerrero y Michoacán.

Notas: *C. macvaughii* aparentemente es endémica de la base de los ríos Balsas y Tepalcatepec. Relacionada con *C. hintonii* de la que difiere por su cáliz rojo, corola amarilla, mayor número de foliolos en la pinna, pedicelos erectos articulados y glándulas en la superficie del fruto (cuando están presentes) amarillo verdosas, en forma de disco o cúpula, con estípites cortos. En contraste, *C. hintonii* presenta cálices y corolas rosa salmón, foliolos obovados restringidos a la parte distal del raquis de la hoja (incluyendo el peciolo), pedicelos articulados en la base del tubo del cáliz y glándulas en la superficie del fruto (cuando están presentes) de color rojo vino, de tipo cupuliforme y estípites largas.

Caesalpinia melanadenia (Rose) Standl. en Contr. U.S.Natl.Herb. 23: 425 (1922). Tipo: México, Tehuacán, Puebla, 1° septiembre 1906, Rose & Rose 1149 (Holotipo US!).
Figura 3.

Arbusto desarmado de ramas cortas casi negras; tronco de corteza gris blanquizca con lenticelas blancas pubescente o glabro, los tallos jóvenes rojo-parduzcos con lenticelas blancas; hojas con tres pinnas; peciolo y raquis glandulares, finamente pilosos y delgados; foliolos (4-6) oblongos de 5-8 mm de longitud, obtusos pubescentes o glabros con glándulas negras a lo largo de los márgenes; pedúnculo corto. Inflorescencias usualmente racemosas, cortas (1-15); pedicelos glandulares estipitados, en ocasiones sin estas, corola rosa escarlata con pétalos ovadoelípticos de 9 x 10 x 6 mm (incluyendo 1 mm de la uña), margen con glándulas estipitadas; estambres pequeños tan largos como los pétalos, con vellosidades en la base; los filamentos rosa escarlata; fruto elásticamente dehiscente, moderada o densamente pubescente con glándulas sésiles púrpura oscuro, las vainas miden 3 cm de longitud, poseen de 2 a 3 semillas; las semillas son ovado-suborbiculares de 7 x 5 x 2 mm, amarillas o café ocre brillante; germinación faneroepigial.

Hábitat: Bosque tropical caducifolio y matorral xerófilo; 800-1960 msnm

Floración y fructificación: Diciembre a marzo; Lewis (1994) reporta la floración desde el mes de octubre, los frutos pueden persistir hasta mayo; ocasionalmente se presenta un segundo periodo de floración entre julio y septiembre.

Distribución: Partes bajas del Valle de Tehuacán-Cuicatlán.

Notas: Especie relacionada con *C. hintonii* del Río Balsas con quien comparte el color de las flores rosa-rojizo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolecta de material biológico.

Se escogieron cinco poblaciones de las nueve descritas por Contreras (1991) para *C. hintonii*; las poblaciones elegidas representan a las tres variantes morfológicas referidas en la introducción. En los meses de junio y agosto de 1997 se recolectaron hojas de 30 individuos para cada una de las cinco poblaciones de *Caesalpinia hintonii* y para una población de *C. macvaughii*.

Para la primera variante morfológica de *C. hintonii*, se recolectaron ejemplares de las poblaciones Tehuiztingo (Puebla), Valerio Trujano (Guerrero) y Copalillo Tlayahualco (Guerrero); de la segunda individuos de la población Zicuítaro (Guerrero) y finalmente para la tercera se recolectaron individuos en El Infiernillo (Michoacán). Las 30 muestras para la población de *C. melanadenia* se recolectaron en noviembre de 1997 en el Jardín Botánico de cactáceas y suculentas "Elena Bravo Hollis" (Tehuacán, Puebla). La ubicación y georreferencia de localidades y especies pueden observarse en la Figura 4 y en el Apéndice IV.

Todas las muestras se transportaron a la ciudad de México en un tanque con nitrógeno líquido (-196 °C) y posteriormente se almacenaron en ultracongelación a -80 °C.

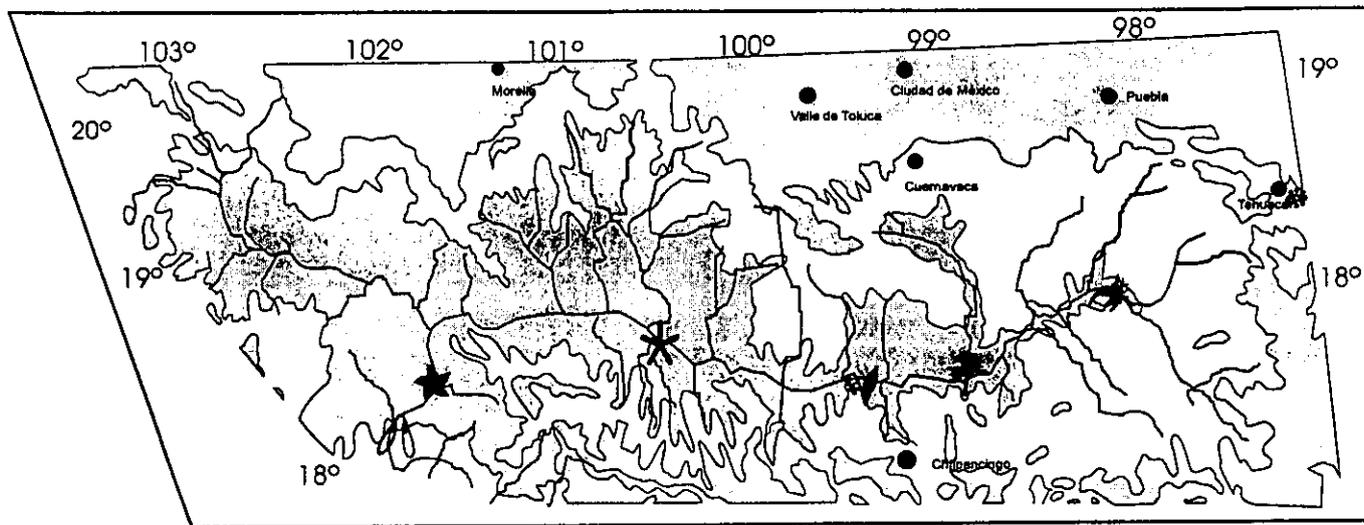


Figura 4-Localización de poblaciones de las tres especies de *Caesalpinia*.

Caesalpinia hintonii.

 Tehuizingo

 Tlayahualco

 Valerio Trujano

 Zicuítaro

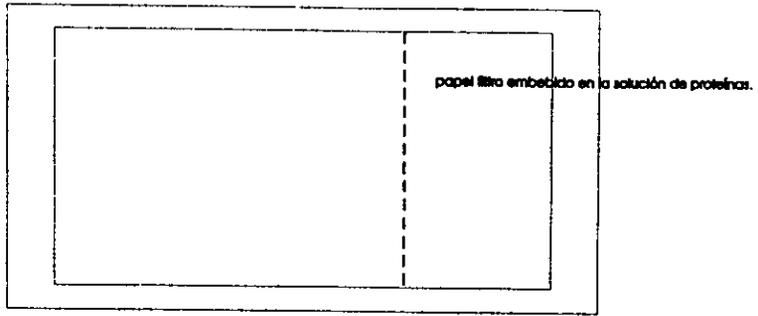
 Infiernillo



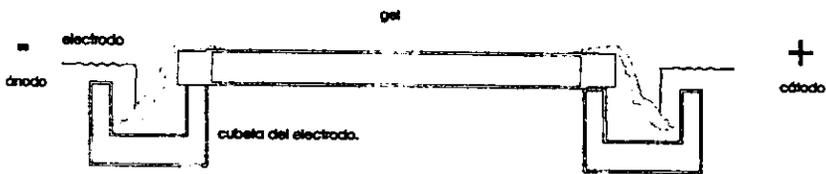
Caesalpinia macvaughii.



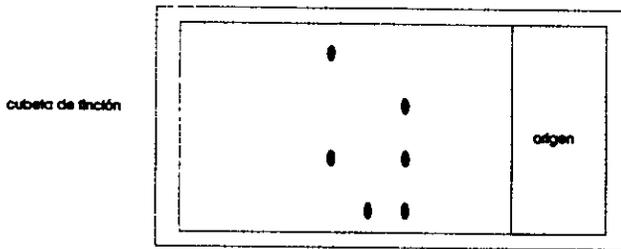
Caesalpinia melanadenia.



A: En un gel de almidón se coloca el homogenado de tejido.



B: El gel con las muestras se sitúa en un campo eléctrico durante varias horas.



C: El gel se coloca en una solución con el sustrato adecuado y con una sal que produzca una banda coloreada al reaccionar con el producto de la reacción catalizada por la enzima.

Figura 5: Representación esquemática de la técnica de electroforesis en gel utilizada para medir la variación genética en poblaciones naturales. (Modificada de Ferguson, 1980).

Trabajo de laboratorio.

Electroforesis.

La electroforesis enzimática se basa en la migración diferencial de las moléculas de proteína bajo la influencia de un campo eléctrico. Una enzima puede presentar formas moleculares alternativas en el mismo locus (aloenzimas) y en diferentes loci (isoenzimas). La técnica electroforética separa a las isoenzimas por carga, forma y tamaño. El fundamento en la utilización de la electroforesis consiste en asumir que las aloenzimas de una proteína reflejan cambios a nivel de ADN y en equiparar estas variantes móviles con alelos de un locus génico y sus frecuencias de electromorfos con frecuencias alélicas (Hedrick, 1983).

I- Homogeneizado de muestras para la extracción de enzimas.

Se homogeneizaron tres folíolos de la pinna (aproximadamente 1 cm²) con 0.5 ml de buffer (solución amortiguadora) de extracción para *Abies* (ver apéndice II) en pozos de acrílico de 1 cm de diámetro, a fin de que liberaran las proteínas y las enzimas. 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).

El extracto obtenido del homogenado es absorbido en tiras (mechas) de papel filtro (Whatman n° 17) de 0.15 cm de ancho por 1.5 cm de largo. Los extractos en las mechas se almacenaron en tubos eppendorf en ultracongelación a -80°C. Generalmente de cada macerado se obtenían hasta 10 mechas.

II- Preparación del gel.

Los geles fueron preparados con almidón hidrolizado especial para electroforesis, siguiendo el método modificado de Cheliak y Pitel (1984). En un matraz kitasato de 1 litro se agregó almidón al 12% y la solución amortiguadora específica para cada sistema (Apéndice I); se agitó vigorosamente e inmediatamente después se colocó al fuego sin dejar de agitar hasta llegar al punto de ebullición; se dejó hervir de 3-5 minutos, después se aplicó vacío durante un minuto para eliminar las burbujas de aire. El gel se vertió en un molde de acrílico de 20 x 20 x 5 cm, se dejó enfriar a temperatura ambiente por una hora treinta minutos. Transcurrido este lapso, se refrigeró a 4°C durante una hora diez minutos, posteriormente se cubrió con plástico delgado para evitar desecación y se dejó a temperatura ambiente hasta el día siguiente en que se realizaban las corridas.

III- Sistemas de amortiguación de corrida.

Se usaron dos sistemas amortiguadores para los geles y los electrodos (solución ionizada que conduce la corriente eléctrica a través del gel). El sistema C de maíz (*Zea mays* L.) (Stuber *et al.*, 1989) y el Morfolina-citratos (Wendel y Weeden, 1989). Las recetas, la corriente empleada, así como el tiempo en que debe correr cada gel puede observarse en el Apéndice I.

IV- Aplicación de muestras y corrimiento del gel.

Al día siguiente de la preparación de los geles éstos se refrigeraban durante una hora, posteriormente, se sacaban del refrigerador removiéndose la cubierta plástica. Se realizaba un corte a aproximadamente 4 cm del origen en el borde catódico. Las porciones

del gel se separaban y se colocaban 30 mechas con las muestras embebidas, a cada extremo del gel se colocaba una mecha embebida en el colorante negro de amido (marcador de distancia).

Los geles se colocaban en las cámaras de electroforesis que contenían la solución amortiguadora de la charola. El gel se coloca a manera de que el origen se oriente a la conexión catódica. Las cámaras se introducían dentro de un refrigerador a 4°C y eran conectadas a las fuentes de poder para dejar pasar corriente durante 30 minutos. Transcurrido este lapso se retiraban las mechas, se unían las piezas del gel, se cubrían con el plástico adherible, un vidrio delgado y por último con una bolsa de sustituto de hielo para evitar el sobrecalentamiento y deshidratación de los geles. El paso de corriente se reanudaba permaneciendo hasta que la muestra de negro de amido migrara aproximadamente 6 cm a partir del origen.

V- Tinción histoquímica y fijación enzimática.

Transcurrido el tiempo de corrida se procedió a sacar los geles del refrigerador y se rebanaron horizontalmente con un alambre cortador. Cada rebanada resultante se colocó en una charola de tinción. La tinción se lleva a cabo en la oscuridad. Las soluciones de tinción se preparaban inmediatamente después de rebanado el gel, al sumergirse la rebanada del gel en la solución de tinción los substratos y otros compuestos difunden por el gel y reaccionan con la enzima bajo estudio. La detección de esta enzima se basa en la precipitación de indicadores solubles que tiñen el gel en las zonas de actividad enzimática (Wendel y Weeden, 1989). Se ensayaron 21 enzimas para las tres especies de *Caesalpinia*. Las recetas de tinción para cada enzima se describen en el apéndice III.

Los recipientes con las rebanadas se revisaban cada 30 minutos para monitorear el grado de tinción. Cuando las bandas resultaban nítidas se desechaba la solución para la tinción, se enjuagaban los geles tres veces con agua corriente y después con agua destilada, finalmente se fijaban con una solución de etanol al 50%, en la que permanecían durante 24 horas a 4 °C. Después de ese lapso se les retiraba el fijador y eran envueltas en plástico delgado; los geles eran mantenidos en refrigeración hasta su lectura.

VI- Lectura e interpretación de geles.

Para un locus dado, el número de bandas varía entre los individuos homocigotos y heterocigotos así como dependiendo de la estructura cuaternaria de la enzima. Cuando la enzima es monomérica, los homocigóticos presentan una banda y los heterocigóticos dos, si es dimérica los heterocigóticos presentan tres bandas; dos homodímeros y un heterodímero de migración intermedia y cuando es tetramérica presentan cinco; dos bandas de los parentales (homodímeros) y tres producto de la mezcla de genes (heterodímeros).

Se asignó el número 1 al loci que tuvo una migración más cercana al origen, 2 al siguiente por arriba del primero y así sucesivamente. Para identificar los alelos el criterio fue el mismo, esto es, 1 a la banda más cercana al origen y así sucesivamente.

VIII- Análisis de datos.

Con los genotipos inferidos de la lectura de los geles se obtuvieron los siguientes parámetros:

- Frecuencias genotípicas para cada locus; para evaluar si se encontraban en equilibrio de Hardy-Weinberg se aplicó una prueba de X^2 de bondad de ajuste. Esto se hizo para cada

locus en cada población utilizando la fórmula de Levene (1949) y la corrección de continuidad de Yates (Sokal y Rohlf, 1981). El análisis se repitió agrupando todos los genotipos en tres clases: 1) homocigos para el alelo más común, 2) heterocigos para el alelo más común y cualquier otro alelo y 3) cualquier combinación.

- Proporción de loci polimórficos. Un locus es polimórfico cuando presenta más de un alelo. El valor obtenido depende del número de individuos que se examinen, por ello se estableció el criterio de polimorfismo en el que se propone que el alelo más común debe poseer una frecuencia que no exceda el 0.95 o 99 % (Nevo, 1978; Brown y Moran, 1981; Hamrick *et al.*, 1981; Hedrick, 1983; Futuyma, 1986; Nei, 1987; Li y Graur, 1991) así, aunque se examinaran más individuos la proporción media de loci polimórficos no cambiará.

La proporción media de loci polimórficos se estima mediante la siguiente expresión:

$$P = \frac{x}{m}$$

En donde x es el número de loci polimórficos en una muestra de m loci (Hedrick, 1983). El índice toma valores de 0 (ningún loci es polimórfico) a 1 (todos los loci son polimórficos).

- Índice de heterocigosis (H) o heterocigosis promedio esperada. Se calcula para cada locus y después se obtiene un promedio; toma valores de 0 (no existe variación) a 1 (todos los loci presentan variación). El índice de heterocigosis esperada se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$H = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

Donde p_i es la frecuencia del alelo i ésimo en un locus. Para comprobar que existen diferencias en los valores de H en las poblaciones de *C. hintonii* se realizó una prueba de ANOVA.

- Número de alelos por locus (A) y número de alelos efectivo (A_e). El número de alelos es el promedio simple del número de alelos por locus y el número efectivo de alelos es el inverso de la homocigosis teórica (Nevo, 1978; Brown y Moran, 1981; Hamrick *et al.*, 1981; Loveless y Hamrick, 1987) y se encuentra descrito mediante la siguiente ecuación:

$$A_e = \frac{1}{\sum_{i=1}^n p_i^2}$$

Donde p_i es la frecuencia del alelo i en la población. De esta manera A_e toma en cuenta no sólo el número de alelos en un locus sino también sus frecuencias relativas.

- Índice de fijación F de Wright. Examina si las frecuencias alélicas de un locus se desvían de las esperadas bajo el equilibrio de Hardy-Weinberg y se define, para el caso de dos alelos, como (Hartl y Clark, 1989):

$$F = \frac{1 - H_o}{2pq}$$

Este índice toma valores de -1 a 1 donde el valor cero quiere decir que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, cuando es negativo hay exceso de heterocigos, o de homócigos cuando es positivo. Para evaluar si los valores eran significativamente distintos de 0 se realizó una prueba de $\chi^2 = F^2 n(K-1)$ con $gl = (k-1)/2$, donde n es el tamaño de la muestra y k el número de alelos (Workman y Niswander, 1970).

- Tasa de entrecruzamiento asumiendo equilibrio de endogamia. Mediante el índice de fijación F , se puede estimar el entrecruzamiento en una población. Para el uso adecuado de este método se debe considerar lo siguiente: 1) autofecundación como la causa principal de endogamia, 2) que la población ya alcanzó el equilibrio de endogamia, 3) que no opera la selección natural, 4) que las poblaciones no están subestructuradas y 5) que no hay apareamientos entre parientes. Si existen otros tipos de endogamia la F dará como resultado una t_{eq} muy baja. Si por el contrario está operando otra fuerza, como selección a favor de un tipo de heterócigo, la F producirá un t_{eq} demasiado alto. La ecuación para calcularla es la siguiente:

$$t_{eq} = \frac{1 - F}{1 + F}$$

Toma valores entre 0 (ninguno de los apareamientos se da por entrecruzamiento) y 1 (los apareamientos son producto de entrecruzamiento).

El método sólo debe utilizarse para estimaciones preliminares de la tasa de entrecruzamiento, ya que se calcula un valor estadístico a partir de otro. Cuando el sistema reproductivo es el único factor que opera sobre la estructura genética de la población, el cálculo de la tasa de entrecruzamiento asumiendo equilibrio de endogamia es una buena aproximación, sobre todo cuando se consideran varios loci. Esto se debe a que el sistema reproductivo afecta a todos los loci del genoma (Layton y Ganders, 1984; Nei, 1987).

- Estadísticos F de Wright (Hartl y Clark, 1989). Estos índices miden cuánto se desvían las frecuencias genotípicas de una población subdividida (estructurada) de lo que se

esperaría por azar; consisten en tres coeficientes que describen la diferenciación a nivel local y total.

F_{st}, mide la cantidad de diferenciación genética entre subpoblaciones, nos da indicios de la estructura de la población y sus formas de dispersión. **F_{st}** es equivalente al índice **G_{st}** (Nei; 1987).

Toma valores entre 0 y 1; el valor es de cero si todas las poblaciones son idénticas entre ellas en términos de variación genética mientras que si el valor es igual a uno indica que son completamente diferentes entre sí, es decir, que no comparten ningún alelo.

Otra forma de interpretarlo es en términos de porcentaje de variación genética que se encuentra dentro y entre poblaciones: si es de cero quiere decir que el total de la variación se encuentra en cualquier población (100% dentro y 0% entre), mientras que si es de uno quiere decir que para tener representada la variación genética se requiere a todas las poblaciones pues cada una está fijando un alelo. La diferenciación observada se genera por deriva génica o por selección natural (Wright, 1978).

F_{is}, es el coeficiente de entrecruzamiento entre individuos en las subpoblaciones (Hartl y Clark, 1989), si es positiva señala que en la población hay una deficiencia de heterócigos debido al apareamiento no azaroso, puede considerarse como equivalente al coeficiente de endogamia promedio de todas las subpoblaciones. Si **F_{is}** toma valores negativos indica que existe un menor número de homócigos que los esperados y sugiere que ha existido selección a favor de los heterócigos (Linhart *et al.*, 1981).

F_{it}, mide los efectos conjuntos del sistema reproductivo y deriva génica y/o selección natural en la población total, muestra los efectos del apareamiento no azaroso

entre subpoblaciones y los efectos de la estructuración. Se encuentra descrito mediante la siguiente ecuación:

$$Fit = \frac{1 - \hat{H}_o}{\hat{H}_t}$$

En donde H_o es la proporción de heterócigos observados dentro de las subpoblaciones y H_t la proporción de heterócigos esperados en la población total. Los tres coeficientes se encuentran relacionados mediante la siguiente ecuación:

$$F_{st} = \frac{Fit}{1 - Fis}$$

Para saber si Fis y Fit eran distintas de cero se realizó una prueba de $\chi^2 = F^2 N(k-1)$ con $gl = k / (k-1)^2$, donde N es el tamaño de la muestra y k el número de alelos (Workman y Niswander, 1970) y para las F_{st} se utilizó la fórmula $\chi^2 = 2NF_{st}(k-1)$ con $gl = (k-1)(s-1)$. N es el tamaño muestral, k , el número de alelos y s el número de subpoblaciones. Los estadísticos fueron calculados con el programa BIOSYS (Swofford y Selander, 1981).

- Tamaño efectivo de la población, N_e ($N_e = 2\pi Nm$), y el producto del tamaño efectivo de la población y la tasa de migración (N_{em}) utilizando un método indirecto empleando la ecuación propuesta por Crow y Aoki (1984):

$$F_{st} = \frac{1}{4aN_e m} \Rightarrow N_e m = \frac{1 - F_{st}}{4F_{st}a}$$

donde $a = [n/(n-1)]^2$ y n es el número de subpoblaciones. La formula de Crow y Aoki establece dos propiedades relevantes de la F : que es casi independiente de la tasa de mutación y el número de poblaciones usadas.

- A partir de las frecuencias alélicas se calculó otra medida individual de flujo génico (\hat{M}) entre pares de poblaciones, bajo un modelo de islas (Slatkin, 1993) para establecer si se sigue el patrón de aislamiento por distancia.
- Identidad (I) y distancia genética (D) entre pares de poblaciones. La identidad genética de Nei (1987) estima la proporción de genes que son idénticos en dos poblaciones. Éste parámetro toma valores desde cero (no hay alelos en común) hasta 1 (en ambas poblaciones se encuentran los mismos alelos y en las mismas frecuencias).

La semejanza genética entre dos poblaciones en un locus puede medirse por I definido como:

$$I = \frac{\sum a_i b_i}{\sqrt{\sum a_i^2 \sum b_i^2}} \text{ En donde } a_i \text{ } b_i \text{ son las frecuencias de los alelos.}$$

Para el caso de multiloci se emplea la siguiente ecuación: $I = \frac{\sum ab}{\sqrt{x}}$, donde ab es la frecuencia promedio y x el número de frecuencias de loci. Finalmente D se calcula mediante la siguiente expresión: $D = -\log_e I$, o bien como: $D = -\ln I$.

- Fenogramas de relaciones genéticas mediante las identidades genéticas de Nei (1972) por el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean, Sokal y Michener, 1958). Se hicieron dos análisis, el primero consideró únicamente a las poblaciones de *C. hintonii* y el segundo involucró a las tres especies, abarcando 8 loci, que es el número de loci compartidos por todas las especies y poblaciones.

RESULTADOS

Sistemas enzimáticos.

De las 21 enzimas ensayadas para las tres especies de *Caesalpinia*, 11 de ellas presentaron actividad interpretable y consistente en *C. hintonii*. Para *C. macvaughii* y *C. melanadenia* fueron 9 y 10 enzimas respectivamente con actividad igualmente interpretable y consistente.

En el Cuadro 1 se muestra la estructura cuaternaria y el sistema de buffer donde se observó mayor resolución de las enzimas para las tres especies de *Caesalpinia*. La representación gráfica de las enzimas monoméricas y diméricas así como la descripción pueden observarse en el Apéndice V.

El buffer del sistema C (sistema continuo) fue el más adecuado para la mayoría de las enzimas.

Medidas de diversidad genética.

Las poblaciones de *Caesalpinia hintonii* muestran altos valores de heterocigosidad (H_o) y polimorfismo (P) (Cuadro 2); el valor de H_o oscila entre 0.191 (Infiernillo) y 0.275 (Zicuítaro) mientras que para P va de 42.1 a 68.4 siendo las mismas poblaciones ya mencionadas arriba las que presentan el menor y mayor valor respectivamente. La población de Infiernillo es la única que presenta valores bajos de H_o . Los promedios para cada parámetro son 0.249 (H_o) y 58.96 (P).

Cuadro 1- Enzimas probadas para las tres especies de *Caesalpinia* (CH- *C. hintonii*, CMC- *C. macvaughii* y CM- *C. melanadenia*; MC, sistema Morfolina-Citratos, C, sistema C de maiz), se muestra además la estructura cuaternaria para cada enzima.

| Enzima | E. C. | Sistema de buffer empleado | Especie. | Estructura cuaternaria |
|---------|----------|----------------------------|--------------|------------------------|
| 6-PGD | 1.1.1.44 | Escasa actividad | - | dímero |
| ACO | 4.2.1.3 | Escasa actividad | - | monómero |
| AcPH | 3.2.3.2 | M.C | CH, CMC y CM | monómero |
| ADH | 1.1.1.1 | | - | dímero |
| ALD | 4.1.2.13 | Escasa actividad | - | tetrámero |
| APX | 1.11.1.7 | C | CH y CMC | monomero |
| CPX | | C | CH, CMC y CM | monómero |
| DIA | 1.6.99 | Escasa actividad | - | monómero-dímero |
| EST | 3.1.1.1 | C | CH, CMC y CM | monómero |
| G-6PD | 1.1.1.49 | Escasa actividad | - | dímero |
| GDH | 1.4.1.3 | No hubo actividad | - | dímero |
| GOT | 2.6.1.1 | C | CH y CM | dímero |
| GPI-PGI | 5.3.1.9 | M.C | CH, CMC y CM | dímero |
| IDH | 1.1.1.41 | Escasa actividad | - | dímero |
| LAP | 3.4.11.1 | C | CH, CMC y CM | monómero |
| LDH | 1.1.1.27 | No hubo actividad | - | tetrámero |
| MDH | 1.1.1.37 | M.C | CH, CMC y CM | dímero |
| MNR | 1.6.99.2 | C | CH, CMC y CM | monómero |
| PGM | 5.4.2.2 | Escasa actividad | - | monómero |
| RUB | 4.1.1.39 | C | CH, CMC y CM | tetrámero? |
| SDH | 1.1.1.25 | M.C | CH y CM | monómero |

Cuadro 2- Estimadores de variación genética en tres especies de *Caesalpinia*.

| Especie | N° de loci | Ho | He | %P | A | t_{eq} |
|------------------------------------|------------|------------------|------------------|-----------------|---------------|----------|
| <i>Caesalpinia hintonii</i> | | | | | | |
| Valerio Trujano | 17 | 0.252 (0.082) | 0.285 (0.056) | 63.2 (0.082) | 1.9 (0.17) | 0.549 |
| Tlayahualco | 15 | 0.267 (0.076) | 0.263 (0.55) | 63.2 (0.071) | 1.9 (0.18) | 0.812 |
| Tehuiztzingo | 15 | 0.261 (0.71) | 0.251 (0.53) | 57.9 (0.071) | 1.8 (0.16) | 0.795 |
| Zicuitaro | 19 | 0.275 (0.074) | 0.317 (0.055) | 68.4 (0.073) | 1.9 (0.17) | 0.652 |
| Infiernillo | 16 | 0.191 (0.073) | 0.205 (0.056) | 42.1 (0.073) | 1.6 (0.17) | 0.974 |
| Media | 16.4 | 0.249 (0.055) | 0.264 (0.055) | 58.96 (0.07) | 1.82 (0.2) | 0.747 |
| <i>C. macvaughii</i> | 12 | 0.260 (0.107) | 0.211 (0.066) | 50 (0.073) | 1.5 (0.1) | |
| <i>C. melanadenia</i> | 15 | 0.268 (0.086) | 0.222 (0.052) | 60 (0.082) | 1.67 (0.1) | |

A= número de alelos por locus; Ho = heterocigosis observada, He = heterocigosis esperada por Hardy-Weinberg, y %P= proporción de loci polimórficos; t_{eq} = tasa de entrecruzamiento en el equilibrio. Error estándar entre paréntesis. Un locus es considerado como polimórfico cuando la frecuencia del alelo más común no excede el 0.95%.

C. macvaughii y *C. melanadenia* presentan altos valores de heterocigosis (0.260 y 0.268 respectivamente) aunque los índices de polimorfismo son menores a los de *C. hintonii*.

De las tres especies estudiadas *C. melanadenia* es la que presenta el más alto índice de polimorfismo promedio. Los parámetros de variación genética para *C. melanadenia* se

calcularon en una sola población y con 15 loci. Sin embargo, presentó valores comparables con las poblaciones Tlayahualco, Valerio Trujano y Zicuítaro de *C. hintonii*, siendo estos más altos

Frecuencias alélicas.

En el Apéndice V pueden observarse las frecuencias alélicas y la descripción de loci para las tres especies de *Caesalpinia*. *C. hintonii* presentó el alelo 3 para AcPH-2, APX-1, CPX-1 y EST-1 como característico para sus poblaciones no encontrándose en las otras dos especies.

Los loci AcPH-1 y CPX-2 fueron característicos de una población, el primero para la población de Infiernillo y el segundo para la población de Tehuiztzingo. Para el caso de *Caesalpinia melanadenia* se encontró el alelo 2 de EST-3 como característico de la especie.

El análisis de las frecuencias genotípicas (corrección de Levene; 1949 y continuidad de Yates, Sokal y Rolf, 1981) con la prueba de X^2 , mostraron que para *C. hintonii* el loci GOT-2 de la población Tehuiztzingo no se encontraba en equilibrio de Hardy-Weinberg. Para *C. melanadenia* los locus APX-1 y MDH-1 resultaron en desequilibrio. En ambas especies esos locus mostraban exceso de homocigos. *C. macvaughii* no presentó ningún locus estadísticamente en desequilibrio. Por otro lado, H_o tuvo el mayor intervalo de variación entre loci en la población de Infiernillo (0.00 a 1) y la población con menor variación (0.00 a 0.767) entre loci fue Zicuítaro.

La prueba de ANOVA mostró que existen diferencias entre los valores de H_o estimados ($F= 6.821$, $gl= 4$, $p< 0.01$).

Tasas de entrecruzamiento y coeficiente de endogamia.

El cálculo de las tasas de entrecruzamiento (Cuadro 2), muestra que mayoritariamente los apareamientos en las poblaciones de *C. hintonii* se llevan a cabo por entrecruzamiento. La población Valerio Trujano presenta el más alto porcentaje de eventos de autofecundación (45%) y el menor la población Infiernillo (2.57%).

Por otro lado, los coeficientes de endogamia (Cuadro 3) calculados para cada población y especie mediante los valores de heterocigosis fueron estadísticamente significativos para las poblaciones de Tlayahualco (-0.043) e Infiernillo (-0.068) de *C. hintonii*, mientras que para las otras dos especies no resultaron significativos ($p < 0.01$).

Índices de Fijación

Para *Caesalpinia hintonii* se calcularon 58 índices de fijación; 24 índices fueron menores que cero y 33 mayores. De éstos últimos 15 (24.13%) fueron estadísticamente diferentes de cero, mostrándonos deficiencia de heterócigos; de los valores negativos ocho fueron, estadísticamente significativos, indicándonos exceso de heterócigos (Cuadro 4). Para *C. macvaughii* y *C. melanadenia*, sólo dos loci presentaron valores positivos de F; ambos significativos mostrando exceso de homócigos.

Los índices de fijación nos revelaron que algunos de los loci en las especies estudiadas no están en equilibrio Hardy-Weinberg, pues (en su mayoría) fueron positivos y significativamente distintos de cero.

Cuadro 3- Coeficientes de endogamia para cada población y especie de *Caesalpinia* calculados mediante los valores de heterocigosis.

| Población/ Especie | Coefficiente de endogamia |
|------------------------|---------------------------|
| Valerio Trujano | 0.115 |
| Tlayahualco | -0.043* |
| Tehuizingo | 0.039* |
| Zicúitaro | 0.132* |
| Infiernillo | 0.068* |
| <i>C. melanadenia</i> | 0.207 |
| <i>C. macvaughii</i> | 0.232 |

* valores estadísticamente significativos, ($p < 0.01$).

Estadísticos F de Wright.

El análisis de la estructura genética de las poblaciones de *Caesalpinia hintonii* a través de los estadísticos F se presentan en el Cuadro 5. El 80% de las estimaciones para Fit resultaron positivas mientras que el 60% lo fueron para el estadístico Fis.

Se aplicó una prueba de X^2 a todos los valores para determinar si eran estadísticamente diferentes de cero, 40 valores lo fueron.

Los valores de Fis estuvieron entre -0.478 y 1 con una media igual a 0.031; los valores positivos distintos de cero indican deficiencia de heterocigos respecto a lo esperado mostrando indicios de endogamia en las poblaciones. Las Fit exhibieron como valor mínimo -0.867 y 1 como máximo, ubicándose el promedio en 0.232.

Cuadro 4- Índices de fijación, F, para tres especies de *Caesalpinia*. Las abreviaciones usadas son las mismas que en el Cuadro 1.

| Loci | CH | CH | CH | CH | CH | CMC | CM. |
|--------|-----------------|-------------|-------------|-----------|-------------|--------|--------|
| | Valerio Trujano | Tlayahualco | Tehuitzingo | Zicuátaro | Infiernillo | | |
| AcPH-1 | 1.00* | -0.549* | -0.336 | -0.167 | -0.030 | -0.286 | -0.208 |
| AcPH-2 | -0.356 | -0.369 | -0.235 | -0.166 | - | - | -0.176 |
| APX-1 | 0.615 | 0.025 | 0.447 | 0.346 | -0.637* | 1.00* | - |
| CPX1 | -0.115 | 0.385 | - | 0.836* | 0.287 | - | 0.33 |
| CPX-2 | - | - | 0.421 | - | - | - | - |
| CPX-3 | - | -0.016 | - | 1.00* | - | - | - |
| EST-1 | 0.43 | -0.494* | -0.188 | -0.518* | -0.825* | -0.867 | - |
| EST-2 | -0.438 | 0.289 | -0.760* | 0.206 | -0.143 | -0.667 | -0.429 |
| EST-3 | - | - | - | - | - | - | -0.392 |
| GOT-2 | 1.00* | - | -0.019 | 0.400 | 1.00* | - | 0.712* |
| LAP-1 | 1.00* | 0.519* | 0.179 | - | - | - | - |
| MDH-1 | -0.867* | -0.651* | 0.780* | -1* | -1.00* | -0.622 | -1.00 |
| MNR-1 | 0.033 | 1.00* | 0.100 | -0.357 | 0.469* | - | -0.549 |
| PGI-1 | 1.00* | 1.00* | 0.538* | 0.615* | 1.00* | 0.550* | 1.00* |
| PGI-2 | 1.00* | - | 0.480* | 0.917* | - | - | - |
| SDH-1 | -0.517* | - | - | 0.409* | - | - | -0.047 |
| Media | 0.291 | 0.103 | 0.117 | 0.210 | 0.013 | -0.148 | -0.075 |

* valores estadísticamente distintos de cero $p < 0.01$

El valor promedio de las Fst fue de 0.207, con un intervalo de valores de 0.005 a 0.629, éste nos indica que el 20.7% de la variación se encuentra entre poblaciones y el 79.3% dentro de éstas. Finalmente el estadístico Fst muestra cierto grado de diferenciación genética en las poblaciones.

Cuadro 5- Estadísticos F de Wright y flujo génico (N_m) para *Caesalpinia hintonii*.

| Locus | Fis | Fit | Fst | N_m |
|----------|---------|---------|--------|--------|
| AcPH-1 | 0.000 | 0.084 | 0.084* | 1.744* |
| AcPH-2 | -0.294* | 0.198* | 0.380* | 0.261* |
| APX-1 | 0.382* | 0.470* | 0.143* | 0.958* |
| CPX-1 | 0.319* | 0.4481* | 0.237* | 0.515* |
| CPX-2 | -0.15 | 0.624* | 0.629* | 0.094* |
| CPX-3 | 1.000* | 1.000* | 0.348* | 0.299* |
| EST-1 | -0.359* | -0.277* | 0.060* | 2.506* |
| EST-2 | -0.275* | 0.051 | 0.255* | 0.467* |
| GOT-2 | 0.703* | 0.768* | 0.218* | 0.573* |
| LAP-1 | 0.535* | 0.559* | 0.050* | 3.04* |
| MDH-1 | -0.876* | -0.867* | 0.005* | 31.84* |
| MNR-1 | 0.101* | 0.176* | 0.083* | 1.767* |
| PGI-1 | 0.825* | 0.859* | 0.191* | 0.677* |
| PGI-2 | 0.774* | 0.828* | 0.237* | 0.515* |
| SDH-1 | -0.478* | -0.002* | 0.322* | 0.336* |
| Promedio | 0.031 | 0.232 | 0.207 | 0.612 |

* valores estadísticamente significativos ($p < 0.01$).

Flujo génico y aislamiento por distancia.

El valor promedio de N_m fue menor que 1 (0.612) indicando que existe escaso flujo génico entre las poblaciones; cinco de los valores fueron mayores que 1. El valor de N_e fue de 3.851, y nos indica el número de organismos que se están reproduciendo.

Para los valores de flujo génico entre pares de poblaciones (\hat{M}) observamos los menores valores para los pares de poblaciones Valerio Trujano-Infiernillo y Tehuiztingo-Infiernillo; en las demás el valor de \hat{M} es mayor que 1. En el modelo de aislamiento por distancia no se observó correlación entre la distancia geográfica y el flujo génico entre pares de poblaciones (\hat{M}) Fig. 6

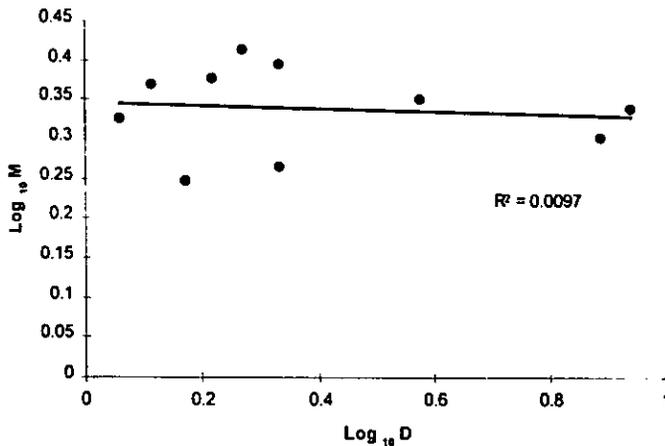


Figura 6- Ajuste lineal entre flujo génico por pares de poblaciones ($\text{Log}_{10}M$) y la distancia geográfica en Km ($\text{Log}_{10}D$) para *Caesalpinia hintonii*.

Distancias genéticas y fenogramas.

El fenograma de la Figura 7 presenta las relaciones genéticas entre las cinco poblaciones de *Caesalpinia hintonii* construido con el método UPGMA (Sokal y Michener, 1958).

La distancia genética promedio entre pares de poblaciones en *C. hintonii* fue de 0.111 con un intervalo de 0.0640 a 0.1755 (Cuadro 6); para la matriz de las tres especies el promedio fue de 0.0637 (Cuadro 7).

Para el segundo análisis en el Cuadro 7 se observa la matriz de distancias genéticas de Nei (1978) para las tres especies. Se observan tres grupos (Figura 8); el primero formado por las poblaciones Valerio Trujano (Gro) y Tehuitzingo (Puebla), el segundo grupo se encuentra formado por las poblaciones Zicuitaro (Gro), Infiernillo (Mich) insertándose la

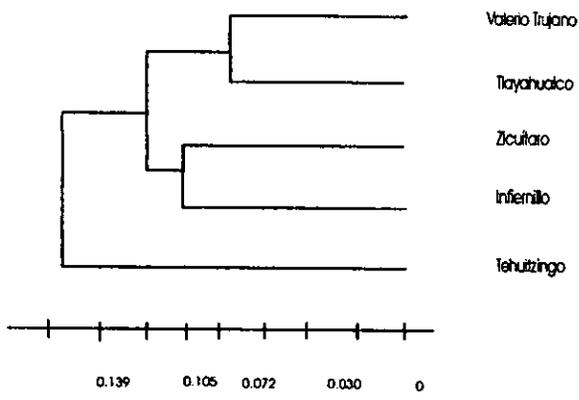


Figura 7- Fenograma de distancias genéticas para *Caesalpinia hintonii*.

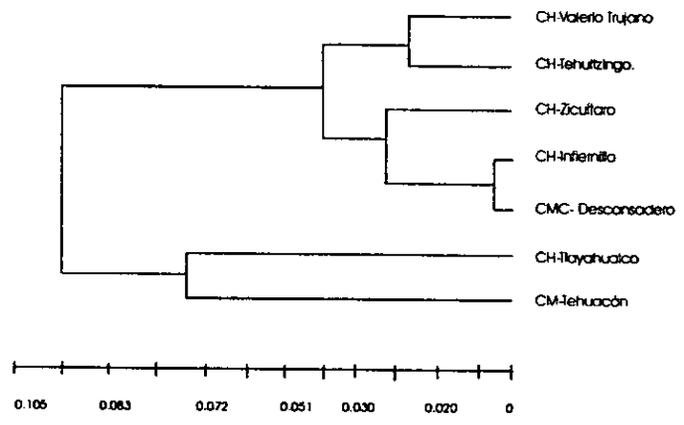


Figura 8-Fenograma de distancias genéticas para las tres especies de *Caesalpinia*

población El descansadero (Mich) de *C. macvaughii*; estas dos últimas íntimamente relacionadas ($I=0.9970$, $D=3.004509 \times 10^{-3}$); el grupo 1 y 2 a su vez se encuentran relacionados entre sí.

Cuadro 6- Distancia genética de Nei (1978) arriba de la diagonal y distancias geográficas (Km) abajo de la diagonal.

| Población | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 V. Trujano | ***** | 0.064 | 0.115 | 0.074 | 0.081 |
| 2 Tlayahualco | 58 | ***** | 0.126 | 0.153 | 0.114 |
| 3 Tehuiztingo | 152 | 100 | ***** | 0.124 | 0.175 |
| 4 Zicúitaro | 70 | 132 | 216 | ***** | 0.086 |
| 5 Infiernillo | 240 | 302 | 386 | 174 | ***** |

Cuadro 7- Distancia genética de Nei (1978) sobre la diagonal para *C. hintonii*, *C. macvaughii* y *C. melanadenia*.

| Población | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|-------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| 1 Trujano | ***** | 0.0534 | 0.0212 | 0.0704 | 0.0512 | 0.0491 | 0.0733 |
| 2 Tlayahualco | | ***** | 0.0534 | 0.1404 | 0.1543 | 0.1142 | 0.0736 |
| 3 Tehuiztingo | | | ***** | 0.0325 | 0.0212 | 0.0242 | 0.0470 |
| 4 Zicúitaro | | | | ***** | 0.0242 | 0.0314 | 0.976 |
| 5 Infiernillo | | | | | ***** | 0.0003 | 0.0954 |
| 6 <i>C. macvaughii</i> | | | | | | ***** | 0.1098 |
| 7 <i>C. melanadenia</i> | | | | | | | ***** |

Se observan tres grupos genéticamente diferenciados, el primero formado por las poblaciones: Valerio Trujano y Tlayahualco; el segundo grupo lo conforman las

poblaciones Zicuitaro e Infiernillo; el tercero la población Tehuiztzingo que fue la más distante. El patrón de diferenciación se correlaciona con la distribución geográfica.

El tercer grupo está constituido por la población Tlayahualco (Gro) de *C. hintonii* y por *C. melanadenia* (Pue). Las poblaciones de *C. hintonii* no quedan juntas. El patrón de diferenciación encontrado para este análisis no muestra correlación con la distribución geográfica.

DISCUSION

Diversidad genética.

Los valores de heterocigosis para las tres especies son mayores al valor promedio encontrado para especies de árboles tropicales ($H= 0.177$; Hamrick, 1983) y de leguminosas (Cuadro 8, $H=0.166$). Los valores de polimorfismo de las tres especies se encuentran por arriba del valor promedio reportado en especies con apareamiento mixto y polinizadas por animales ($P=0.29$; Hamrick, 1983); y son mayores que el promedio encontrado (0.362) para especies raras y endémicas reportadas en literatura (Cuadro 9, las especies poseen por lo menos una característica similar a las especies del presente estudio).

Se ha postulado que las especies con una distribución geográfica amplia poseen generalmente, mayor variabilidad genética que las especies con distribuciones restringidas (Karron, 1987, 1997). Si comparamos los valores de heterocigosis para las tres especies se aprecia que *C. hintonii* posee menor variabilidad (0.249) que *C. macvaughii* (0.260) y *C. melanadenia* (0.268) cuyo rango de distribución es más restringido.

Dado que *C. macvaughii* y *C. melanadenia* son endémicas, se podría esperar que tuvieran escasa variación genética lo cual no se observa. Esto sugiere que las especies no han sufrido efectos importantes por deriva génica o endogamia, lo que las conduciría eventualmente a una disminución en la variación genética.

Por otro lado, la diferencia encontrada en los valores de heterocigosis de las poblaciones de *C. hintonii* podrían estar influenciados por su historia de vida; de las cinco poblaciones, la de Zicúitaro es la que mayor número poblacional presenta (≈ 100 individuos), tiene mayor número de semillas por legumbre; es la especie dominante en la

región, a su lado sólo crecen algunas herbáceas y presenta menor grado de daño por herbívoros.

El 42.1% de las enzimas de todas las poblaciones de *C. hintonii* presentan un nivel de variación semejante a la diversidad genética multilocus. Esta contribución desigual a la diversidad genética promedio sugiere que debe utilizarse un mayor número de loci para obtener una estimación más real de este parámetro (Layton y Ganders, 1984; Coello y Escalante, 1989).

Frecuencias alélicas.

El análisis de las frecuencias genotípicas reveló que algunos loci de las especies estudiadas no están en equilibrio de Hardy-Weinberg, lo anterior también puede observarse a través de los índices de fijación, los cuales (en su mayoría) fueron positivos y significativamente distintos de cero.

La presencia de alelos distintivos en ciertas poblaciones aisladas geográficamente, sugiere una diferenciación genética causada por deriva génica y/o selección natural en *C. hintonii*.

En la literatura se han reportado alelos distintivos para distintas especies, subespecies y poblaciones como las del género *Layia* (Warwick y Gottlieb, 1985), *Phaseolus* (Coello y Escalante, 1989; Jaaska, 1996), *Vicia bengalensis* (Sonnante *et al.*, 1997) *Faidherbia albida* (Harris *et al.*, 1997), *Achmea magdalenae* (Murawski y Hamrick, 1990), *Hymenopappus* y *Lupinus* (Babbel y Selander, 1974).

Cuadro 8.- Valores de polimorfismo (P), número de alelos por locus (A) y heterocigosis observada (Ho) para especies de leguminosas reportadas en literatura.

| Especie | N° de loci | P | A | Ho | Referencia |
|---|------------|--------|-------|--------|-------------------------------|
| <i>Acacia melanoceros</i> | 33 | 30.3 | - | 0.107 | Hamrick y Murawski, 1991 |
| <i>Baptisia leucophaea</i> | 5 | 87.8 | 1.72 | 0.407 | Scogin, 1969 |
| <i>Baptisia nuttaliana</i> | 5 | 20.0 | 1.20 | 0.275 | Scogin, 1969 |
| <i>Baptisia sphaerocarpa</i> | 5 | 60.0 | 1.60 | 0.280 | Scogin, 1969 |
| <i>Calliandra calothyrsus</i> | 23 | 20.46 | 1.22 | 0.057 | Chamberlain, 1998 |
| <i>Dipterix panamensis</i> | 31 | - | 1.34 | 0.074 | Hamrick y Loveless, 1986a |
| <i>Enterobium schomburgkii</i> | 29 | 27.6 | - | 0.122 | Hamrick y Murawski, 1991 |
| <i>Erythrina costaricensis</i> | 44 | 68.3 | - | 0.205 | Hamrick y Loveless, 1986a |
| <i>Faidherbia albida</i> | 6 | 31.7 | 1.6 | 0.095 | Harris <i>et al.</i> , 1997 |
| <i>Gleditsia triacanthos</i> | 27 | 62 | 2.20 | 0.199 | Schnabel y Hamrick, 1990 |
| <i>Inga minutula</i> | 25 | 68.0 | - | 0.240 | Hamrick y Murawski, 1991 |
| <i>Lupinus nanus</i> | 2 | 50 | 1.50 | 0.241 | Scogin, 1973 |
| <i>Lupinus subcarnosus</i> | 6 | - | 1.84 | 0.0966 | Babbel y Selander, 1974 |
| <i>Lupinus texensis</i> | 6 | - | 3.12 | 0.3559 | Babbel y Selander, 1974 |
| <i>Myrospermum frutescens</i> | 37 | 76 | - | 0.257 | Hamrick y Murawski, 1991 |
| <i>Phaseolus coccineus (silvestres)</i> | 12 | - | 1.97 | 0.193 | Coello y Escalante, 1989 |
| <i>Phaseolus coccineus</i> | 5 | 19.3 | 1.18 | - | Wall J. R. y Wall S. W., 1975 |
| <i>Phaseolus coccineus (cultivados)</i> | 12 | - | 1.83 | 0.159 | Coello y Escalante, 1989 |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> | 5 | 18.6 | 1.20 | - | Wall J. R. y Wall S. W., 1975 |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> | 12 | - | 1.08 | 0.024 | Coello y Escalante, 1989 |
| <i>Platypodium elegans</i> | 38 | 67.9 | - | 0.251 | Hamrick y Loveless, 1986a |
| <i>Schizolobium parahybum</i> | 32 | 34.4 | - | 0.091 | Hamrick y Murawski, 1991 |
| <i>Swarzia simplex var. grandiflora</i> | 30 | - | 1.98 | 0.203 | Loveless y Hamrick, 1987 |
| <i>Swarzia simplex var. ochracea</i> | 36 | 75.9 | 2.34 | 0.272 | Loveless y Hamrick, 1987 |
| <i>Tlachigalia versicolor</i> | 31 | 29.6 | - | 0.073 | Hamrick y Loveless, 1986a |
| <i>Vicia benghalensis</i> | 15 | 87 | 2.67 | 0.049 | Sonnante <i>et al.</i> , 1997 |
| Media | 19.692 | 35.956 | 1.215 | 0.166 | |

El aislamiento geográfico que presentan las distintas poblaciones y especies de *Caesalpinia*, así como la heterogeneidad ambiental a lo largo de la Depresión del Río Balsas, podrían explicar la presencia de alelos diagnósticos.

Van Dijk y Van Delden (1981) encontraron también alelos diagnósticos en dos subespecies de *Plantago major* y sugieren dos hipótesis para explicar este hecho. Por un lado la presencia de algún tipo de aislamiento, ya sea geográfico o genético; y por otro lado,

el posible ligamiento de estos loci enzimáticos con otros loci relacionados con la adecuación a ambientes específicos.

Cuadro 9- Valores de Polimorfismo para especies endémicas reportados en literatura.

| Especie | Nº de loci | % de loci P | Promedio de loci P | Referencia |
|-----------------------------------|------------|--------------|--------------------|---|
| <i>Astragalus linifolius</i> | 13 | 23.1 | 2.3 | Karron, 1987 |
| <i>Astragalus osterhoutii</i> | 13 | 15.4 | 2.5 | Karron, 1987 |
| <i>Capsicum cardenasii</i> | 24 | 25 | 2.2 | McLeod <i>et al.</i> , 1983 |
| <i>Clarkia franciscana</i> | 13 | 7.7 | 2.0 | Gottlieb, 1973 |
| <i>Eucalyptus caesia</i> | 18 | 38.8 | 2.1 | Moran y Hopper, 1983 |
| <i>Gaura demareei</i> | 18 | 27.8 | 3.0 | Gottlieb y Pilz, 1976 |
| <i>Layia discoidea</i> | 21 | 90.5 | 3.1 | Gottlieb <i>et al.</i> , 1985 |
| <i>L. habuensis</i> | 12 | 8.3 | 2.0 | Sytsma y Schaal, 1985 |
| <i>L. jefensis</i> | 12 | 16.7 | 2.0 | Sytsma y Schaal, 1985 |
| <i>L. jonesii</i> | 17 | 64.7 | 3.0 | Warwick y Gottlieb, 1985 |
| <i>L. leucoppa</i> | 17 | 58.8 | 3.2 | Warwick y Gottlieb, 1985 |
| <i>L. macounii</i> | 18 | 11.1 | 2.0 | Kesseli y Jain, 1984 |
| <i>L. peduncularis</i> | 12 | 33.3 | 2.0 | Sytsma y Schaal, 1985 |
| <i>L. vincularis</i> | 17 | 41.2 | 3.0 | Kesseli y Jain, 1984 |
| <i>L. munzii</i> | 17 | 52.9 | 3.2 | Warwick y Gottlieb, 1985 |
| <i>Limnanthes bakeri</i> | 19 | 36.8 | 2.3 | Kesseli y Jain, 1984 |
| <i>Lissianthus aurantiacus</i> | 12 | 33.3 | 2.0 | Sytsma y Schaal, 1985 |
| <i>Oenothera organensis</i> | 15 | 6.7 | 2.0 | Levin <i>et al.</i> , 1979 |
| <i>Pinus longaeva</i> | 14 | 78.6 | 2.6 | Hiebert y Hamrick, 1983 |
| <i>Pinus balfouriana</i> | 23 | 57.6 | 2.1 | Hiebert y Hamrick <i>et al.</i> 1981; citado en Hiebert y Hamrick, 1983 |
| <i>Pinus radiata</i> | 22 | 45.4 | 2.2 | Moran <i>et al.</i> , 1980 |
| <i>Pinus rzedowskii</i> | 14 | 46.8 | - | Delgado, 1996 |
| <i>Pinus torreyana</i> | 59 | 45.4 | 2.0 | Ledig y Conkle, 1983 |
| <i>Stephanomeria malheurensis</i> | 25 | 3.4 | 2.0 | Gottlieb, 1979 |
| Media | 18.541 | 36.2 (0.362) | 2.283 | |

Entrecruzamiento, endogamia e índices de Fijación.

Los valores promedio de F encontrados en las poblaciones de *C. hintonii* son mayores que el valor promedio reportado para especies de árboles, arbustos y coníferas (0.07; Eguiarte, 1990) excepto para la población Infiernillo donde es más bajo (0.013); el déficit de heterocigotos es mucho más alto de lo esperado por azar, lo que nos sugiere cierto grado de endogamia en las poblaciones. Esta deficiencia puede ser debida al efecto de varias fuerzas evolutivas como selección natural, deriva génica y sistemas reproductivos (Nei, 1987). En las otras dos especies también son más bajos (valores negativos) lo que nos muestra exceso de heterocigos.

Un exceso en el número de homocigos puede deberse a una gran variedad de causas: efecto Walhund, apareamiento preferencial entre genotipos similares, selección de homocigos y estructura familiar con vecinos restringidos lo que ocasiona apareamientos entre individuos relacionados. Mientras que un exceso de heterocigos puede resultar de un apareamiento entre genotipos diferentes y selección favoreciendo al heterocigo (El-Kassaby *et al.*, 1987).

La tasa de entrecruzamiento baja de la población Valerio Trujano nos indica que la población lleva a cabo eventos de autofecundación con cierta frecuencia (45%); una de las consecuencias de la autofertilización es la depresión por endogamia; existen numerosas evidencias del efecto negativo de ésta en las poblaciones naturales (van Treuren *et al.*, 1991). La endogamia tiende a mantener ligamiento genético entre caracteres y así el genotipo detectado por un marcador molecular puede estar asociado con el genotipo de los genes que controlan un carácter morfológico (Price *et al.*, 1984; Hamrick *et al.*, 1991). El

sistema de apareamiento pareciera jugar un papel determinante en los patrones de variación genética encontrados.

Estadísticos F de Wright.

Los valores obtenidos para los estadísticos F_{it} y F_{st} son mayores que el promedio encontrado para especies endémicas reportados en literatura (Cuadro 10); el valor de F_{is} se encuentra por arriba del encontrado para la leguminosa endémica *Astragalus linifolius* (0.25, Karron, 1987); es menor al encontrado en la especie de selva seca *Bursera cuneata* (0.251; Del Valle, 1996) y de las leguminosas *Calliandra calothyrsus* (0.238; Chamberlain, 1998) y *Faidherbia albida* (0.236; Harris *et al.*, 1997). Las tres últimas especies son de amplia distribución.

El valor de F_{st} alto, indica que *Caesalpinia hintonii* se encuentra estructurada genéticamente. Wendel y Weeden (1989) encontraron que el mayor grado de estructuración genética se observaba en las especies cuyas semillas son transportadas por animales ($F_{st} = 0.398$) y que poseen frutos explosivos ($F_{st} = 0.262$); esas características las poseen las tres especies, además de que son polinizadas por animales ($F_{st} = 0.187$).

El valor encontrado para la F_{st} es mayor al promedio reportado para árboles tropicales (0.119; Hamrick y Godt, 1990), especies endémicas (0.071) y la leguminosa *Faidherbia albida* (0.158, Harris *et al.*, 1997).

Es menor al promedio reportado para leñosas de vida larga (0.084; Hamrick *et al.*, 1981) y para las leguminosas de amplia distribución, *Calliandra calothyrsus* (0.802, Chamberlain, 1997) y *Vicia benghalensis* (0.796; Sonnante *et al.*, 1997).

Cuadro 10- Valores de los estadísticos F de Wright reportados en literatura para especies raras o endémicas.

| Especie | Nº de loci | Fis | Fst/Gst | Fit | Referencia |
|-------------------------------|------------|---------|---------|-------|------------------------------|
| <i>Astragalus linifolius</i> | 2 | 0.25 | 0.06 | 0.229 | Karron <i>et al.</i> , 1988 |
| <i>A. oosteerhouti</i> | 1 | 0.06 | 0.14 | 0.19 | Karron <i>et al.</i> , 1988 |
| <i>Eucalyptus caesia</i> | - | - | 0.315 | - | Hamrick, 1987 |
| <i>Lisianthus aurantiacus</i> | 5 | -0.207 | - | - | Sytsma y Schaal, 1985 |
| <i>L. habuensis</i> | 1 | -0.111 | - | - | Sytsma y Schaal, 1985 |
| <i>L. jefensis</i> | 2 | 0.507 | - | - | Sytsma y Schaal, 1985 |
| <i>L. pedicularis</i> | 4 | 0.058 | - | - | Sytsma y Schaal, 1985 |
| <i>Oenothera organensis</i> | 1 | -0.132 | 0.09 | 0.03 | Levin <i>et al.</i> , 1979 |
| | | (hijos) | | | |
| <i>Washingtonia filifera</i> | 8 | -0.007 | 0.038 | 0.017 | McClenaghan y Bauchamp, 1986 |
| Media | 2.66 | 0.046 | 0.071 | 0.051 | |

Un elevado nivel de diferenciación en las poblaciones puede deberse a escaso flujo génico y a considerable deriva génica o a la acción de otras fuerzas evolutivas (Van Dijk *et al.* 1988). La diferenciación entre poblaciones ocurre principalmente debido a la selección basada en diferencias ambientales entre sitios, es poco probable por tanto ver mucha diferenciación con marcadores genéticos moleculares como las isoenzimas (Furnier, 1997).

En contraste, la selección tiene un efecto diferencial entre los distintos alelos isoenzimáticos, es decir, la sustitución de un alelo por otro no afecta (o casi no) la adecuación de la planta. Así es que aunque la diferenciación interespecífica para las isoenzimas no sea tan grande entre las poblaciones, la selección estaría diferenciando las poblaciones con respecto a caracteres morfológicos de importancia adaptativa.

Caracteres como el tamaño de la semilla, la tasa de crecimiento, la resupinación de las flores o la presencia de mayor o menor número de glándulas pueden afectar fuertemente

la sobrevivencia y éxito reproductivo. Por ello, los caracteres morfológicos distintivos entre poblaciones encontrados por Contreras (1991) pueden ser de gran importancia adaptativa y probablemente estar afectados por selección.

Flujo génico y aislamiento por distancia.

Wright (citado en Eguiarte, 1990) señala que se debe esperar poca diferenciación genética entre sitios si el valor de N_{em} es mayor que 1. Kimura (1983) sugiere que en algunas condiciones se puede encontrar diferenciación genética entre sitios, aunque la N_{em} tome valores de alrededor de 5.

El valor obtenido del flujo génico es menor que uno por lo que podríamos decir que las poblaciones de *C. hintonii* se están comportando como unidades evolutivas independientes. Ahora, ¿cuánto flujo génico se necesita para impedir la evolución independiente en diferentes poblaciones locales?, depende de que otras fuerzas estén actuando. Si N_{em} es mucho mayor que uno, el flujo génico sobrepasa los efectos de la deriva y evita la diferenciación local, y si es menor que uno (nuestro caso) la deriva actúa de manera independiente en cada población.

El flujo génico y la diferenciación entre poblaciones puede explicarse considerando las observaciones hechas por Rabinowitz (citado en Cornejo, 1998) quien estableció que las plántulas migran cerca de la planta madre y que los eventos de colonización a gran distancia son esporádicos. Si los propágulos migrantes provienen de poblaciones cercanas, entonces el bajo flujo génico que pueda darse entre poblaciones no disminuye los efectos de la deriva e incrementa la diferenciación poblacional.

Los factores que propician o impiden el flujo de genes podrían ser trascendentales en los parámetros genéticos medidos para estas poblaciones de *C. hintonii*. Los factores que promueven el flujo de genes (e.g. exogamia, polinización por aire o por insectos o la dispersión de semillas a gran distancia) o que intensifican la supervivencia o la multiplicación de genes en una población (e.g. perennidad, reproducción repetitiva, latencia de semillas), disminuyen la variación entre las poblaciones (Loveless y Hamrick, 1984).

Loveless y Hamrick (1987), observaron que en especies de plantas tropicales la dispersión del polen o semillas por medio de animales no genera tanto movimiento de genes como se ha pronosticado.

Respecto a el flujo génico por pares de poblaciones no podemos considerarlo intenso para los pares Tehuiztingo-Infiernillo y Valerio Trujano-Infiernillo pues los valores son menores que uno. Los resultados señalan que en *C. hintonii* no existe un patrón claro de aislamiento por distancia; es decir, el flujo génico no disminuye conforme aumenta la distancia geográfica.

Probablemente podemos tener fuentes de sesgo en el cálculo de nuestro valor de N_{em} , lo que nos lleva a subestimarlos (Slatkin, 1985). Los sesgos, pueden ser producto de un bajo número de loci muestreados para obtener una buena estimación del parámetro, pero no existe un consenso que nos indique cuál es el número mínimo de loci a muestrear; otro aspecto potencial de sesgo es la selección natural que puede favorecer alelos o loci que confieren adaptaciones locales y como consecuencia un alto sesgo en la estimación de N_{em} (Del Valle, 1996).

Distancias genéticas y fenogramas.

Esperaríamos encontrar una relación entre el valor de F_{st} y las distancias genéticas para las poblaciones de *Caesalpinia hintonii*, lo cual no ocurre. Niklas (1997) encontró que no existe correlación entre la distancia genética y la estructuración de las poblaciones, puede ser que se encuentren distancias genéticas grandes y valores de F_{st} pequeños o viceversa.

El encontrar que poblaciones distantes se parecen más entre sí que las poblaciones cercanas no es exclusivo de este estudio. Chamberlain (1998) al analizar 17 poblaciones de *Calliandra calothyrsus* encuentra que poblaciones kenianas e indonesias de la especie se parecen más genéticamente a una población de Centroamérica, que ésta última con las de su propio país.

Por su parte Harris *et al.* (1997) al analizar 30 poblaciones de *Faidherbia albida* en toda África también encuentran que poblaciones distantes se parecen más entre ellas que con las cercanas (*e.g.* población de Namibia más cercana genéticamente con Zimbabwe).

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

El análisis fenético realizado en este trabajo no logra separar a las poblaciones de *C. hintonii* en los tres grupos ya diferenciados morfológicamente que se mencionan en el capítulo uno; es decir, las características morfológicas usadas en la clasificación botánica no son evidenciadas por las isoenzimas

Los índices de similitud entre poblaciones y especies nos muestran que las diferencias genéticas son pequeñas, y que probablemente las tres especies conforman una sola unidad o bien que el proceso de especiación aún es reciente. Las causas que pueden estar detrás de este patrón pueden ser variadas y de diferente naturaleza.

La divergencia genética entre subespecies o variedades es el resultado de diversos factores como lo son la reproducción, la dispersión a distancia del polen y semillas o bien por la reciente separación en subespecies (Hamrick *et al.*, 1981). En la mayoría de los casos, poblaciones conespecíficas, variedades o subespecies exhiben elevados valores de identidad genética, en algunos casos las “entidades” pueden reconocerse a nivel morfológico (Crawford, 1983). La identidad genética entre las cinco poblaciones de *C. hintonii* se encuentran dentro del intervalo esperado para poblaciones conespecíficas (Crawford, 1983). Las identidades entre los taxa *C. hintonii* y *C. macvaughii* es alto y también se encuentra dentro de lo observado en especies estrechamente relacionadas.

Las distancias genéticas entre taxa, aunque bajas, sugieren un proceso de aislamiento genético y un proceso de especiación reciente mediado tal vez por la existencia de barreras reproductivas, (aunque tales barreras no siempre son efectivas), y el aislamiento geográfico (Levin, 1993). Para Nelson Papavero (com. pers.) el simple aislamiento geográfico de las poblaciones en *C. hintonii* es suficiente para separar a los tres grupos diferenciados geográficamente como especies.

Sonnante *et al.* (1997) al analizar 25 muestras de *Vicia benghalensis* sugieren la existencia de dos grupos genéticamente diferenciados denotando un proceso de especiación reciente; lo que concordaba con los resultados morfológicos y citológicos; aún así no se atrevieron a separarla tajantemente en dos especies.

Respecto al segundo análisis realizado, el hecho de que la especie *C. macvaughii* se intercale con las poblaciones de *C. hintonii* no es sencillo explicarlo, probablemente se deba a la disminución en el número de loci empleados para tal análisis. Las confusiones respecto a lo anterior no son exclusivas del presente estudio (L. Eguiarte, com. pers.).

Crawford *et al.* (1984) analizaron filogenéticamente a tres especies de herbáceas y anuales de Asteraceae (*Calliopsis leawenworthii*, *C. paludosa* y *C. tinctoria*) encontrando que algunas de las especies se parecían tanto o más que algunos pares de poblaciones de cada especie. Cabe mencionar que para estas especies de Asteraceae se habían efectuado revisiones exhaustivas y se consideraban como taxa distintos.

Para concluir podríamos decir que las Caesalpinoideae son plantas propensas a la hibridación como lo demuestra el estudio sobre *Caesalpinia* de Lewis (1994), y los estudios sobre la sistemática de los géneros *Parkinsonia* y *Cercidium* (Hawkins, 1996; Hawkins y Contreras, en prensa); lo que probablemente complica establecer las relaciones fenéticas en el grupo.

Perspectivas de estudio.

Para resolver las relaciones filogenéticas en estas especies es necesario reunir información sobre otros aspectos. En este sentido sería importante utilizar un mayor número de loci, hacer un análisis morfométrico detallado (que no existe), conocer las variaciones en las características de la historia de vida entre poblaciones y especies así como, el uso de otro marcador molecular como ADN de cloroplasto (cpDNA).

Debiera incluirse en el estudio a la especie *Caesalpinia epifanioi*, que se encuentra entre las poblaciones Tlayahualco y Valerio Trujano, esta al parecer es un híbrido entre *C. melanadenia* y *C. hintonii*; lo que nos aportaría mayor información sobre las relaciones del grupo y la manera en que las radiaciones adaptativas se están dando. Además de lo anterior, es necesaria una revisión taxonómica exhaustiva (realizada por taxónomos) entre *C. hintonii* y *C. macvaughii* para reconsiderar el hecho de que se les considere taxa distintos.

CONCLUSIONES

- Los niveles de variación encontrados en las tres especies de *Caesalpinia* son altos con respecto al promedio encontrado en otras especies árboles tropicales, dispersadas por animales y con los reportados para especies endémicas. Contrario a lo que se esperaría, las especies con distribución geográfica restringida *C. macvaughii* y *C. melanadenia*; exhibieron niveles considerables de variación.
- La F_{st} y los valores de N_{em} indican estructuración genética entre las poblaciones de *C. hintonii*, lo que sugiere bajo flujo génico y la acción de deriva génica; las poblaciones se están comportando como unidades evolutivas independientes. El valor de F_{st} es mayor al encontrado en otras especies endémicas.
- La distribución geográfica no resultó buen indicador de la variación genética en éstas especies.
- Las poblaciones de *C. hintonii* no siguen el patrón de aislamiento por distancia.
- A través de la técnica de electroforesis no se pudo separar a las poblaciones de *C. hintonii* en los tres grupos morfológicos ya diferenciados.

REFERENCIAS

- AVISE, J. C., 1974: Systematic value of electrophoretic date. -Syst. Zool. 23: 465-481.
- BABEL, G. R., SELANDER, R., 1974: Genetic variability in edaphically restricted and widespread plant species.- Evolution 28: 619-630.
- BARRET, S. C. H., HUSH, B. C., 1990: The genetics of plant migration and colonization.- In BROWN, A.D. H., CLEGG, M. T., KAHLER, A.L., WEIR, B. S.(Eds): Plant population genetics, breeding and genetic resources, pp 254-277. -Sunderland, MA: Sinauer.
- BARRETT, S. C. H., KOHN, J. R., 1991: Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants implications for conservation.- In. FALK, D. A., HOLSINGER, K. E. (Eds): Genetic and conservation of rare plants, pp. 2-30.- Center for plant conservation, New York: Oxford University Press.
- BAWA, K. S., ASHTON, P. S., 1991: Conservation of rare trees in tropical rain forest: a genetic perspective.- In FALK, D. A., HOLSINGER, K. E. (Eds): Genetic and conservation of rare plants pp. 62-71.- Center for plant conservation, New York: Oxford University Press.
- BERISTAIN, O. O., VALIENTE-BANUET, A., DÁVILA, P., MEDINA, R., 1996: Tipos de Vegetación y diversidad β en el Valle de Zapotitlán de las Salinas, Puebla, México. - Bol. Soc. Bot. México 59: 35-58.

- BRADSHAW, A. D., 1984: The importance of evolutionary ideas in ecology and visceversa.- In HORROCKS, B. (Ed): Evolutionary ecology, pp 1-25.- Oxford: Blackwell Scientific Publ.
- BROWN, A. D. H., MORAN, G. F., 1981: Isozymes and the genetic resources of forest trees.- In. CONKLE, M. T (Ed): Proceedings of the Symposium on Isozymes of North American Forest Trees and Forest Insects, pp. 1-10.- Gen Tech. Rep. PSW-48. Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, Forest Service, U.S. Department of Agriculture.
- BUTH, D. G., 1984a: Allozymes of the cyprinid fishes: Variation and application.- In TURNER, B.J. (Ed): Evolutionary genetics of fishes, pp 561-590. New York: Plenum.
- BUTH, D. G., 1984b: The application of electrophoretic data in systematics studies.- Ann. Rev. Ecol. Syst. 15: 501-522
- CHAMBERLAIN, J. R., 1998: Isozyme variation in *Calliandra calothyrsus* (Leguminosae): its implications for species delimitation and conservation. - Am. J. Bot. 85: 37-47.
- CHASE M. R., BOSHIER, D. H., KAMALJIT, S. B., 1995: Population genetic of *Cordia allidora* (Boraginaceae), Neotropical tree. 1 Genetic variation in natural populations. -Am. J. Bot 82: 468-475.
- CHELIAK, W. M., PITEL, J.A., 1984: Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest trees. Information Report PI-X-42. Petawa Nat. Forestry Inst., Canadian Forestry Service.

- CHESSER, R. K., 1983: Genetic variability within and among populations of the black-tailed prairie dog. -*Evolution* 37: 320-331.
- CLEGG, M T., ALLARD, R. W., 1972: Microgeographic variation in allozyme frequencies in *Avena barbata*. -*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 2100-2104.
- COCUCCI A., GALETTO L., SERSIC, A., 1992: El síndrome de *Caesalpinia gillesii* (Fabaceae-Caesalpinioideae).- *Darwiniana* 31: 11-135.
- COELLO C. J. G., ESCALANTE A. M. G., 1989: Estructura genética y determinación de los parámetros del sistema de apareamiento en las poblaciones silvestres y cultivadas de *Phaseolus coccineus*. Tesis (Licenciatura). Facultad de Ciencias. UNAM, México.
- CONCKLE, M T., HODGSKISS, P. D., NUNNALLY, L. B., HUNMTER, S. C., 1982: Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual.- Forest service. General technical report. PSW-64. 18 p
- CONTRERAS, J. L., 1991: Contribución al conocimiento del género *Caesalpinia* (Leguminosae: Caesalpinioideae). Tesis (Licenciatura). Facultad de Ciencias UNAM. México.
- CONTRERAS, J. L., LEWIS, G. P., 1992: A new species of *Caesalpinia* (Leguminosae: Caesalpinioideae) from Mexico.- *Kew Bulletin* 47: 309-313.
- CONTRERAS J. L., AMOR-PRATS, D., GARCÍA-ARGÁEZ, A., PÉREZ-AMADOR, M. C., BRATOEFF, E. A., LABASTIDA, C., 1995: A chromatographic study of flavonoids and fatty acids of four *Caesalpinia* species. -*International Journal of Experimental Botany* 57: 31-35.

- CORNEJO, R. A., 1998: Estructura genética de poblaciones de *Rhizophora mangle* L. (Rhizophoraceae) en el Golfo de México y Mar Caribe. Tesis (Licenciatura). Facultad de Ciencias. UNAM, México.
- COWAN, R. S., 1981: Caesalpinioideae.- In POLHILL, R. M., RAVEN, P. H. (Eds): Advances in legume systematics, Part I pp. 57-63.- UK: Royal Botanic Gardens, Kew.
- COX, G. W., 1997: Genetic changes in small populations. In Conservation biology concepts and applications.- USA: WCB publ. McGraw Hill.
- CRAWFORD, D. J., 1983: Phylogenetic and systematic inferences from electrophoretic studies.- In TANKSELY, S. D., ORTON, T. J. (Eds): Isozymes in plant breeding, Part A, pp 257-287.- Amsterdam: Elsevier.
- CRAWFORD, D. J., 1984: Enzyme electrophoresis and plant systematics.- In Soltis (Ed): Isozymes in plant biology, pp.146-159.- Dioscorides Press.
- CRAWFORD, D. J., 1990: Molecular plant systematics. New York: John Wiley.
- CROW J. F., K., AOKI., 1984: Group selection for polygenic behavior trait: estimating the degree of population subdivision. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81: 6073-6077.
- DÁVILA, A. P., VILLASEÑOR, R. J. L., MEDINA L. R., RAMÍREZ, R. A., SALINAS, T.A., SÁNCHEZ-KEN, J., TENORIO, L. P. 1993: Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. Listados Florísticos de México Instituto de Biología.UNAM, México.

- DELGADO, V. P. 1996: Estructura genética y demografía de una especie del género *Pinus* (*Pinus rzedowskii*) endémica de Michoacán, México. Tesis (Maestría en Ciencias), Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- DEL VALLE, M., 1996: Estructura genética de poblaciones de *Bursera cuneata* (Burseraceae). Tesis (Licenciatura). Facultad de Ciencias. UNAM, México.
- DOYLE, J. J., 1995: DNA date and legume phylogeny: a progress report. In CRISP, M., DOYLE, J. J. (Eds): *Advances in legume systematics 7: Phylogeny*, pp. 11-30.- UK: Royal Botanic Gardens, Kew.
- EGUIARTE, F. L. 1990: Genética de poblaciones de *Astrocaryum mexicanum* Liebm, en Los Tuxtlas, Veracruz. Tesis (Doctorado en Ecología), Centro de Ecología, UNAM.
- EGUIARTE, L. E., PIÑERO, D., 1990: Genética de la conservación: Leones vemos, genes no sabemos. -Ciencias. Número especial 4: 34-47.
- ELLSTRAND, N. C., ELAM, D. R., 1993: Population genetic consequences of small size: Implications for plant conservation. -*Annu. Rev. Ecol. Syst.* 24: 217-242.
- EL-KASSABY, Y. A., MEAGHER, M. D., PARKINSON, J., PORTLOCK, F. T., 1987: Allozyme inheritance, heterozygosity and outcrossing rate among *Pinus monticola* near Ladysmith, British Columbia.- *Heredity* 58: 173-181.
- ENDLER, J. A. 1977: *Geographic variation, speciation, and clines*. New Jersey: Princeton University Press.
- FERGUSON, A. 1980: *Biochemical Systematics and evolution*. London: Blackie and Son, LTD.

- FERRUSQUÍA-VILLAFRANCA, I. 1993: Geology of Mexico: A synopsis.- In RAMAMOORTHY, A. P., BYE, R., LOT, A., FA, J., (Eds): Biological diversity in Mexico, origin and distribution, pp.3-108.- Oxford: Oxford University Press.
- FIEDLER, P. L., 1986: Concepts of rarity in vascular plant species, with special reference to genus *Calochortus* Pursh (Liliaceae).- *Taxon* 35: 502-0518.
- FIEDLER, P. L., J. J. AHOUSE. 1996: Hierarchies of cause: Toward an understanding of rarity in vascular plant species. In FIEDLER, P. L., JAIN, S. E. (Eds) *The theory and practice of nature conservation, preservation and management*, pp 23-47. - New York: Chapman and Hall.
- FOSTER, H. L., 1991: Ecological implications of genetic variation in plant populations.- In FALK, D. A., HOLSINGER, K. (Eds): *Genetic and conservation of rare plants*, pp. 32-44.- New York: Oxford University Press.
- FRELLIN, C., VUILLEUMIER, F., 1979: Biochemical methods an reasoning in systematics.- *Zool. Syst. Evol.* 17: 1-10.
- FURNIER G. R., 1997: Métodos para medir variación genética en las plantas.- In VARGAS J. J. H., BERMEJO, B., LEDIG, T. (Eds): *Manejo de recursos genéticos forestales*, pp. 23-36.- México: USDA Forest Service, FAO y SEMARNAP.
- FUTUYMA, D. J., 1986: *Evolutionary biology*. 2ª edn. MA, Sunderland: Sinauer.
- GARCÍA, O. F., 1991: Influencia de la dinámica del paisaje en la distribución de las comunidades vegetales en la Cuenca del Río Zapotitlán. Puebla.- *Investigaciones geográficas* 23.

- GODT, M. J. W., HAMRICK, J. L. 1993: Genetic diversity and population structure in *Tradescantia mirsuticaulis* (Commelinaceae). -Am. J. Bot. **80** (8): 959-966.
- GOLDBLATL, P. 1981: Cytology and the phylogeny of Leguminosae.- In POLHILL, R. M., RAVEN, P. H. (Eds): Advances in legume systematic, Part 2: 427-463.- Royal Botanic Gardens, Kew.
- GOTTLIEB, L. D. 1973: Enzyme differentiation and phylogeny in *Clarkia franciscana*, *C. rubicunda* and *C. amoena*. -Evolution **27**: 205-214.
- GOTTLIEB, L. D., 1974: Genetic confirmation of the origin of *Clarkia ligulata*.- Evolution **28**: 244-250.
- GOTTLIEB, L. D. 1979: The origin of phenotype in a recently evolved species. In SOLBRIG, O. T., JAIN, S., JHONSON, G. B., RAVEN P. (Eds): Topics in Plant Population Biology, pp 264-268.- Columbia University Press. N. Y.
- GOTTLIEB, L. D. 1982: Conservation and duplication of isoenzymes in plants. - Science **216**: 273-280.
- GOTTLIEB, L. D., G. PILZ. 1976: Genetic similarity between *Gaura longiflora* and its obligately outcrossing derivate *G. demoreii*. Syst. Bot. **1**: 181-187.
- GOTTLIEB, L. D., WARWICK, S. Y., FORD, V. S., 1985: Morphological and electrophoretic divergence between *Layia discoidea* and *L. glandulosa*.- Syst. Bot. **1**: 181-187
- GRAHAM A. 1995. Diversification of Gulf Caribbean mangrove communities through Cenozoic time. Biotropica. **27**: 20-27.

- HAMRICK, J. L., 1983: The distribution of genetic variation within and among natural plant populations. – In SCHONEWALD-COX, C. M., CHAMBERS, S. M., MACBRYDE, B., THOMAS, W. L. (Eds): Genetics and conservation: a reference for managing wild animal and plant populations, pp. 335-348.- Menlo Park, California: Benjamin/ Cummings.
- HAMRICK, J. L., 1987: Gene flow and distribution of genetic variation in plant populations.- In URBANSKA K. M. (Ed): Differentiation patterns in high plants, pp. 53-67.- London Academic Press.
- HAMRICK, J. L., J. W. GODT. 1989. Allozyme diversity in plant species.- In BROWN, A. H. D., CLEGG, M. T., KAHLER A. L., WEIR, B. S (Eds): Population genetics and germplasm resources in crop improvement, pp: 43-63.- Sunderland, MA: Sinauer.
- HAMRICK, J. L., M. D., LOVELESS. 1986a: Isozyme variation in tropical trees: Procedures and preliminary results. -*Biotropica* 18: 201-207.
- HAMRICK, J. L., LOVELESS. M. D., 1986b: The influence of seed dispersal mechanisms on the genetic structure of plant populations.- In ESTRADA, A., FLEMING, T. H. (Eds): Frugivores and seed dispersal, pp. 211-222.- Junk. Publ.
- HAMRICK, J. L., MURAWSKI, D. A., 1991: Levels of allozyme diversity in populations of uncommon Neotropical tree species.- *Journal of Tropical Ecology* 7:395-399
- HAMRICK, J. L., GODT, M. J. W, MURAWSKI, D. A., LOVELESS, M. D., 1991: Correlations between species trait and allozyme diversity: implications for

- conservation biology. In FALK, D. A., HOLSINGER, K. E. (Eds): Genetic and conservation of rare plants, Center for plant conservation, pp.75-85.- Oxford: Oxford University press.
- HAMRICK, J.L., LINHART, .B., MITTON, J. B., 1979: Relationships between life history characteristics and electrophoretically-detectable genetic variation in plant. -Ann. Rev. Ecol. Syst. **10**: 173-200.
- HAMRICK, J. L., MITTON, J. B., LINHART, Y. B., 1981: Levels of genetic variation in trees: influence of life history characteristics. In CONKLE, M. T. (Ed): Proceedings of the symposium on isozymes of North American forest trees and forest insects, pp. 35-41.- Gen Tech. Rep. PSW-48. Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, Forest Service, U.S. Department of Agriculture.
- HARRIS A. S., FAGG, W. C., BARNES, R. D., 1997: Isozyme variation in *Fadherbia albida* (Leguminosae: Mimosoideae). Pl Syst. Evol. **207**: 119-132.
- HARTL, D. L., CLARK, A. G., 1989: Principles of populations genetics. Segunda edición.- Sunderland, MA: Sinauer.
- HAWKINS J. A., 1996: Systematics of *Parkinsonia* L. and *Cercidium* Tul. (Leguminosae: Caesalpinioideae). Tesis (Ph. D.), Faculty of Biological Sciences, University of Oxford. Trinity.
- HEDRICK, P. W., 1983: Genetics of populations. Boston: Science Books International.

- HIEBERT, R. D., HAMRICK, J. L., 1983: Patterns and levels of genetic variation in Great Basin bristlescone pine, *Pinus longaeva*.- *Evolution* 37: 302-310.
- HILLIS, D. M., MORITZ, C., 1996: Molecular Systematics: Context and controversies.- In HILLIS, D. M., MORITZ, C., MABLE; B. K. (Eds): Molecular Systematics, pp. 1-13 - Sunderland, MA: Sinauer.
- HILLIS, D. M., MABLE; B. K, MORITZ, C., 1996: Applications of molecular systematics: The estate of field and look to the future.- In HILLIS, D. M., MORITZ, C., MABLE; B. K. (Eds): Molecular Systematics. - Sunderland, MA: Sinauer.
- HOEY, M. T., PARKS, C. R., 1991: Isozyme divergence between Eastern Asian, North American and Turkish populations of *Liquidambar* (Hamamelidaceae). *Am. J. Bot.* 78: 938-947.
- HOPPER, S. D., COATES, D. J., 1990: Conservation resources in Australia's flora and fauna. -*Proc. Ecol. Soc. Aus* 16: 567-577.
- JAASKA, V., 1996: Isoenzyme diversity and phylogenetic affinities among the *Phaseolus* Beans (Fabaceae).- *Pl. Syst. Evol.* 200 :233-252.
- JIMÉNEZ, R. J. 1979: Estudio Florístico y de la Vegetación en una localidad en la Cuenca Baja del Río Balsas I. Informe mimeografiado. Archivo de la Comisión de Biología de Campo. Facultad de Ciencias. UNAM.
- JIMÉNEZ, R. J. *et al.* 1980: Levantamiento ecológico de la cuenca del río El Zopilote II. Area Xochipala. Informe mimeografiado. Archivo de la Comisión de Biología de Campo. Facultad de Ciencias. UNAM. México, D.F.

- KANTZ, E. K., TUCKER S. C., 1994: Developmental basis of floral characters in the Caesalpinieae.- In FERGUSON, Y. K, TUCKER, S. (Eds): Advances in legume systematics 6: Structural Botany, pp. 33-40.- Royal Botanic Gardens, Kew.
- KARRON, J. D., 1987: A comparison of levels of genetic polymorphism and self-compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners. - *Evol. Ecol.* 1: 47-58.
- KARRON, J. D., GHAULK, B. C. A., ROBERTSON, C. A., 1988: Genetic structure of populations of geographically restricted and widespread species of *Astragalus* (Fabaceae).- *Am. J. Bot* 75:1114-1119.
- KARRON, D. J., 1997: Genetic consequences of different patterns of distribution and abundance.- In KUNIN, W. E., GASTON, K. J. (Eds): The biology of rarity: causes and consequences of rare-common differences, pp 174-189.- London, UK: Chapman and Hall.
- KESSELI, R. V., JAIN, S. K., 1984: New variation and biosystematic patterns detected by allozyme and morphological comparisons in *Limnanthes* sect. *Reflexae* (Limnanthiaceae). -*Plant Syst. and Evol.* 147: 133-165.
- KIMURA, M., 1983: The neutral theory of molecular evolution. Cambridge: Cambridge University Press.
- KITE, G. G., LEWIS G. P., 1994: Chemotaxonomy of seed non protein amino acids in *Caesalpinia* s.l.- In SPRENT, J. J., MCKEY, D (Eds): Advances in legume systematics, Part 5, The nitrogen factor, pp.101-105.- UK: Royal Botanic Gardens, Kew.

- KLUGE, A. G., 1983: Cladistics and the classification of the great apes. -In CIOCKAN, R. L., COROCCINI, R. S. (Eds): *New Interpretations of Ape and Human Ancestry*, pp. 151-177.- New York: Plenum.
- LAYTON, CH. R., GANDERS, F. R., 198: The genetic consequences of contrasting breeding systems in *Plectritis* (Valerianaceae). -*Evolution*. **38**: 1308-1325.
- LEDIG, F. T., CONKLE M. T., 1983: Gene diversity and genetic structure in a narrow endemic, Torrey pine (*Pinus torreyana* Parry ex Carr). -*Evolution* **37**: 79-85.
- LEVENE, H., 1949: On matching problem arising in genetics.- *Ann. Math Stat.* **20**: 91-94
- LEVIN, D. A, RITTER, V., ELLSTRAND, N. C., 1979: Protein polymorphism in the narrow endemic *Oenothera organensis*. -*Evol.* **33**: 534-542.
- LEVIN, D. A. 1993: Local speciation in plants: The rule not the exception. -*Syst. Bot.* **18**: 197-208.
- LEWIS G. P., 1994: Systematic studies in neotropical *Caesalpinia* L. (Leguminosae: Caesalpinioideae), including a revision of the Poincianella-Erythrostemon group. Thesis (D. Ph.) School of Biological and Medical Science. University of St. Andrews.
- LEWIS, G. P., 1998: *Caesalpinia*. A Revision of the Poincianella-Erythrostemon Group. Royal Botanic Gardens, Kew.
- LEWIS, G. P., SCHRIRE. B. D., 1995: A reappraisal of the *Caesalpinia* Group (Caesalpinioideae: Caesalpinieae) using phylogenetic analysis. In CRISP M.,

- DOYLE J. J. (Eds): *Advances in legume systematics 7: Phylogeny*, pp. 41-52.- UK: Royal Botanic Gardens, Kew.
- LEWONTIN, R. C., 1974: *The Genetic Basis of Evolutionary Change*. Columbia University Press, New York.
- LEWONTIN, R. C., 1984: Detecting populations difference in quantitative characters as opposed to gene frequencies.- *Am. Naturalist* **123**: 115-124.
- LEWONTIN, R.C., 1985: *Populations genetics*.- *Annu Rev Genet* **19**: 81-100.
- LI, W.-H., GRAUR, D., 1991: *Fundamentals of molecular evolution*. Sunderland MA: Sinauer.
- LINHART, Y., MITTON, J., STURGEON, K., DAVIS, M., 1981: Genetic variation in space and time in population of ponderosa pine. -*Heredity* **46**: 407-426.
- LISTON A., 1995: Use the polimerase chain reaction to survey for the loss of the inverted repeat in the legume chloroplast genome.- In CRISP, M., DOYLE, J. (Eds): *Advances in Legume Systematics 7: Phylogeny*, pp. 31-40.- UK: Royal Botanic Gardens, Kew.
- LOOMIS, W., 1974: Overcoming problems of phenolics and quinones in the insolation of plant enzymes and organelles. -*Methods in Enzimology*. **3**: 528-544.
- LÓPEZ, H. E. S., 1984: estudio de la Vegetación de Huamuxtitlan, Gro. en la Depresión Oriental del Río Balsas. Tesis (Licenciatura). Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- LOVELESS, M. D., HAMRICK, J. L., 1984: Ecological determinats of genetic structure in plant populations. -*Annu. Rev. Ecol. Syst.* **15**: 65-95.

- LOVELESS, M. D., HAMRICK, J. L., 1987: Distribución de la variación en especies de árboles tropicales.- *Rev. Biol. Trop.* 35: 165-175.
- MCLENAGHAN, L. R., BAUCHAMP, A. C., 1986. Low genetic differentiation among insolated populations of the California fan palm (*Washingtonia fillifera*). -*Evolution* 40: 315-322.
- MCLEOLD, M. J., GUTTMAN, S. Y., ESHBAUH, W. H., RAYLE, R. E., 1983: An electrophoretic study of evolution in *Capsicum* (Solanaceae). -*Evolution* 37: 562-574.
- MORAN, G. F., BELL, J. C., MATHESON, A. C., 1980: The genetic structure and levels of inbreeding in *Pinus radiata* D. Don seed orchard.- *Silvae Genetica* 29: 190-193.
- MORAN, G. F., HOPPER, S. D., 1983: Genetic diversity and the insular population structure of the rare granite rock species, *Eucalyptus caesia* Benth.- *Aust. J. Bot.* 31: 161-172.
- MULLER, G., BARADAT, P. H., BERGMANN, F., 1992: Genetic variation within european tree species.- In ADAMS, W.F., STRAUSS, S. H., DONALD, L. C., Cops, D. L. (Eds): *Populatioin genetics of forest tree*, pp. 23-47.
- MURAWSKI, D. A., HAMRICK, J. L., 1990: Local genetic and clonal structure in the tropical terrestrial bromeliad, *Achmea magdalenae*.- *Amer. J. Bot.* 77:1201-1208.
- MURAWSKI D. A., HAMRICK, J. L., HUBBELL, S. P., FOSTER, R. B., 1990: Mating systems of two Bombacaceus trees of neotropical moist forest.- *Oecologia* 82: 501-506.

- NAGESHWAR, G., RADHAKRISHNAIAH, M., NARAYAMA, L. L., 1984:
Chemotaxonomy of *Caesalpinia*. -Current Science 53: 813-814.
- NAS, 1977: Tropical legumes resources for the future. 331pp. -Washington:
National Academic of Science.
- NEI, M., 1972: Genetic distance between populations.- Am. Nat. 106: 283-292.
- NEI, M., 1978: Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a
small number of individuals.- Genetics, 89: 583-590.
- NEI, M., 1987. Molecular evolutionary genetics. N.Y: Columbia University Press.
- NEVO, E., 1978: Genetic variation in natural populations: patherns and theory. -
Theoret. Pop. Biol. 13: 121-177.
- NEVO, E., KAPLAN, A., GOLENBERG, E. M., OLSUIG-WITTAKER, L.,
NAVVEH, Z., 1986: Natural selection of allozyme polymorphisms: a
microsite test revealing ecological genetic differentiation in wild barley.-
Evolution 40: 13-20.
- NIKLAS, K: J. 1997: The evolutionary biology of plants.- Chicago, USA: The
University of Chicago Press, 449 p.
- OYAMA, K. 1993: Conservation biology of tropical trees: demographic and
genetics considerations. -Evolutionary Trends in Plants 1: 17-32.
- PATTERSON, C., WILLIAMS D. M., HUMPHRIES, C. J., 1993: Convergence
between molecular and morphological phylogenies. -Annu. Rev. Ecol. Syst.
24: 153-188.

- POLHILL, R. M., VIDAL, R.M., 1981: Caesalpinieae.- In Polhill, R. M., y Raven, P.H. (Eds): Advances in legume systematics. Part I, pp. 81-95.- Royal Botanic Gardens, Kew.
- POLHILL, R. M., RAVEN, P. H., STIRTON, C. H., 1981: Evolution and systematics of the Leguminosae. In POLHILL, R. M., RAVEN, P. H. (Eds): Advances in legume systematics. Part I, pp. 1-26.- Royal Botanic Gardens, Kew.
- PRICE, S. C., SCHUMAKER, A. L., ALLARD, R. W., HILL, J. E., 1984: Estimates of population differentiation obtained from enzyme polymorphisms and quantitative characters. J. -Heredity 75: 141-142.
- RABINOWITZ, D., CAIRNS, S., DILLON, T., 1986: Seven forms of rarity and their frequency in the flora of the British isles.-In Soulé M. E. (Ed) Conservation biology, pp. 182-204. - Sunderland, MA: Sinauer.
- RAMIREZ, A., 1994: Proyecto Sierra de Huautla: Una estrategia novedosa. -ICYT 16: 9-10.
- ROGERS, J. S., 1972: Measures of genetic similarity and genetic distance.- Studies in Genet. VII. University of Texas Pub. 7213: 145-153.
- RZEDOWSKI, J., 1978. Vegetación de México.- México: Limusa. 422p.
- RZEDOWSKI, J., 1992a: Diversidad y origen de la flora fanerogámica de México.- In HALFFTER G. (Comp.): La diversidad biológica de Iberoamérica, volumen especial, pp 313-335. Xalapa Veracruz: Acta Zoológica mexicana.
- RZEDOWSKI, J., 1992b: El endemismo en la flora fanerogámica mexicana: Una apreciación analítica preliminar.- In HALFFTER G. (Comp): La diversidad

- biológica de Iberoamérica, volumen especial, pp 337-359. Xalapa Veracruz:
Acta Zoológica mexicana.
- SCHNABEL, A., HAMRICK, J. L., 1990: Organization of genetic diversity within
and among populations of *Gleditsia tricanthos* (Leguminosae). -Am. J. Bot.
78: 1060-1069.
- SCOGIN, R., 1969: Isozyme polymorphism in natural populations of genus *Baptisia*
(Leguminosae). Phytochemistry 8: 1733-1737.
- SELANDER, R. K., CAUGANT, D. A., OCHMAN, H., MUSSER, J. M.,
GILMOUR, M. N., WHITTAM, T. S., 1986: Method multilocus enzyme
electrophoresis for bacterial population genetics and systematics.- Appl. and
Environ. Microbiol. 51: 873-884.
- SIBLEY C. G., AHLQUIST, V., 1987: Avian phylogeny reconstructed from
comparisons of genetic. Molecules and Morphology in Evolution: Conflict
or Compromise ? Cambridge: Cambridge University Press.
- SIMPSON, B. B., MIAO, B. -M., 1997: The circumscription of *Hoffmannseggia*
(Fabaceae, Caesalpinioideae, Caesalpinieae) and allies using morphological
an cpDNA restriction site data. -Pl. Syst. Evol. 205: 157-178.
- SLATKIN, M., 1985: Rare alleles as indicators of gene flow. -Evolution 39: 53-65.
- SLATKIN, M., 1993: Insolation by distance in equilibrium and non-equilibrium
populations. Evolution 47: 264-279.
- SOLTIS, D. E., HAUFER, C. H., DARROW, D. C., GASTONY, G. J., 1983:
Starch gel electrophoresis of ferns a compilation of grinding buffers, gel and
electrode buffers and staining schedules.- Am. Fern J. 73: 9-27

- SOLTIS, D.E., SOLTIS, P. S., 1991: Chloroplast variation within and among genera of the Heuchera group (Saxifragaceae): Evidence for chloroplast transfer and paraphyly.- *Am. J. Bot.* **78**: 1150-11-61
- SOKAL, R. R., MICHENER, C. D., 1956: A statistical method of evaluating systematic relationships.- *Sci. Bull. Univ. Kansas* **28**: 1409-1438
- SOKAL, R. R., ROHLF, F. J., 1981. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*. 2^o Ed - San Francisco: W.H- Freeman.
- SONNANTE G., PIERGIOVANNI, A. R., PIGNONE, D., 1997: Distribution of allozyme variation in *Vicia benghalensis* (Leguminosae) suggest the existence of two gene pools.- *Pl. Syst. Evol.* **207**: 99-110.
- SOUSA M. S., DELGADO, A. S., 1993: Mexican Leguminosae: Phytogeography, endemism, and origins.- In. RAMAMOORTHY, A. P., BYE, R., LOT, A., FA, J (Eds): *Biological Diversity in Mexico, origin and distribution*, pp. 459-511.- Oxford: Oxford University Press.
- SPENCER, C., BARRETT, H., KOHN, J. R., 1991: Genetic and evolutionary consequences of small population size in plant: implications for conservation.- In FALK, D. A., HOLSINGER, K. E. (Eds): *Genetic and Conservation of Rare Plants*. Center for plant conservation pp. 2-30.- Oxford: Oxford University Press.
- SWOFFORD, D. L., OLSEN, G. J., 1990: Phylogeny reconstruction. In. HILLIS, D. M., MORITZ, C. (Eds): *Molecular Systematics*, pp. 411-501.- Sunderland, M.A: Sinauer.

- SWOFFORD, D. L., SELANDER, R. K., 1981. BIOSYS-1 (release 1.7): a computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. User's manual.- Illinois, Chicago: Illinois Natural History Survey.
- SYTSMA, K., B. A. SCHAAL. 1985: Genetic variation, differentiation, and evolution in a species complex of tropical shrubs based on isozymic data. - *Evolution* **34**: 582-593.
- TOLEDO M. C. .A. 1982: El género *Bursera* (Burceraceae) en el estado de Guerrero (México). Tesis (Licenciatura), Facultad de Ciencias , UNAM, México.
- TUCKER S. C., DOUGLAS, A. W., 1994. Ontogenetic evidence and phylogenetic relationships among basal taxa of legumes.- In FERGUSON, I. K., TUCKER, S. (Eds): *Advances in legume systematics 6: Structural Botany*, pp. 11-32.- Royal Botanic Gardens, Kew.
- TUKER, S. C., STEIN, O. L., DERSTINE, K. S., 1985. Floral development in *Caesalpinia* (Leguminosae).- *Amer. J. Bot.* **72**: 1424-1434.
- VALIENTE, B. L., 1991: Patrones de precipitación en el Valle semiárido de Tehuacán, Puebla, México. Tesis (Licenciatura), Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- VAN DIJK, H., VAN DELDEN, W., 1981: Genetic variability in *Plantago* species in relation to their ecology. I. Genetic analysis of allozyme variation in *P. major* subspecies.- *Theor Appl Genet* **60**: 285-290.

- VAN DIJK H., WOLFF, K., DE VRIES, A., 1988: Genetic variability in *Plantago* species in relation to their ecology. -Theor Appl Genet. 75:518-528
- VAN TREUREN, R. 1993: The significance of genetic erosion for the extinction of locally endangered plant populations. Tesis (Ph. D.), Rijksuniversiteit Groningen.
- VAN TREUREN, R., BIJLSMA, R., VAN DELDEN W., OUBORG, N. J., 1991: The significance of genetic erosion in the process of extinction. I. Genetic differentiation in *Salvia pratensis* and *Scabiosa columbaria* in relation to population size. Heredity 66: 181-189.
- VILLASEÑOR, J. L., DÁVILA, P. y CHIANG, F. 1990: Fitogeografía del Valle de TehuacánCuicatlán. -Boletín de la Sociedad Botánica de México 50: 135-149.
- WALL, J. R., WALL, S. W., 1975: Isozyme polymorphisms in the study of evolution in *Phaseolus vulgaris*-*P. coccineus* complex in Mexico.- In Markert, C. L. (Ed): Isozyme V, pp. 287-305.- New York: New York Academic Press.
- WARWICK, S. Y., GOTTLIEB, L. D., 1985: Genetic divergence and geographic speciation in *Layia* (Compositae). -Evolution 39: 1236-1241.
- WENDEL, J. F., WEEDEN, N. F., 1989 Visualization and interpretation of plant isozymes.- IN SOLTIS D. E., SOLTIS, P. S. (Eds). Isozymes in Plant Biology, pp. 5-45. -Portland, Oregon: Dioscorides Press.
- WERTH, C. R., 1985: Implementing an isozyme laboratory at a field station.- Virginia J. Sci 36: 53-76.

- WORKMAN, P. L., NISWANDER, J. L., 1970: Population studies on southwestern Indian tribes II. Local genetic differentiation in *Papago*. -Am J. Hum. Genet. 22: 24-49.
- WRIGHT, S., 1978: Evolution and the genetics of Populations, Vol 4. Variability within and among natural populations.- Chicago, Illinois:University of Chicago Press.
- WYATT, R., 1989: A general protocol of starch gel electrophoresis. Manuscript.
- WYATT, R., 1992. Conservation of rare and endangered bryophytes: Input from population genetics.- Biological conservation. 59: 99-107.
- YEN, F. CH. H., O' MALLEY, D. M., 1980 Enzyme variation in natural populations of Douglas-Fir, *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco from British Columbia: Genetic variation patterns in coastal populations.- Silvae Genetica. 29: 83-92.
- ZHAO, Z., 1996: Documented chromosome numbers 1996:2 miscellaneous USA and Mexican species, mostly Asteraceae.- SIDA 17: 259-263.

APÉNDICE I

Recetas de preparación de sistemas de amortiguación y geles.

Sistema Morfolina-Citratos (Wendel & Weeden, 1989)

- Buffer del electrodo (pH 6.1)

-0.040 M ácido cítrico monohidratado (Baker, 0118-01) _____ 8.41 g
-0.068 M N-(3-aminopropil)-morfolina (Sigma, A-9028) _____ 10 ml aprox.
- H₂O destilada _____ 1000 ml (aforar)

Disolver el ácido cítrico en agua, agregar poco a poco la morfolina hasta llegar a pH 6.1

- Buffer del gel (pH 6.1)

-380 ml de H₂O destilada
-20 ml de Buffer del electrodo

Correr a 60 mA° por 5 horas

- Gel

48 g de almidón (Sigma, S-4501)
12 g de sacarosa (Sigma, S-9378)

Sistema C (Stuber *et al.*, 1988)

- Buffer del electrodo (pH 8.3)

-0.19 M ácido bórico (Baker, 0084-20) _____ 11.875 g
-0.04 M hidróxido de Litio (Sigma, L-4256) _____ 1.60 g
-H₂O destilada _____ 1000 ml

Ajustar el pH a 8.3 con LiOH o ácido bórico.

Correr a 225 volts o a 60m A°, durante 6 horas a 4°C

- Buffer Trizma Base (pH 8.3)

-0.05 M Trizma base (Sigma, T-1503) _____ 6.20 g
-0.007M ácido cítrico monohidratado (Baker, 0118-01) _____ 1.50 g
-H₂O destilada _____ 1000 ml

- Buffer del gel

-360 ml de buffer Trizma Base (pH 8.3)
-40 ml de buffer del electrodo (pH 8.3)

- Gel

-46 g de almidón (Sigma, S-4501)
-12 g de sacarosa (Sigma, S-9378)

APÉNDICE II

Buffer de extracción.

Se prepara mezclando tres partes de buffer Yo y una de buffer Veg II.

Buffer Yo. Yen y O'Malley (1980).

| | |
|------------------------------------|---------|
| Solución Tris-ácido cítrico pH 7.0 | 10 ml |
| NADP (TPN) | 0.05 g |
| NAD (DPN) | 0.05 g |
| Ácido ascórbico | 0.018 g |
| EDTA disódico | 0.034 g |
| Suero de albúmina de bovino | 0.10 g |
| 2-mercaptoetanol | 0.33 ml |

Aforar a 100 ml con H₂O destilada.

Buffer Veg II de Cheliak y Pitel (1984).

| | |
|-----------------------------|---------|
| Ácido bórico | 0.31 g |
| Tergitol | 2 ml |
| PEG 8000 | 2 g |
| PVP 40 | 7 g |
| PVP 360 | 1 g |
| Ácido ascórbico | 0.88 g |
| NAD | 0.02 g |
| Suero de albúmina de bovino | 0.1 g |
| Piridoxal 5-fosfato | 0.005 g |
| Sacarosa | 0.27 g |
| Cisteína-HCl | 0.19 g |
| 2-mercaptoetanol | 0.66 ml |

Aforar a 100 ml con H₂O destilada y ajustar el pH a 7.1 con NaOH.

Solución Tris ácido cítrico

| | |
|---------------|--------|
| Trizma base | 1.57 g |
| Ácido cítrico | 0.83 g |

Aforar a 100 ml con H₂O destilada y ajustar el pH a 7.0

APÉNDICE III

Recetas de tinción de enzimas para *Caesalpinia hintonii*, *C. macvaughii* y *C. melanadenia*.

Caesalpinia hintonii

AcPH (Fosfatasa ácida; C.E. 3.1.3.2)

(Hakim-Elahi, 1976) (2 geles)

Pesar:

Sal granate rápida GBC _____ 0.100 g

Añadir:

Buffer de acetato de sodio 1 M pH 5.0 _____ 6 ml

H₂O destilada _____ 90 ml

MgCl₂ al 10% _____ 1 ml

α-Naftil ácido fosfato (sal de sodio) 1 % _____ 3 ml

Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente.

APX (Peroxidasa anódica; C.E. 1.11.1.7)

(Modificado de Hakim-Elahi, 1976) (1 gel)

Pesar:

3-Amino-9-ethylcarbazole _____ 0.050g

Añadir:

Dimetilformamida _____ 3.5 ml

H₂O destilada _____ 45 ml

Peróxido de hidrógeno al 3% _____ 0.5 ml

Cloruro de Calcio al 1% _____ 1 ml

Acetato de sodio al 1 M pH 5.0 _____ 2.5 ml

Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente

CPX (Peroxidasa catódica; C.E. 1.11.1.17)

(Modificado de Hakim-Elahi, 1976) (1 gel)

Pesar:

3-Amino-9-ethylcarbazole _____ 0.080g

Añadir:

Dimetilformamida _____ 3.5 ml

H₂O destilada _____ 45 ml

Peróxido de hidrógeno al 3% _____ 0.5 ml

Cloruro de Calcio al 1% _____ 1 ml

Acetato de sodio al 1 M pH 5.0 _____ 2.5 ml

EST (Esterasa; C.E. 3.1.1.)

(Modificado de Selander *et al.*, 1986) (1 gel)

Pesar:

Fast blue RR salt _____ 0.050 g

α-Naphthyl acetate _____ 0.025 g

Añadir:

Acetona _____ 2 ml

Disolverlo muy bien y añadir:

Buffer de fosfatos 1 M pH 6.0 _____ 5 ml

H₂O destilada _____ 45 ml

Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente.

GOT (= AAT; Glutamato oxalacetato transaminasa; C. E. 2.6.1.1)

(Wyatt, 1989) (1 gel)

Pesar:

Pyridoxal 5-phosphate _____ 0.004 g

Fast blue BB salt _____ 0.150 g

Añadir:

Tris-HCl 0.2 M pH 7.0 _____ 50 ml

Substrato GOT pH 7.0 _____ 5 ml

Incubar en la obscuridad a 37 °C.

LAP (Leucina aminopeptidasa; C.E 3.4.11.1)

(Modificado de Werth, 1985) (1 gel)

Pesar:

1) Fast Black K salt _____ 0.07 g

Disolverlo muy bien en 5 ml de H₂O destilada justo antes de teñir.

Añadir:

Buffer Tris-Maleato 0.2 M pH 5.2 _____ 50 ml

L- leucina- β- naftilamida-HCl al 2.5% _____ 1 ml

Incubar en la obscuridad a 37 °C durante 30 minutos y posteriormente añadir el Fast Black K salt ya disuelto.

Dejar incubando en la obscuridad a 37 °C hasta que aparezcan las bandas.

MDH (Malato deshidrogenasa; C. E. 1.1.1.37)

(Modificado de Conkle, 1982) (1 gel)

Pesar:

NAD (DPN) _____ 0.007 g

Añadir:

Tris-HCl 0.05 M pH 8 _____ 75 ml

DL-malato pH 7.0 _____ 5 ml

NBT al 1% _____ 1 ml

PMS al 1% _____ 0.5 ml

Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente.

MNR (Menadiona reductasa; C. E. 1.6.99.2)

(Modificado de Conkle *et al.*, 1982) (1 gel)

Pesar:

β-NADH (forma reducida) _____ 0.015 g

Menadiona _____ 0.015 g

Añadir:

Tris-HCl 0.05 M pH 7.0 _____ 75 ml

NBT _____ 1 ml

Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente

PGI (Fosfogluco isomerasa; C. E. 5.3.1.9)
(Modificada de Conkle *et al.*, 1982) (1 gel)

Pesar:

| | |
|------------------------------------|--------|
| D-Fructuosa-6-fosfato sal disódica | 0.20 g |
| Añadir: | |
| Tris-HCl pH 8.0 | 50 ml |
| Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa | 30 u |
| MgCl ₂ al 10% | 1 ml |
| TPN al 1% | 1 ml |
| MTT al 1% | 1 ml |
| PMS al 1% | 0.5 ml |

Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente.

PGM (Fosfoglucomutasa; C.E. 2.7.5.1)
(Soltis *et al.*, 1983) (1 gel)

Pesar:

| | |
|----------------------------------|---------|
| Glucosa-1-fosfato | 0.065 g |
| Glucosa-1-fosfato | 0.060 g |
| Añadir: | |
| Tris-HCl pH 8.0 | 5 ml |
| H ₂ O destilada | 40 ml |
| MgCl ₂ 1M | 1 ml |
| Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa | 30 u |
| TPN (=NADP) al 1% | 1 ml |
| MTT al 1% | 1 ml |
| PMS al 1% | 0.3 ml |

Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente.

RUB (Rubisco, Ribulosa bifosfato carboxilasa; C.E. 4.1.1.39)
(1 gel)

Pesar:

Vaso 1-

Naphtol blue black (NBB) 0.05 g

Agregar la mezcla del vaso 2 al vaso 1. Agitar bien y vaciar sobre el gel.

i) Incubar por una hora a temperatura ambiente.

ii) Quitar la solución del gel sin lavar éste.

ii) Agregar una nueva mezcla del vaso 2

iv) Hacer dos cambios más de 60 minutos cada uno.

Añadir:

Vaso 2-

Ácido acético glacial 5 ml

Metanol 20 ml

H₂O destilada 20 ml

SDH (Shikimato deshidrogenasa; C. E. 1.1.1.25)
(Modificado de Werth, 1985) (1 gel)

Pesar:

| | |
|------------------------------|---------|
| 1) Ácido Shikimico | 0.040 g |
| 2) Agar bacteriológico DIFCO | 0.36 g |

Añadir:

1) Tris-HCl pH 8.0 _____ 25 ml
MgCl₂ al 10 % _____ 1 ml
TPN (=NADP) al 1% _____ 1 ml
MTT al 1% _____ 1 ml
PMS al 1% _____ 0.5 ml
2) Tris-HCl 0.2 M pH 8.0 _____ 25 ml

Calentar hasta que hierva y se disuelva bien el agar, entonces mezclar 1) y 2).
Incubar en la obscuridad a 37 °C.

Caesalpinia melanadenia

AcPH (Fosfatasa ácida; C.E. 3.1.3.2)

(Hakim-Elahi, 1976) (2 geles)

Pesar:

Sal granate rápida GBC _____ 0.150 g

Añadir:

Buffer de acetato de sodio 1 M pH 5.0 _____ 6 ml
H₂O destilada _____ 90 ml
MgCl₂ al 10% _____ 1 ml
α-Naftil ácido fosfato (sal de sodio) 1 % _____ 3 ml

Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente.

APX (Peroxidasa anódica; C.E. 1.11.1.7)

(Modificado de Hakim-Elahi, 1976) (1 gel)

Pesar:

3-Amino-9-ethylcarbazole _____ 0.1g

Añadir:

Dimetilformamida _____ 3.5 ml
H₂O destilada _____ 45 ml
Peróxido de hidrógeno al 3% _____ 0.5 ml
Cloruro de Calcio al 1% _____ 1 ml
Acetato de sodio al 1 M pH 5.0 _____ 2.5 ml

Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente

CPX (Peroxidasa catódica; C.E. 1.11.1.17)

(Modificado de Hakim-Elahi, 1976) (1 gel)

Pesar:

3-Amino-9-ethylcarbazole _____ 0.080g

Añadir:

Dimetilformamida _____ 3.5 ml
H₂O destilada _____ 45 ml
Peróxido de hidrógeno al 3% _____ 0.5 ml
Cloruro de Calcio al 1% _____ 1 ml
Acetato de sodio al 1 M pH 5.0 _____ 2.5 ml

EST (Esterasa; C.E. 3.1.1.)

(Modificado de Selander *et al.*, 1986) (1 gel)

Pesar:

Fast blue RR salt _____ 0.060 g

α -Naphthyl acetate _____ 0.035 g
Añadir:
Acetona _____ 2 ml
Disolverlo muy bien y añadir:
Buffer de fosfatos 1 M pH 6.0 _____ 5 ml
H₂O destilada _____ 45 ml
Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente.

GOT (= AAT; Glutamato oxalacetato transaminasa; C. E. 2.6.1.1)
(Wyatt, 1989) (1 gel)

Pesar:
Pyridoxal 5-phosphate _____ 0.005 g
Fast blue BB salt _____ 0.160 g
Añadir:
Tris-HCl 0.2 M pH 7.0 _____ 50 ml
Substrato GOT pH 7.0 _____ 5 ml
Incubar en la obscuridad a 37 °C.

LAP (Leucina aminopeptidasa; C.E 3.4.11.1)
(Modificado de Werth, 1985) (1 gel)

Pesar:
1) Fast Black K salt _____ 0.1 g
Disolverlo muy bien en 5 ml de H₂O destilada justo antes de teñir.
Añadir:
Buffer Tris-Maleato 0.2 M pH 5.2 _____ 50 ml
L- leucina- β - naftilamida-HCl al 2.5% _____ 1 ml
Incubar en la obscuridad a 37 °C durante 30 minutos y posteriormente añadir el Fast Black K salt ya disuelto.
Dejar incubando en la obscuridad a 37 °C hasta que aparezcan las bandas.

MDH (Malato deshidrogenasa; C. E. 1.1.1.37)
(Modificado de Conkle, 1982) (1 gel)

Pesar:
NAD (DPN) _____ 0.007 g
Añadir:
Tris-HCl 0.05 M pH 8 _____ 75 ml
DL-malato pH 7.0 _____ 5 ml
NBT al 1% _____ 1 ml
PMS al 1% _____ 0.5 ml
Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente.

MNR (Menadiona reductasa; C. E. 1.6.99.2)
(Modificado de Conkle *et al.*, 1982) (1 gel)

Pesar:
 β -NADH (forma reducida) _____ 0.015 g
Menadiona _____ 0.015 g
Añadir:
Tris-HCl 0.05 M pH 7.0 _____ 75 ml
NBT al 1% _____ 1 ml
Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente

PGI (Fosfogluco isomerasa; C. E. 5.3.1.9)
(Modificada de Conkle *et al.*, 1982) (1 gel)

Pesar:

D-Fructuosa-6-fosfato sal disódica _____ 0.30 g

Añadir:

Tris-HCl pH 8.0 _____ 50 ml

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa _____ 30 u

MgCl₂ al 10% _____ 1 ml

TPN al 1% _____ 1 ml

MTT al 1% _____ 1 ml

PMS al 1% _____ 0.5 ml

Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente.

PGM (Fosfoglucomutasa; C.E. 2.7.5.1)
(Soltis *et al.*, 1983) (1 gel)

Pesar:

Glucosa-1-fosfato _____ 0.085 g

Glucosa-1-fosfato _____ 0.080 g

Añadir:

Tris-HCl pH 8.0 _____ 5 ml

H₂O destilada _____ 40 ml

MgCl₂ 1M _____ 1 ml

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa _____ 30 u

TPN (=NADP) al 1% _____ 1 ml

MTT al 1% _____ 1 ml

PMS al 1% _____ 0.3 ml

Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente.

SDH (Shikimato deshidrogenasa; C. E. 1.1.1.25)
(Modificado de Werth, 1985) (1 gel)

Pesar:

1) Ácido Shikímico _____ 0.050 g

2) Agar bacteriológico DIFCO _____ 0.36 g

Añadir:

1) Tris-HCl pH 8.0 _____ 25 ml

MgCl₂ al 10 % _____ 1 ml

TPN (=NADP) al 1% _____ 1 ml

MTT al 1% _____ 1 ml

PMS al 1% _____ 0.5 ml

2) Tris-HCl 0.2 M pH 8.0 _____ 25 ml

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

Incubar en la oscuridad a 37 °C.

RUB (Rubisco, Ribulosa bifosfato carboxilasa; C.E. 4.1.1.39)
(1 gel)

Pesar:

Vaso 1-

Naphtol blue black (NBB) _____ 0.1 g

Agregar la mezcla del vaso 2 al vaso 1. Agitar bien y vaciar sobre el gel.

i) Incubar por una hora a temperatura ambiente.

- ii) Quitar la solución del gel sin lavar éste.
- ii) Agregar una nueva mezcla del vaso 2
- iv) Hacer dos cambios más de 60 minutos cada uno.

Añadir:

Vaso 2-
 Ácido acético glacial _____ 5 ml
 Metanol _____ 20 ml
 H₂O destilada _____ 20 ml

Caesalpinia macvaughii

**AcPH (Fosfatasa ácida; C.E. 3.1.3.2)
 (Hakim-Elahi, 1976) (2 geles)**

Pesar:

Sal granate rápida GBC _____ 0.100 g

Añadir:

Buffer de acetato de sodio 1 M pH 5.0 _____ 6 ml
 H₂O destilada _____ 90 ml
 MgCl₂ al 10% _____ 1 ml
 α-Naftil ácido fosfato (sal de sodio) 1 % _____ 3 ml

Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente.

**APX (Peroxidasa anódica; C.E. 1.11.1.7)
 (Modificado de Hakim-Elahi, 1976) (1 gel)**

Pesar:

3-Amino-9-ethylcarbazole _____ 0.1 g

Añadir:

Dimetilformamida _____ 3.5 ml
 H₂O destilada _____ 45 ml
 Peróxido de hidrógeno al 3% _____ 0.5 ml
 Cloruro de Calcio al 1% _____ 1 ml
 Acetato de sodio al 1 M pH 5.0 _____ 2.5 ml

Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente

**CPX (Peroxidasa catódica; C.E. 1.11.1.17)
 (Modificado de Hakim-Elahi, 1976) (1 gel)**

Pesar:

3-Amino-9-ethylcarbazole _____ 0.090g

Añadir:

Dimetilformamida _____ 3.5 ml
 H₂O destilada _____ 45 ml
 Peróxido de hidrógeno al 3% _____ 0.5 ml
 Cloruro de Calcio al 1% _____ 1 ml
 Acetato de sodio al 1 M pH 5.0 _____ 2.5 ml

**EST (Esterasa; C.E. 3.1.1.)
 (Modificado de Selander *et al.*, 1986) (1 gel)**

Pesar:

Fast blue RR salt _____ 0.060 g

α -Naphthyl acetate _____ 0.035 g
Añadir:
Acetona _____ 2 ml
Disolverlo muy bien y añadir:
Buffer de fosfatos 1 M pH 6.0 _____ 5 ml
H₂O destilada _____ 45 ml
Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente.

GOT (= AAT; Glutamato oxalacetato transaminasa; C. E. 2.6.1.1)
(Wyatt, 1989) (1 gel)

Pesar:
Pyridoxal 5-phosphate _____ 0.005 g
Fast blue BB salt _____ 0.160 g
Añadir:
Tris-HCl 0.2 M pH 7.0 _____ 50 ml
Substrato GOT pH 7.0 _____ 5 ml
Incubar en la obscuridad a 37 °C.

LAP (Leucina aminopeptidasa; C.E 3.4.11.1)
(Modificado de Werth, 1985) (1 gel)

Pesar:
1) Fast Black K salt _____ 0.1 g
Disolverlo muy bien en 5 ml de H₂O destilada justo antes de teñir.
Añadir:
Buffer Tris-Maleato 0.2 M pH 5.2 _____ 50 ml
L- leucina- β - naftilamida-HCl al 2.5% _____ 1 ml
Incubar en la obscuridad a 37 °C durante 30 minutos y posteriormente añadir el Fast Black K salt ya disuelto.
Dejar incubando en la obscuridad a 37 °C hasta que aparezcan las bandas.

MDH (Malato deshidrogenasa; C. E. 1.1.1.37)
(Modificado de Conkle, 1982) (1 gel)

Pesar:
NAD (DPN) _____ 0.007 g
Añadir:
Tris-HCl 0.05 M pH 8 _____ 75 ml
DL-malato pH 7.0 _____ 5 ml
NBT al 1% _____ 1 ml
PMS al 1% _____ 0.5 ml
Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente.

MNR (Menadiona reductasa; C. E. 1.6.99.2)
(Modificado de Conkle *et al.*, 1982) (1 gel)

Pesar:
 β -NADH (forma reducida) _____ 0.015 g
Menadiona _____ 0.015 g
Añadir:
Tris-HCl 0.05 M pH 7.0 _____ 75 ml
NBT al 1% _____ 1 ml
Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente

PGI (Fosfogluco isomerasa; C. E. 5.3.1.9)
(Modificada de Conkle *et al.*, 1982) (1 gel)

Pesar:

D-Fructuosa-6-fosfato sal disódica _____ 0.30 g

Añadir:

Tris-HCl pH 8.0 _____ 50 ml

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa _____ 30 u

MgCl₂ al 10% _____ 1 ml

TPN al 1% _____ 1 ml

MTT al 1% _____ 1 ml

PMS al 1% _____ 0.5 ml

Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente.

PGM (Fosfoglucomutasa; C.E. 2.7.5.1)
(Soltis *et al.*, 1983) (1 gel)

Pesar:

Glucosa-1-fosfato _____ 0.085 g

Glucosa-1-fosfato _____ 0.080 g

Añadir:

Tris-HCl pH 8.0 _____ 5 ml

H₂O destilada _____ 40 ml

MgCl₂ 1M _____ 1 ml

Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa _____ 30 u

TPN (=NADP) al 1% _____ 1 ml

MTT al 1% _____ 1 ml

PMS al 1% _____ 0.3 ml

Incubar en la obscuridad a temperatura ambiente.

SDH (Shikimato deshidrogenasa; C. E. 1.1.1.25)
(Modificado de Werth, 1985) (1 gel)

Pesar:

1) Ácido Shikímico _____ 0.050 g

2) Agar bacteriológico DIFCO _____ 0.36 g

Añadir:

1) Tris-HCl pH 8.0 _____ 25 ml

MgCl₂ al 10 % _____ 1 ml

TPN (=NADP) al 1% _____ 1 ml

MTT al 1% _____ 1 ml

PMS al 1% _____ 0.5 ml

2) Tris-HCl 0.2 M pH 8.0 _____ 25 ml

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

Incubar en la obscuridad a 37 °C.

RUB (Rubisco, Ribulosa bifosfato carboxilasa; C.E. 4.1.1.39)
(1 gel)

Pesar:

Vaso 1-

Naphtol blue black (NBB) _____ 0.1 g

Agregar la mezcla del vaso 2 al vaso 1. Agitar bien y vaciar sobre el gel.

i) Incubar por una hora a temperatura ambiente.

- ii) Quitar la solución del gel sin lavar éste.
- ii) Agregar una nueva mezcla del vaso 2
- iv) Hacer dos cambios más de 60 minutos cada uno.

Añadir:

Vaso 2-

Ácido acético glacial _____ 5 ml
 Metanol _____ 20 ml
 H₂O destilada _____ 20 ml

DL-Malato 1M pH 7.0

(Conkle *et al.*, 1982)

Ácido DL-Málico _____ 134.1 g
 NaOH _____ 80 g
 H₂O _____ 1000 ml
 Ajustar el pH a 7.0 (u 8.0) con NaOH 4N

α-Naftil ácido fosfato al 1%

(Hakim-Elahi, 1976)

α-Naftil ácido fosfato _____ 1 g
 H₂O _____ 50 ml
 Acetona _____ 50 ml

Acetato de sodio 1 M pH 5.0

Acetato de sodio anhidro _____ 82.03 g
 H₂O destilada _____ 1000 ml
 Ajustar el pH con ácido acético.

Buffer de Fosfatos pH 6.0

(Hakim-Elahi, 1976)

Fosfato de potasio dibásico (PM 228.23) _____ 45.6 g
 Fosfato de potasio monobásico (PM 136.09) _____ 109 g
 H₂O destilada _____ 1000 ml

L-Leucil-β-naftilamida-HCl al 2.5%

L-leucil-β-naftilamida-HCl _____ 1 g
 H₂O destilada _____ 40 ml

Substrato GOT pH 7.0

(Wyatt, 1989)

Ácido L-aspártico (4%) _____ 4 g
 Ácido α-cetoglutarico (2%) _____ 2 g
 H₂O destilada _____ 100 ml
 Ajustar el pH a 7.0 con NaOH concentrado (aproximadamente 2.5 g) ó 4N.

Tris-maleato 0.2 M pH 5.2

(Whyatt, 1989)

Tris 7-9 (Sigma, T-1378) _____ 24.2 g
Ácido maleico _____ 23.2 g
H₂O destilada _____ 1000 ml
Ajustar el pH con NaOH (aproximadamente 50 ml al 1M) ó con HCl.

Tris-HCl

1M _____ 121.1 g de Tris (Sigma,T-1378)
0.2M _____ 24.22 g de Tris (Sigma,T-1378)
0.05 M _____ 6.055 g de Tris (Sigma,T-1378)
H₂O destilada _____ 1000 ml
Usar HCl concentrado para ajustar al pH deseado. Primero ajustar y después aforar.

APÉNDICE IV

Georeferencias de las poblaciones y especies muestreadas.

Caesalpinia hintonii

Población 1. Guerrero a 1 Km. por el camino Valerio Trujano-Atzala al O de la carretera México, Acapulco, Puente Mezcala.

Latitud: 17°55'50.9"

Longitud: 99°36'07.9"

Altitud 500 msnm.

Municipio: Eduardo Neri.

Población 2. Guerrero camino a Copalillo-Tlayahualco, cerca de la zona arqueológica de Tlalcozotitlán (Teoponticuanitlán)

Latitud: 17° 50' 30.5"

Longitud: 99° 06' 16.9"

Altitud: 660 msnm

Población 3. Guerrero, Zitacuitaro, en el poblado.

Latitud: 18° 26' 35.2"

Longitud: 100° 51' 40"

Altitud: 300 msnm

Municipio: Coyuca de Catalán

Población 4. Puebla al N de Tehutzingo a orillas del poblado frente al restaurante "Paty"

Latitud: 18°20'15"

Longitud: 98°17'00"

Altitud: 1100 msnm

Población 5

Muestra 1: Km. 24.2 de la carretera a Infiernillo, Michoacán

Latitud: 18° 24' 46.4"

Longitud: 101° 53' 39"

Altitud: 240 msnm

Muestra 2 Km. 20.7 de la carretera a Infiernillo, Michoacán

Latitud: 18° 24' 10.9"

Longitud: 101° 55' 09.2"

Altitud: 300 msnm.

Caesalpinia macvaughii

Muestra 1 El descansadero, a 9 Km. al O de Nueva Italia, por la carretera playa azul.

Latitud: 18° 38' 39.8"

Longitud: 101° 57' 59.6"

Altitud: 450 msnm

Muestra 2

Latitud: 18° 40' 34.3"

Longitud: 101° 59' 20.4"

Altitud 330 msnm

Muestra 3

Latitud: 18° 46' 18.2"

Longitud: 102° 10' 00"

Caesalpinia melanadenia

Jardín Botánico Elena Bravo Hollis; Tehuacán, Puebla

Latitud: 18° 19' 37"

Longitud: 97° 27' 56"

Altitud: 1500 msnm

APÉNDICE V

Frecuencias alélicas calculadas para las tres especies de *Caesalpinia*.

| Loci | Alelo | Tehuiztingo | Tlayahualco | Valerio Trujano | Zicuítaro | Infiernillo | C. | |
|--------|-------|-------------|-------------|-----------------|-----------|-------------|-------------------|--------------------|
| | | | | | | | <i>macvaughii</i> | <i>melanadenia</i> |
| ACPH-1 | 1 | 0.476 | 0.589 | 0.571 | 0.857 | 0.679 | 0.778 | 0.828 |
| | 2 | 0.524 | 0.411 | 0.429 | 0.143 | 0.196 | 0.222 | 0.172 |
| | 3 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.00 | 0.125 | 0.185 | 0.000 |
| ACPH-2 | 1 | 0.000 | 0.433 | 0.538 | 0.250 | 0.255 | - | 0.850 |
| | 2 | 0.190 | 0.467 | 0.096 | 0.068 | - | - | 0.150 |
| | 3 | 0.810 | 0.100 | 0.365 | 0.682 | - | - | 0.000 |
| APX-1 | 1 | 0.188 | 0.217 | 0.115 | 0.383 | 0.019 | 0.185 | - |
| | 2 | 0.708 | 0.650 | 0.827 | 0.317 | 0.426 | 0.815 | - |
| | 3 | 0.104 | 0.133 | 0.058 | 0.300 | 0.556 | 0.000 | - |
| CPX-1 | 1 | 1.000 | 0.220 | 0.517 | 0.679 | 0.532 | - | 0.172 |
| | 2 | 0.000 | 0.700 | 0.414 | 0.321 | 0.468 | - | 0.828 |
| | 3 | 0.000 | 0.080 | 0.069 | 0.000 | 0.000 | - | 0.000 |
| CPX-2 | 1 | 0.132 | - | - | 1.000 | - | - | - |
| | 2 | 0.842 | - | - | 0.000 | - | - | - |
| | 3 | 0.026 | - | - | 0.000 | - | - | - |
| CPX-3 | 1 | 1.000 | 0.984 | 1.000 | 0.600 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| | 2 | 0.000 | 0.016 | 0.000 | 0.400 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| EST-1 | 1 | 0.333 | 0.578 | 0.271 | 0.417 | 0.532 | 0.500 | - |
| | 2 | 0.521 | 0.375 | 0.729 | 0.567 | 0.452 | 0.500 | - |
| | 3 | 0.146 | 0.047 | 0.000 | 0.017 | 0.016 | 0.000 | - |
| EST-2 | 1 | 0.568 | 0.156 | 0.182 | 0.700 | 0.758 | 0.600 | 0.700 |
| | 2 | 0.432 | 0.844 | 0.409 | 0.300 | 0.242 | 0.400 | 0.300 |
| | 3 | 0.000 | 0.000 | 0.409 | 0.00 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| EST-3 | 1 | - | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 0.350 |
| | 2 | - | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.650 |
| GOT-1 | 1 | - | - | - | 1.000 | 1.000 | - | - |
| GOT-2 | 1 | 0.981 | - | 0.966 | 0.667 | 0.613 | - | 0.867 |
| | 2 | 0.019 | - | 0.034 | 0.333 | 0.387 | - | 0.133 |
| LAP-1 | 1 | 0.870 | 0.891 | 0.900 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| | 2 | 0.130 | 0.109 | 0.100 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| MDH-1 | 1 | 0.519 | 0.438 | 0.500 | 0.500 | 0.500 | 0.617 | 0.500 |
| | 2 | 0.481 | 0.563 | 0.500 | 0.500 | 0.500 | 0.383 | 0.500 |
| MNR-1 | 1 | 0.444 | 0.224 | 0.517 | 0.567 | 0.694 | 1.000 | 0.550 |
| | 2 | 0.556 | 0.776 | 0.483 | 0.433 | 0.306 | 0.000 | 0.0450 |
| PGI-1 | 1 | 0.722 | 0.419 | 0.679 | 0.850 | 0.968 | 0.741 | 0.200 |
| | 2 | 0.278 | 0.581 | 0.321 | 0.133 | 0.032 | 0.259 | 0.800 |
| | 3 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.017 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| PGI-2 | 1 | 0.740 | 1.000 | 0.897 | 0.521 | - | - | 1.000 |
| | 2 | 0.260 | 0.000 | 0.103 | 0.479 | - | - | 0.000 |
| RUB-1 | 1 | 1 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| RUB-2 | 1 | 1 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| SDH-1 | 1 | - | - | 0.554 | 0.563 | - | 1.000 | 0.983 |
| | 2 | - | - | 0.497 | 0.438 | - | 0.000 | 0.017 |

Patrones de bandeo de las enzimas ensayadas para las tres especies de *Caesalpinia*.

AcPH.

Monómero. El locus uno se refiere a la fracción catódica y el locus dos a la anódica. En ambos se encontró una zona de actividad definida con tres alelos; para el caso de la fracción catódica se encontró otra zona de menor migración, que no fue consistente y mostraba variación. La población El Infiernillo de *C. hintonii* no presentó AcPH-2 al igual que *C. macvaughii*. El locus uno fue polimórfico para las tres especies mientras que el locus dos resultó polimórfico para *C. melanadenia* y *C. hintonii* (Figura 9A).

APX.

Se encontró un loci polimórfico con tres alelos. Por tratarse de una enzima monomérica los heterócigos presentaban dos bandas. En las poblaciones Valerio Trujano, Tehuiztzingo, Zicuitaro y el Infiernillo se observó una zona variable de menor migración no consistente. Se encontró además un locus variable de mayor migración poco consistente. *C. melanadenia* no presentó esta enzima.

CPX.

En esta enzima se encontraron tres loci con tres alelos cada uno. El locus CPX-1 fue polimórfico, no se presentó en la población Tehuiztzingo de *C. hintonii* y en *C. macvaughii*; CPX-2 también fue polimórfico, sólo se encontró en la población Tehuiztzingo de *C. hintonii*, en donde no se encontraron los genotipos 23 y 33. CPX-3 fue monomórfico y se encontró en todas las poblaciones y especies.

AAT-GOT.

Enzima dímérica; los heterócigos presentaban tres bandas. Esto se debe a que la molécula activa de GOT posee dos subunidades idénticas, y al estar presentes ambos alelos, las cadenas polipeptídicas se combinan entre sí formando una tercera banda con migración intermedia. Hubo dos loci; GOT-1, monomórfico, presente únicamente en las poblaciones Zicuitaro y El Infiernillo de *C. hintonii*. GOT-2, polimórfico, ausente en la población Tlayahualco de *C. hintonii* y en la especie *C. macvaughii*. Las

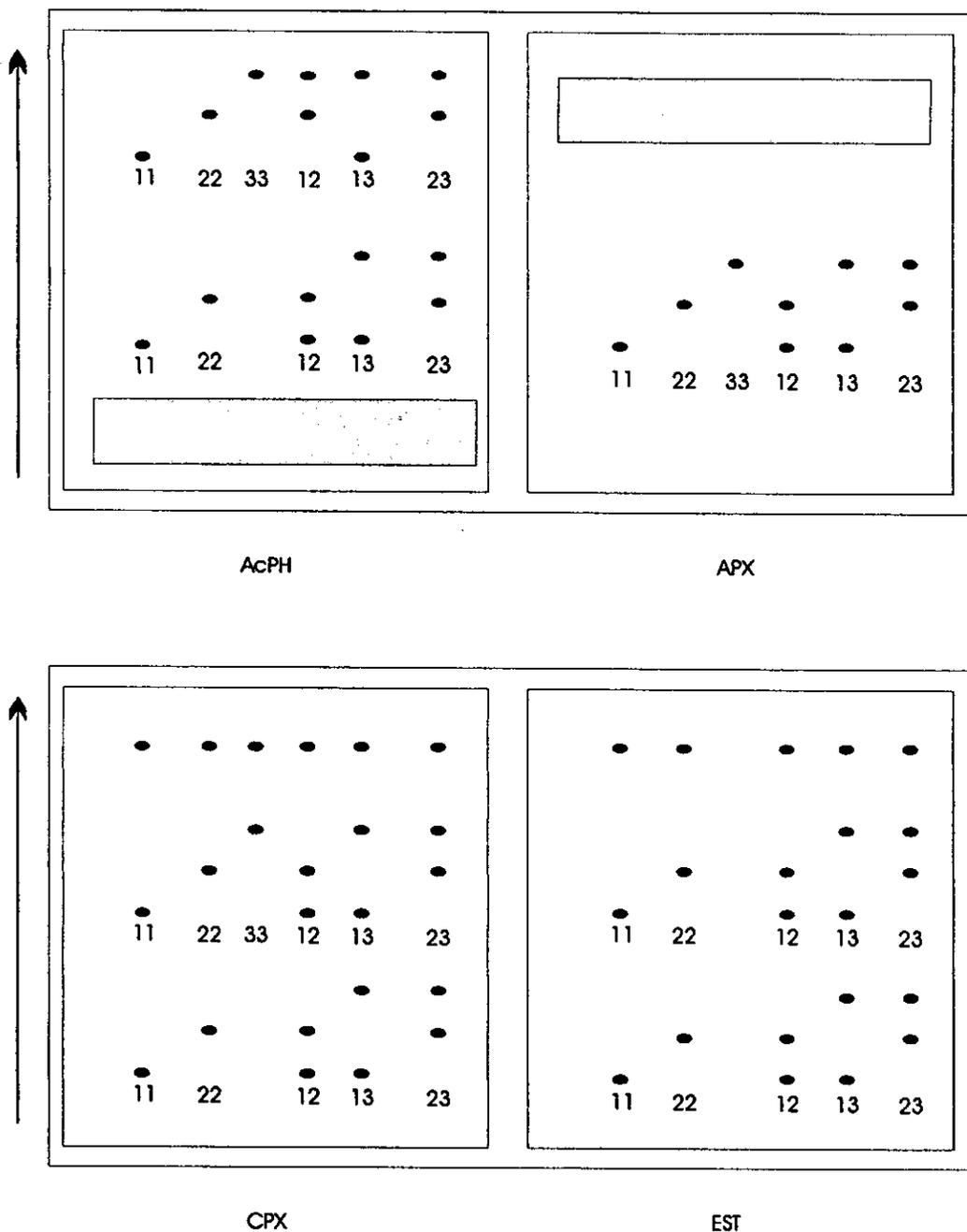


Figura 9A: Zimogramas que ilustran la movilidad de las isoenzimas en los sistemas estudiados. Las zonas sombreadas representan sitios donde se observó variación genética no interpretable.

poblaciones Valerio Trujano y El Infiernillo no presentaron el genotipo para heterócigos. Se encontró un locus de menor migración a GOT-1 que estuvo presente en la población El Infiernillo de *C. hintonii*, pero no fue consistente, no existía variación. (Figura 9 B).

EST.

Enzima monomérica con tres loci y tres alelos cada uno. EST-1, polimórfica, no estuvo presente en *C. melanadenia*; los homócigos para el alelo 3 no se encontraron. EST-2, polimórfica, no se obtuvo el genotipo para los homócigos del alelo 3; los heterócigos para los alelos 1-3 y 2-3 sólo se encontraron en la población Valerio Trujano. Finalmente EST-3 fue monomórfica y no se encontró en la población Tehuiztingo de *C. hintonii*.

LAP.

Monomérica, sólo se observó un locus. Polimórfica para las poblaciones Valerio Trujano, Tlayahualco y Tehuiztingo de *C. hintonii*. Monomórfico para las poblaciones Zicuitaro El Poblado y El Infiernillo de *C. hintonii* así como para *C. macvaughii* y *C. melanadenia*. Se observaron dos locus no interpretables; uno de menor y otro de mayor migración anodal.

MDH.

Enzima dimérica polimórfica excepto para *C. melanadenia*; los heterócigos presentan tres bandas. En la población El Infiernillo se encontró un locus variable de mayor migración poco consistente. *C. melanadenia* no presentó los genotipos para los homócigos y para *C. macvaughii* no se detectaron los homócigos para el alelo dos. Para el caso de las poblaciones de *C. hintonii* las poblaciones Valerio Trujano y Tehuiztingo presentaron los tres genotipos esperados, Tlayahualco no presentó el genotipo homócigo para el alelo uno, en Zicuitaro y El Infiernillo sólo presentaron el genotipo para los heterócigos.

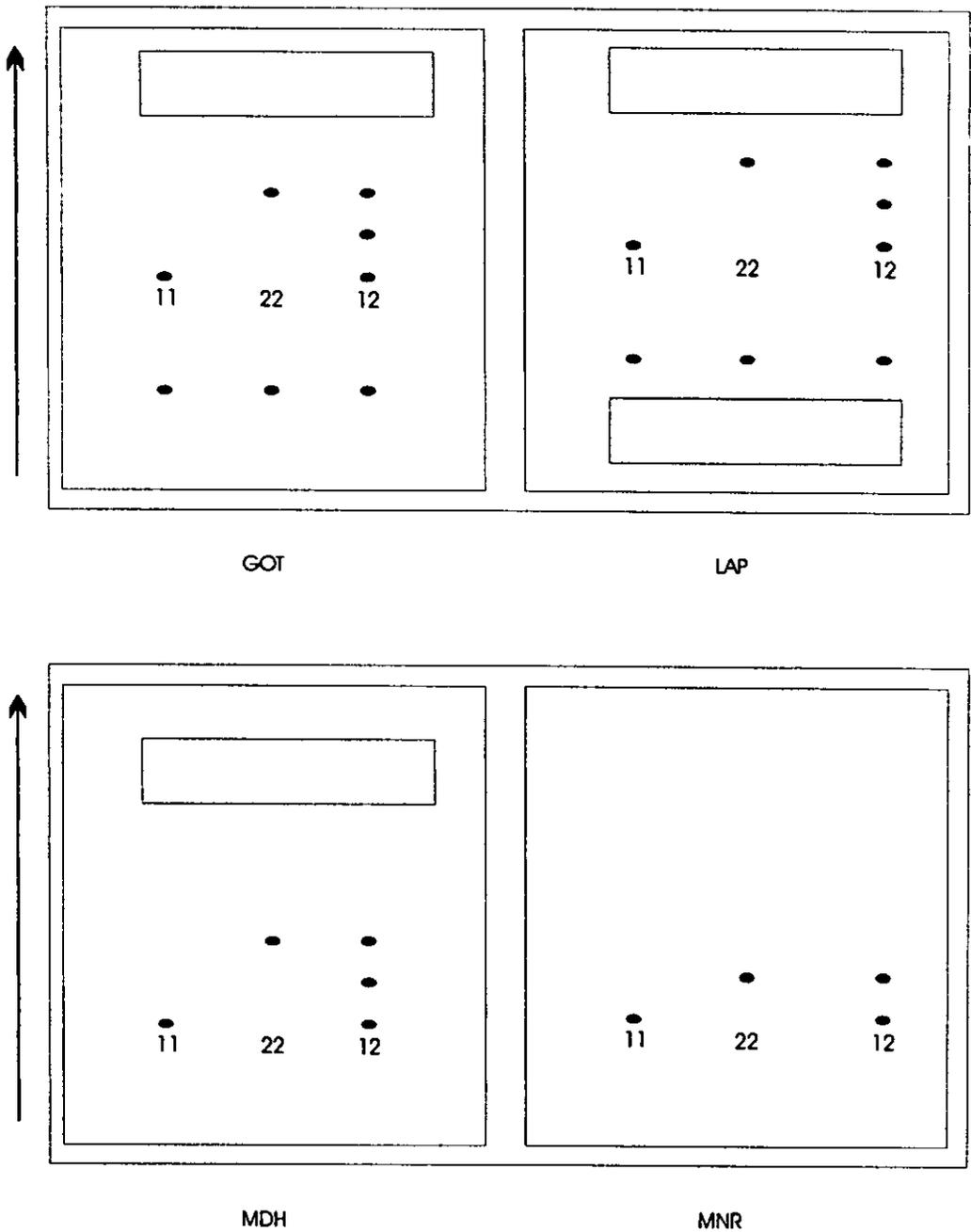


Figura 9B: Zimogramas que ilustran la movilidad de las isoenzimas en los sistemas estudiados. Las zonas sombreadas representan sitios donde se observó variación genética no interpretable.

MNR.

Monomérica, polimórfica con dos alelos. Presente en todas las poblaciones y especies. *C. macvaughii* y *C. hintonii* presentaron los tres genotipos esperados.

PGI.

Enzima dimérica, se encontraron dos loci polimórficos; PGI-1 monomórfico para *C. macvaughii*. PGI-2 ausente en la población El Infiernillo de *C. hintonii* y en *C. macvaughii*. *C. melanadenia* no presentó el genotipo para los heterócigos del locus uno.

RUB.

Presentó dos loci monomórficos presentes en todas las poblaciones y especie. El locus dos es el que más tiempo tarda en aparecer.

SDH.

Monómero con un locus polimórfico y dos alelos. Ausente en las poblaciones Tlayahualco, Tehuitzingo y El Infiernillo de *C. hintonii* así como en *C. macvaughii*. Por ser una enzima monomérica los heterócigos presentaron un patrón de dos bandas.

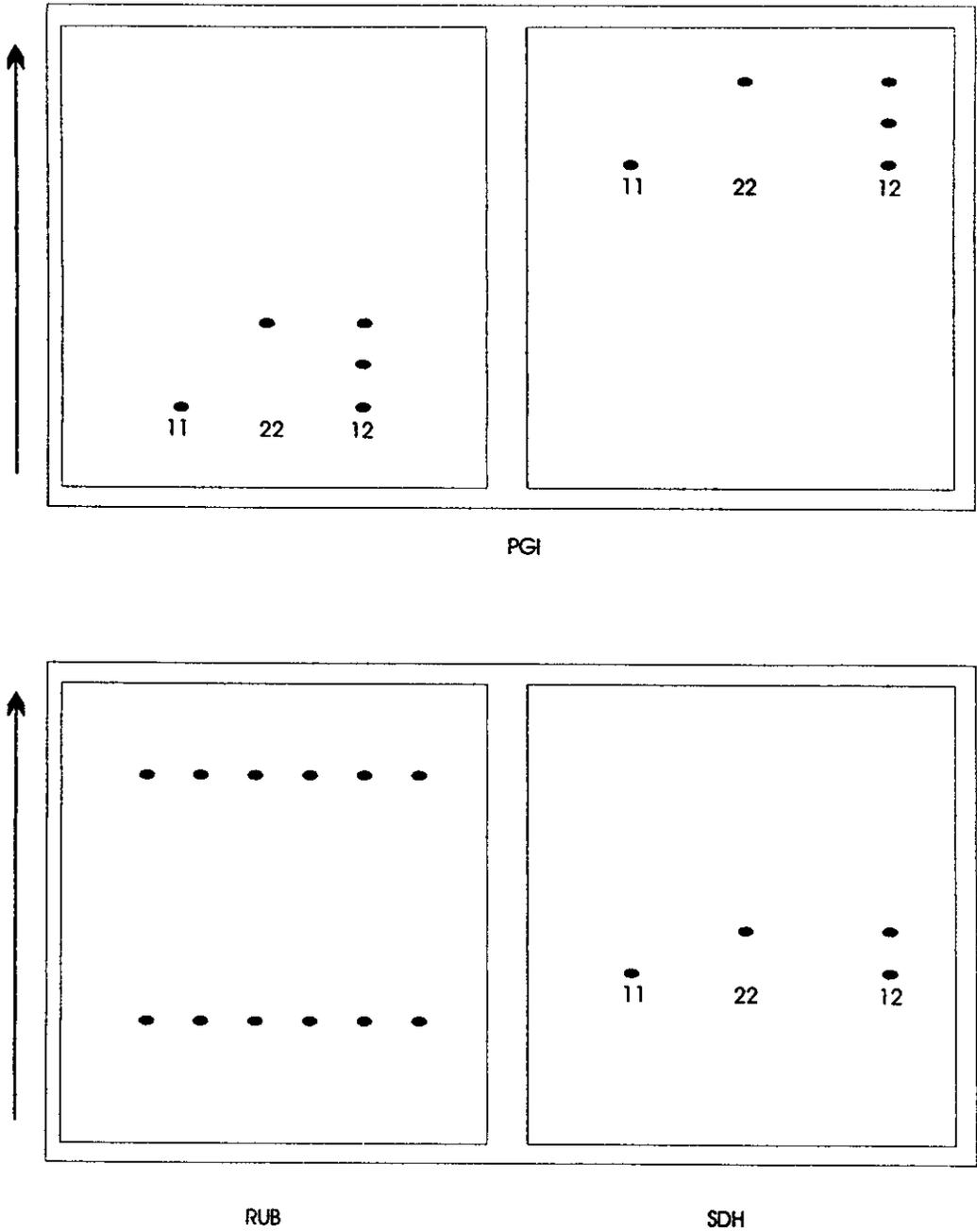


Figura 9C: Zimogramas que ilustran la movilidad de las isoenzimas en los sistemas estudiados. Las zonas sombreadas representan sitios donde se observó variación genética no interpretable.