

Informe final* del Proyecto B214
Estudio genético de las poblaciones de *Rhizophora mangle* en México

Responsable: Dr. Juan Núñez Farfán
Institución: Universidad Nacional Autónoma de México
Instituto de Ecología
Departamento de Ecología Evolutiva
Laboratorio de Genética Ecología y Evolución
Dirección: Av. Universidad # 3000, Ciudad Universitaria, Coyoacán, México, DF,
04510 , México
Correo electrónico: farfan@servidor.unam.mx
Teléfono/Fax: Tel: 5622 9039 Fax: 5622 8996, 5616 1976
Fecha de inicio: Noviembre 15, 1994
Fecha de término: Agosto 15, 1996
Principales resultados: Base de datos, Informe final
Forma de citar el informe final y otros resultados:** Núñez Farfán, J., Domínguez, C. A., Dirzo, R. y L. E. Eguiarte Fruns. 1997. Estudio genético de las poblaciones de *Rhizophora mangle* en México. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ecología. **Informe final SNIB-CONABIO proyecto No. B214.** México D. F.

Resumen:

El presente trabajo tuvo como objetivo principal conocer la estructura genética de las poblaciones de *Rhizophora mangle* en el país (Costas del Golfo de México, mar Caribe y Océano Pacífico), determinando la diversidad y estructura genética de las poblaciones de *R. mangle* en las costas de México, además de determinar la importancia de la historia biogeográfica y de las fuerzas evolutivas sobre la estructura genética de las poblaciones de *R. mangle*.

-
- * El presente documento no necesariamente contiene los principales resultados del proyecto correspondiente o la descripción de los mismos. Los proyectos apoyados por la CONABIO así como información adicional sobre ellos, pueden consultarse en www.conabio.gob.mx
 - ** El usuario tiene la obligación, de conformidad con el artículo 57 de la LFDA, de citar a los autores de obras individuales, así como a los compiladores. De manera que deberán citarse todos los responsables de los proyectos, que proveyeron datos, así como a la CONABIO como depositaria, compiladora y proveedora de la información. En su caso, el usuario deberá obtener del proveedor la información complementaria sobre la autoría específica de los datos.

ESTUDIO GENÉTICO DE LAS POBLACIONES DE
***Rhizophora mangle* EN MÉXICO**

INFORME FINAL DEL PROYECTO CONABIO NO. B214

MÉXICO, D.F., JULIO DE 1996

INSTITUCIÓN:

*Departamento de Ecología Evolutiva, Centro de Ecología, UNAM.
Apdo. Post. 70-275, México 04510, D.F.*

EQUIPO CIENTÍFICO:

Dr. Juan Núñez Farfán
Investigador Responsable

Dr. César A. Domínguez
Investigador Corresponsable

Dr. Rodolfo Dirzo
Investigador Corresponsable

Dr. Luis E. Eguiarte Fruns
Investigador Corresponsable

Biól. Martín Quijano Poumián
Técnico Académico

COLABORADOR:

Pas. de Biól. Amelia Cornejo Romero

INDICE	
	Página
Agradecimientos	4
1. INFORME OPERATIVO	5
2. INTRODUCCIÓN GENERAL	10
3. MÉTODOS	14
4. RESULTADOS	34
5. DISCUSIÓN GENERAL	59
6. LITERATURA CITADA	66
7. APÉNDICE I. FRECUENCIAS ALÉLICAS EN 14 POBLACIONES DE <i>Rhizophora mangle</i> DE MÉXICO	72

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer el apoyo brindado durante el desarrollo de este proyecto a Raúl I. Martínez, Santiago Sinaca Colin, Judith Pérez, Jesús Vargas, y Eduardo Cuevas por la ayuda en la colecta de material biológico. Glenn Furnier, E. Alvarez-Buylla, Nidia Pérez y Sergio Zarate por su ayuda en la interpretación de los patrones de bandeo. A. Chaos, E. Alvarez-Buylla, y Nidia Pérez por facilitarnos los programas de análisis genético. A nuestras amadas esposas que aguantaron nuestros ‘paseos’ por los manglares.

1

INFORME OPERATIVO

En esta sección haremos una descripción de las actividades realizadas durante el desarrollo del proyecto **Estudio genético de las Poblaciones de *Rhizophora mangle* en México (CONABIO, B214)**, iniciado en noviembre de 1994.

El presente estudio describe la genética de poblaciones de *Rhizophora mangle* (Rhizophoraceae) en las costas de México. Aún cuando el proyecto pretendía analizar diez poblaciones de esta especie, este objetivo fue rebasado ya que se analizaron genéticamente 14 poblaciones de las costas de Pacífico y Atlántico. Para el análisis genético se usó la técnica de electroforesis horizontal en geles de almidón hidrolizado (aunque también se ensayaron geles de acetato de celulosa) de isoenzimas (Soltis y Soltis 1989). El análisis de la variación isoenzimática puede realizarse en tejidos vivos con una buena actividad, por lo que se colectaron distintos tejidos de cada uno de los individuos analizados. En cada localidad visitada se colectaron hojas jóvenes de 50 individuos reproductivos. Las muestras fueron etiquetadas con el número de individuo y localidad, y guardadas en nitrógeno líquido (-125° C) para su transporte a la Cd. de México.

Las poblaciones colectadas se ubican en el Océano Pacífico, Golfo de México y Mar Caribe, abarcando prácticamente todo el ámbito de distribución de la vegetación de manglar en México (ver Métodos). Las poblaciones estudiadas, así como las fechas de colecta se enlistan en la Tabla 1.

Las muestras fueron depositadas en un ultracongelador (-70 °C) para su posterior análisis genético en el Laboratorio de Genética Ecológica del Centro de Ecología, UNAM.

Tabla 1. Fecha de colecta de *Rhizophora mangle* en catorce comunidades de manglar en las costas de México.

LOCALIDAD	ESTADO	FECHA
Sontecomapan	Veracruz	5 al 12 de septiembre de 1994
Centla	Tabasco	
Cd. del Carmen	Campeche	
San Blas	Nayarit	1 al 12 de diciembre de 1994
Topolobampo	Sinaloa	
Bahía Kino	Sonora	
Celestún	Yucatán	25 de febrero al 8 de marzo de 1995
Ría Lagartos	Yucatán	
Punta Allen	Quintana Roo	
Chantuto	Chiapas	11 al 19 de mayo de 1995
Chacagua	Oaxaca	
Coyuca	Guerrero	
Tamiahua	Veracruz	7 al 11 de septiembre de 1995
Tuxpan	Veracruz	

El análisis isoenzimático se realizó siguiendo los protocolos estándar de electroforesis en plantas (Soltis y Soltis 1989), y de manera particular para *Rhizophora* (Goodall y Stoodart 1989). Una vez que se seleccionaron aquellas enzimas con 1) una buena actividad enzimática, 2) polimórficas, y 3) con una interpretación genética repetible, se procedió al análisis de los individuos de cada población.

Los primeros resultados de este estudio fueron expuestos en el XIII Congreso Mexicano de Botánica (Cuernavaca, Mor., octubre de 1995), mientras que los resultados definitivos y las conclusiones se incluyen en los capítulos siguientes del presente informe. Este informe contiene,

además de esta sección, cuatro capítulos: 1. Introducción general, 2. Métodos, 3. Resultados de los patrones de variación genética, y la estructura genética de las poblaciones de *Rhizophora mangle* en México. El capítulo 4 es la Discusión general. Acompañan al informe un Apéndice y la base de datos con la información contenida en dicho Apéndice.

Este estudio se realizó de manera conjunta con el “**Estudio ecológico de las poblaciones de *Rhizophora mangle* en México**” (Informe final, CONABIO mayo de 1996), y hemos pretendido integrar la información genética a la ecológica y de conservación con el fin de alcanzar una mejor comprensión de la ecología y evolución de *Rhizophora mangle*. El panorama general de estos estudios está descrito en la Figura 1.

Genética de las poblaciones de Rhizophora mangle

Este estudio aborda de manera particular la genética de las poblaciones de *Rhizophora mangle* en México. Los objetivos trazados son: 1) Caracterizar la diversidad genética de esta especie en catorce localidades de manglar del país; 2) Determinar los niveles de diferenciación genética entre las poblaciones, dentro y entre costas de México. Finalmente, 3) a la luz de los resultados del estudio ecológico pretendemos usar los resultados del estudio genético para consolidar el análisis del estado de conservación de las comunidades de manglar (Fig. 1).

Además del interés ecológico y de conservación que motiva los estudios de genética de especies importantes, como en el caso de *Rhizophora mangle*, existe la posibilidad de conocer cómo el aislamiento espacial y temporal entre poblaciones afecta el nivel de diferenciación genética. En este sentido, un fenómeno histórico ocurrido hace 3.5 millones de años permite evaluar el grado de cambio genético entre poblaciones del Pacífico, respecto a aquellas del Golfo de México y Mar Caribe. Este fenómeno fue el levantamiento de lo que hoy es Centroamérica y que afectó la evolución de la vida terrestre y marina en ambos lados del Istmo Centroamericano, pues interrumpió el contacto genético entre las poblaciones (Svitol 1993, Collins et al. 1996).

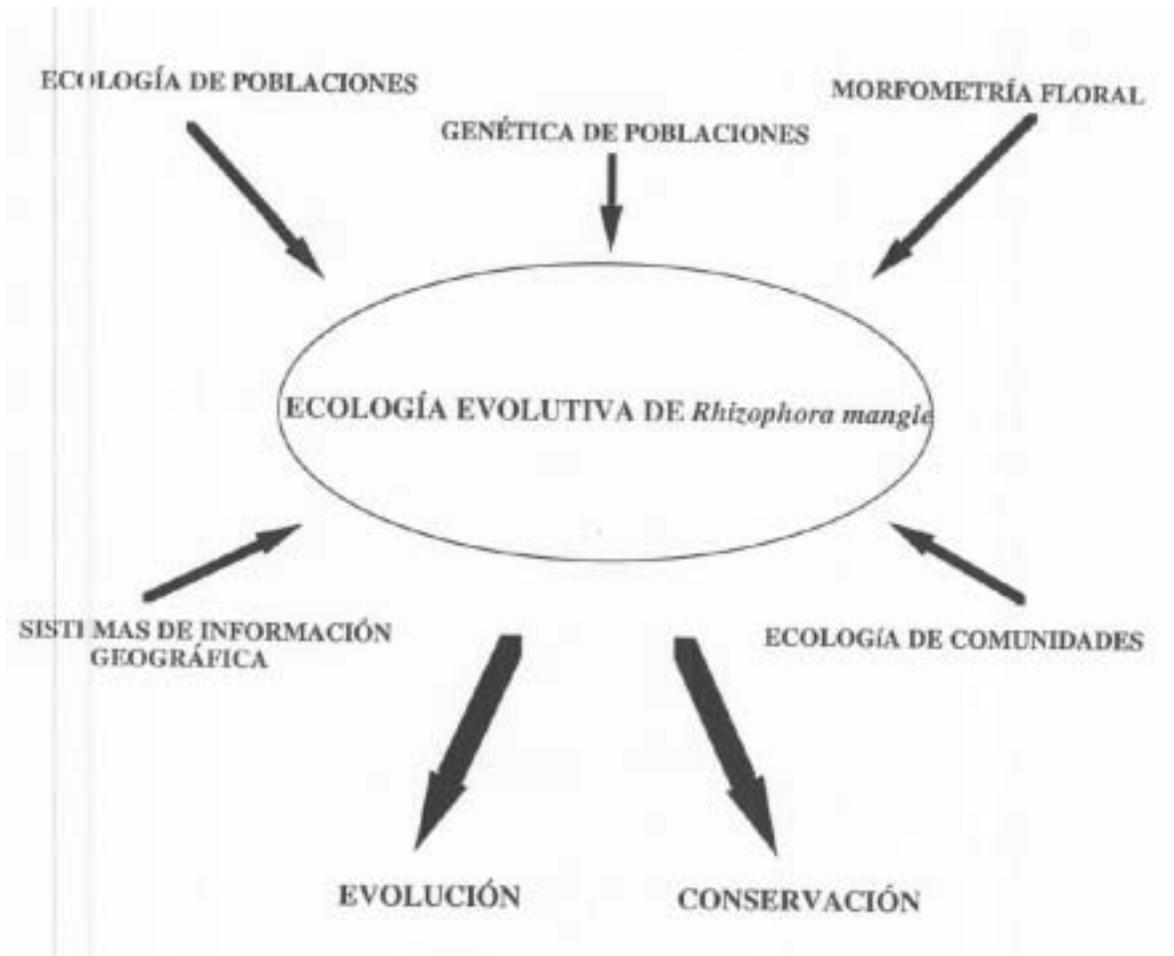


Figura 1. Diagrama que describe las disciplinas integradas en el estudio de la ecología evolutiva de *Rhizophora mangle*.

2

INTRODUCCIÓN GENERAL

Cualquier plan de conservación de la diversidad biológica a cualquiera de sus niveles, debe descansar en un conocimiento científico sólido acerca de los sistemas a conservar (Soulé 1992, Cordero y Núñez-Farfán 1993). Este conocimiento debe comprender, además de la información referente a la distribución, abundancia y estado actual de los ecosistemas y poblaciones naturales, un análisis de la diversidad genética. Aunque en México existen numerosos ejemplos de estudios que abordan alguno de estos componentes en forma aislada, no existen estudios integrales que abarquen desde el nivel genético hasta el nivel que describa la estructura y diversidad de las comunidades actuales en su ámbito de distribución, así como su grado de conservación (cf. Fig.1).

Este estudio aborda el análisis de la diversidad genética a nivel intraespecífico, en *Rhizophora mangle*, así como las diferencias entre poblaciones de esta especie. Consideramos que este aspecto de la biodiversidad no ha recibido la importancia que merece en nuestro país, y es fundamental en la propuesta de alternativas de conservación (Núñez-Farfán et al. 1996).

Situación de los manglares en México

Se estima que durante la década de los 70's, la extensión de bosques de manglar en México era de 6600 km², situándose en sexto lugar mundial (Cintrón *et al.* 1985). Algunas estimaciones señalan que se ha perdido aproximadamente el 20% de la extensión original de esta comunidad (Sáinz y Gutiérrez 1992). En particular, la costa del Golfo de México es considerada como una de las zonas con mayor tasa de pérdida, y donde la fragmentación es más acentuada (Contreras *et al.* 1988). A pesar de lo anterior, aún persisten áreas importantes de esta comunidad en ambas costas de nuestro país, y existe algún tipo de manglar en cada una de las 123 lagunas costeras de México (Flores-Verdugo *et al.* 1992).

En contraste con los señalamientos anteriores, los resultados que hemos obtenido en la

investigación previa, indican que las comunidades de manglar presentan las tasas de deforestación más altas (7.93%) del país, con un valor cuatro veces más alto que el promedio anual nacional (1.29%) para diversos tipos de comunidades (Núñez-Farfán et al. 1996).

Los manglares como especies clave

Aunque los manglares están catalogados como áreas de baja diversidad florística (Tomlinson 1994), son de gran importancia en los flujos de energía de los sistemas costeros tropicales y subtropicales. Muchas especies de animales de importancia económica y ecológica dependen de los manglares durante fases críticas de su ciclo de vida (etapas larvarias, o reproducción). Los manglares constituyen además el hábitat temporal de especies de aves residentes y migratorias. Por estas características son considerados como ecosistemas críticos, es decir, ecosistemas de gran importancia biológica y amenazados (Mittermeier y Goettsch de Mittermeier 1992, Dinerstein et al. 1995). Por otra parte, los manglares también son reconocidos como ecosistemas de gran sensibilidad a la perturbación (Contreras *et al.* 1988). Es por estas razones que las diferentes especies de mangle que habitan en México pueden considerarse como especies clave desde el punto de vista ecológico y ecosistémico.

En México existen cinco especies de mangle de las cuales el mangle rojo, *Rhizophora mangle*, junto con *Avicennia germinans*, son las especies que tiene la más amplia distribución y abundancia en las zonas costeras tropicales, ocurriendo tanto en hábitats hipersalinos, hasta zonas salobres (Rzedowski 1978, Lot y Novelo 1990). Aún cuando *Rhizophora mangle* presenta una amplia distribución en el país, puede considerarse como una especie *rara* debido a la distribución restringida de su hábitat (especies estenoica) (Rabinowitz *et al.* 1986).

Ecología evolutiva en los manglares

La historia biogeográfica de *Rhizophora mangle*, así como su sistema reproductivo y los mecanismos de dispersión de propágulos, sugieren la existencia de una fuerte diferenciación entre las poblaciones de esta especie. De ser así, esta diversidad intraespecífica merecerá especial atención

desde el punto de vista de la conservación. *Rhizophora mangle* habitó paleocomunidades en el Plioceno medio en lo que es hoy la planicie Costera del Golfo de México (Formación Paraje Solo, cercano a Coatzacoalcos, Veracruz; Graham 1993). En esos tiempos, *Rhizophora* ya habitaba localidades de los que hoy son las costas del Pacífico y Atlántico de México, y existía contacto entre ambas costa a través del canal interoceánico de Centroamérica (Collins et al. 1996).

Aproximadamente un millón de años más tarde (Plioceno tardío), el puente Centroamericano se estableció, aislando a las poblaciones de la costa del Pacífico, respecto a las del Golfo de México y Mar Caribe. El tiempo mínimo de separación se estima en 3.5 millones de años (Svitol 1993, Collins et al. 1996). Al menos para otros grupos de organismos, existe evidencia de que este fenómeno produjo extinciones pero también fomentó la diversificación (Svitol 1993, Collins et al. 1996). Por ello, sería de esperar que también afectará la variación fenotípica y genética al seno de una especie.

Los resultados del análisis de la variación en la morfología floral de distintas poblaciones de *Rhizophora mangle* de México, indican que existe un fuerte diferenciación fenotípica entre poblaciones, y que dichas diferencias no son explicadas por variación clinal (i.e., variación en los rasgos producidos por variación ambiental gradual). Asimismo, el tiempo de separación entre las poblaciones de la costa del Pacífico y del Atlántico explica un fracción significativa de dicha variación, y otra fracción importante es explicada por las poblaciones y por variaciones entre los individuos de cada población (Núñez-Farfán et al. 1996). Se sugiere que el proceso de diferenciación entre poblaciones podría obedecer a procesos estocásticos (i.e., deriva génica), por lo que el análisis genético se hace indispensable para apoyar dicha hipótesis.

Genética de poblaciones de manglares

En la actualidad no existen estudios sobre la genética de poblaciones de especies de manglares a nivel nacional. Sin embargo, a nivel mundial sólo tres estudios de genética de poblaciones de manglares han sido publicados. Estos han sido realizados en especies del género *Avicennia* en el Caribe (*A. germinans*; MacMillan 1986) y en Australia (*A. marina*; Duke 1995), y uno en poblaciones de *Rhizophora stylosa* de Australia (Goodall y Stoddart 1989). Esta ausencia de

estudios en especies de manglar es realmente notable si consideramos la importancia ecológica de estas especies en comunidades que son muy características, aunque pobres en especies (Tomlinson 1994, Ricklefs y Latham 1993). No menos importante, dada la especificidad del hábitat de los manglares y el amplio rango biogeográfico que ocupan, son especies modelos para el estudio de los procesos evolutivos que moldean la variabilidad genética y fenotípica.

La técnica de electroforesis de proteínas ha probado ser una herramienta sumamente útil en análisis genético de las poblaciones. Actualmente existen datos genéticos para más de 2200 especies de plantas (Hamrick y Godt 1996), por lo que es posible el análisis comparativo de la diversidad y la estructura genética de especies de plantas, como una función de los rasgos de historia de vida (v.gr., modo de dispersión, sistema reproductivo, forma de vida, etc.). La escasez de datos genéticos para especies que habitan en los manglares limita la búsqueda de patrones respecto al cómo es su estructura genética.

La genética de poblaciones se interesa en el estudio de la riqueza genética de las especies, en conocer cómo está repartida esta variabilidad al seno de la población o entre poblaciones y, más importante, en conocer los procesos evolutivos que determinan dichos patrones (Hedrick 1983, Eguiarte 1986). Tales procesos incluyen a la selección natural (reduce o mantiene la variación, y favorece la adaptación; puede producir diferenciación adaptativa), la deriva génica (reduce la variación genética a nivel local, la mantiene a nivel global, pero incrementa la diferenciación al azar entre poblaciones); flujo génico (en su ausencia, las poblaciones tienden a divergir genéticamente por deriva o por selección); sistemas de apareamiento (modifican la variabilidad genética o genotípica de la población, y puede actuar de manera conjunta con la deriva), y a la mutación (que afecta la diversidad genética, favorecer la diferenciación, etc., aunque su efecto es generalmente bajo).

De acuerdo con lo anterior y desde el punto de vista de la conservación de los hábitats estuarinos y de las especies que en ellas habitan, es de gran importancia el análisis del estado actual y la diversidad genética de las poblaciones de *Rhizophora mangle* en el país.

3

MÉTODOS

Especie estudiada

Rhizophora mangle L. es la especie de mangle americano con un patrón de distribución más amplio, presentándose desde el sur de Sonora y Baja California hasta Ecuador, incluyendo el archipiélago de las Galápagos. En el lado del Atlántico, está presente en las costas de Florida pero desaparece en las costas templadas del Golfo de México (Texas y norte de Tamaulipas), reapareciendo en el sur de Tamaulipas hasta las Guayanas, está ausente en las costas meridionales de Brasil y se presenta en el sur del mismo (Lot-Helgueras et al. 1975). *R. mangle* domina en distribución ampliamente sobre las otras dos especies del género presentes en América ya que *R. racemosa* y *R. x harrisonii* presentan una distribución restringida a Centroamérica (Tomlinson 1994).

R. mangle posee características adaptativas a este tipo de hábitat. Desde el punto de vista fisiológico, posee mecanismos que le permiten metabolizar (excretar) el exceso de sal, ya que habita zonas salobres. Con respecto al efecto de las mareas y los fuertes vientos que afectan las zonas costeras, *R. mangle* posee madera muy fuerte y su anclaje al sustrato fangoso es por medio de raíces pivotantes (zancos). Una adaptación sorprendente en esta especie es el fenómeno de la viviparidad: las semillas son en realidad plántulas que permanecen pegados a la planta madre hasta alcanzar cierto tamaño. Posteriormente caen por gravedad de manera vertical lo que en ocasiones les permite enterrarse en el fango y producir sus raíces. También, al ser flotantes la estructura de las plántulas constituye a la vez una adaptación para la dispersión por agua, cosa que favorece la colonización ya que pueden sobrevivir por periodos prolongados (Rabinowitz 1978). Es una especie con flores hermafroditas, autocompatible y el vector del polen es el viento. Estas características concuerdan con lo esperado para especies colonizadoras (Baker 1955; Primack y

Tomlinson 1980), aunque se esperarían también niveles de endogamia elevados (ver Lowenfeld y Klekowski 1992, Klekowsky et al. 1994).

Manglares de México estudiados

Se seleccionaron catorce localidades en las principales unidades y complejos de bosque de manglar de México definidas según la World Wild Life Foundation/The World Bank (Tabla 2; Dinerstein et al. 1995), y donde ocurriera la especie de interés *Rhizophora mangle*. Las poblaciones de *R. mangle* estudiadas se localizan en zonas que contrastan en su estructura y diversidad (Núñez-Farfán et al. 1996), cubren un ámbito geográfico amplio y difieren en el régimen climático (Tabla 3; Fig. 2).

En cada sitio (en lo subsecuente población) se muestrearon 50 árboles adultos de los que se tomaron 3 o 4 hojas jóvenes, las cuales se encuentran en el extremo de cada rama, estas muestras se guardaban en bolsa de plástico debidamente etiquetadas. Cada bolsa era cubierta primero con hielo hasta que se colectaban las 50 muestras y posteriormente eran almacenadas en un tanque con nitrógeno líquido para ser transportadas a la Ciudad de México, en donde se guardaban en un ultracongelador hasta su uso en el laboratorio.

Tabla 2. Localidades muestreadas, la unidad y el complejo de manglar al que pertenecen, en ambas costas de México, según la definición de la WWF/World Bank (ver Métodos).

COMPLEJO	UNIDAD	LOCALIDAD	ESTADO	LAT.	LONG.
Mar de Cortez	Costa del NW de México	Bahía Kino	Sonora	28° 47'	111° 54'
	Costa del NW de México	Topolobampo	Sinaloa	25° 36'	109° 08'
	Marismas Nacionales-San Blas	San Blas	Nayarit	21° 33'	105° 18'
Sur de México	Costa Sur de Pacífico de México	Coyuca de Benitez	Guerrero	16°57'	100°02'
Pacífico de América Central	Tehuantepec	Chacagua	Oaxaca	15° 58'	97° 35'
	Tehuantepec	Chantuto	Chiapas	15° 12'	92° 52'
Golfo de México	Alvarado	Tamiahua	Veracruz	21° 23'	97° 26'
	Alvarado	Tuxpan	Veracruz	20°97'	97°24'
	Alvarado	Sontecomapan	Veracruz	18° 32'	95° 01'
	Usumacinta	Centla	Tabasco	18° 36'	92° 27'
	Usumacinta	Cd. del Carmen	Campeche	18° 38'	91° 45'
Yucatán	Petenes	Celestún	Yucatán	20° 57'	90° 21'
	Ría Lagartos	Ría Lagartos	Yucatán	21° 35'	88° 04'
	Corredor Maya	Punta Allen	Quintana Roo	19° 50'	87° 28'

Tabla 3. Comunidades de manglar de ambas costas de México donde se estudió la genética de las poblaciones de *Rhizophora mangle*.

CLAVE	LOCALIDAD	ESTADO	COSTA	LONGITUD	LATITUD	TEMP. PROMEDIO ANUAL	PRECIP. PROMEDIO ANUAL
ALL	Punta Allen	Quintana Roo	C	87°26'	19°48'	29.9	1106.3
CAR	Cd.Carmen	Campeche	G	91°44'	18°38'	26.7	1540.4
CEL	Celestún	Yucatán	G	90°20'	20°52'	26.4	725.5
CEN	Centla	Tabasco	G	92°27'	18°28'	26.6	1560.2
COY	Coyuca	Guerrero	P	100°02'	16°57'	27.5	1360.3
CHAC	Chacagua	Oaxaca	P	97°33'	15°58'	28.0	905.5
CHAN	Chantuto	Chiapas	P	92°45'	15°09'	26.5	1578.4
KIN	Bahía Kino	Sonora	P	111°54'	28°47'	22.1	179.6
RIA	Ría Lagartos	Yucatán	C	88°03'	21°35'	25.6	550.1

<i>SBL</i>	San Blas	Nayarit	P	105°17'	21°30'	25.2	1436
<i>SON</i>	Sontecomapan	Veracruz	G	95°00'	18°33'	24.3	2016.9
<i>TAM</i>	Tamiahua	Veracruz	G	97°25'	21°21'	24.8	1352.4
<i>TOP</i>	Topolobampo	Sinaloa	P	109°07'	25°36'	24.3	244.1
<i>TUX</i>	Tuxpan	Veracruz	G	97°24'	20°57'	24.8	1352.4

Costa: C= Mar Caribe G= Golfo de México P= Océano Pacífico



Figura 2. Localidades de las poblaciones de *Rhizophoramangle* muestreadas en cada costa de México.

ELECTROFORESIS EN GEL

Para el análisis genético de las poblaciones de *R. mangle* se usó la técnica de electroforesis horizontal en geles de almidón de papa hidrolizado (Murphy et al. 1990) al 12% v/w. Muestras de tejido de cada individuo fueron maceradas en mortero añadiendo el buffer de extracción. Para el corrimiento de las muestras se realizaron numerosas pruebas usando diferentes sistemas de buffer (Tabla 4), así como buffers de extracción (Tabla 5) para eliminar los compuestos secundarios. Se usaron hojas jóvenes y embriones (Tabla 6). Tres sistemas fueron utilizados (Tabla 5, 6), y los mejores resultados se observaron en hojas. El buffer de extracción usado fue el de Goddall y Stoddart (1989; Tabla 5).

Sólo se utilizaron las enzimas con una buena actividad y cuyo patron de bandeo fuera interpretable en términos genéticos. De un total de 29 enzimas ensayadas, seis enzimas tuvieron buena actividad y se usaron rutinariamente para todas las poblaciones. Un total de seis enzimas, para un total de diez loci, fueron leídos para cada individuo de cada población. Seis loci fueron polimórficos para las poblaciones del Pacífico y cuatro para las poblaciones del Atlántico (ver Resultados).

Los resultados indican que nueve enzimas presentan una resolución aceptable para ser usadas de manera definitiva en el análisis genético (Tabla 6). Cinco enzimas tienen una resolución muy buena y seis de ellas son polimórficas (Tabla 6).

BUFFER C

MC MORFOLINA

ELECTRODO pH = 6.1

GEL

0.04M Ac. Cítrico monohidr. (8.4g)

1 parte del buffer de electrodo

5 horas

Aforar a 1 l de H₂O dest.19 partes de H₂O dest.

Ajustar con N-3 aminopropyl morfolina (10ml)

corre a 60 mA

BUFFER D

MITTON

ELECTRODO pH = 7.5

GEL pH = 7.6

5-6 h

0.032M Hidróxido de Sodio (1.25 g)

0.051M Trizma base (1.8g)

0.295M Ac. bórico (18.25g)

0.295M Ac. cítrico monohíd. (0.7g)

H₂O dest. 1 l1 l de H₂O dest.

Ajuste con NaOH o Ac. Bórico

a 250 v

BUFFER E

POULIK

ELECTRODO PH = 8.6

GEL

pH= 8.1

Hidróxido de sodio (4g)

Tris (T-1378) (2 g)

Ac. Bórico (18.55g)

Ac. cítrico (0.63 g)

H₂O dest. 1 l.H₂O dest. 1 l.

BUFFER F

SISTEMA R (May 1992)

ELECTRODO pH = 8.1

0.06M LiOH (2.51 g)

0.03M Ac. Bórico (18.54 g)

1 l de H₂O dest.

GEL pH = 8.5

0.03M Trizma base (3.63 g)

0.005M Ac. Cítrico (0.96 g)

10 ml del buffer de electrodo

Aforrar a 1 l con H₂O dest.**BUFFER G**

SISTEMA 7 (MAY 1992) pH = 8.3

ELECTRODO

LiOH (1.6 g)

Ac. Bórico (11.6 g)

GEL

Tris (5.45 g)

Ac. Cítrico (1.3 g)

900 ml de H₂O dest.+ 100 ml de buffer de electrodo**BUFFER H**

SISTEMA 8- (May 1992)

Parte A: LiOH (2.4 g)

ac. Bórico (23.4 g)

Ajustar a pH = 8 con LiOH

ELECTRODO

1 l de parte A

466 ml de H₂O dest.

Parte B: Tris (12.36 g)

Ac. Cítrico (3.36)

aforrar a 1l de H₂O dest.

GEL

76.8 ml de parte A

326.4 ml de parte B

aforrar a 1 l de H₂O dest.

ajustar a pH = 7.6 con HCl

BUFFER I

HISTIDINA

ELECTRODO pH = 7.0

GEL

Tris (16.35 g)

DL-Histidina (1.05 g)

Ac. Cítrico (9.04 g)

ajustar pH a 7 y llevar a 1 l

1 l de H₂O dest.de H₂O dest.

Ajustar pH con NaOH

BUFFER J

HC HISTIDINA pH = 7.6

GEL pH = 7.6

Tris- (15.1 g)

DL-histidina (0.958 g)

Ac. Cítrico (8.3 g)

aforar a 1 l de H₂O dest.1 l de H₂O dest.

ajustar pH con NaOH

Ajustar pH con NaOH

Tabla 5. Soluciones amortiguadoras (buffers) usadas para la extracción de los compuestos secundarios de los tejidos de *Rhizophora mangle*.

BUFFER DE EXTRACCION I

(Wendel)

100 mM de Tris-HCl pH = 7.5

7% de sacarosa

10 % de PVP-40

14 mM de Mercaptoetanol

250 mM de Ac. ascórbico, Sal de de Sodio

20 mM de dietilditiocarbamato

1% de albúmina sérica bovina

20 mM de metabisulfito de sodio

200 mM de tetraborato de sodio

BUFFER DE EXTRACCION II

(Mitton, modificado para *Cecropia*; Garay 1991)

Solución Stock:

Añadir:

Dióxido de germanio (0.38 g)

DMSO (4 ml)

Hervir en 38 ml de H₂O

2-fenoxietanol (25 ml)

DIECA (0.37 g)

mercaptoetanol (0.3 ml)

Tetraborato de sodio (0.55 g)

DTT (0.075 g)

Metabisulfito de sodio (0.15 g)

PVP-40 (6 g)

L-Ac. ascórbico (2 g)

0.16M de Fosfato de potasio monobásico, pH 7 (4 ml)

BUFFER DE EXTRACCION III

(Goodall & Stoddart 1989)

Solución stock:

100 ml de 0.1M de buffer de fosfatos pH = 6.8

K_2HPO_4 (1.252 g)

KH_2PO_4 (0.3824 g)

PVP-40 (7 g)

PVP-360 (1 g)

Buffer de trabajo:

50 ml de sol. stock

400 mg de borato de sodio

450 mg de DIECA

10 mg de NADP⁺

20 mg de NAD⁺

500 mg de albúmina sérica bovina

Tabla 6. Resultados obtenidos de las electroforesis en geles de almidón para *Rhizophora mangle* usando tres buffers de extracción (el número romano corresponde al buffer en tabla 5), sistemas (tabla 4), en individuos adultos (hojas) y embriones. La enzimas usadas en el presente estudio se resaltan con letras negritas.

RESOLUCION

(O NULA; - MALA; + REGULAR; ++ BUENA; +++ MUY BUENA)

ENZIMA (Number of Enzyme Commission, oE.C.)	ESTRUCTURA CUATERNARIA	NUMERO DE ISOENZIMAS REPORTADAS	BUFFER DE EXTRACCION	SISTEMA GEL-CHAROLA	ADULTO	EMBRION	POLIMORFICA (P) MONOMORFICA (M)
ACO (4.2.1.3)	M	1-3	I II	A ₂ C	O O	O O	- -
ACPH (3.1.3.2)	D	2-4	I I I I I I II III III	A ₁ A ₂ B C D F C B G	- - + + O O O + +	- + + + O O O O O	- - ? P - O O - -
ADH (1.1.1.1)	D	1-3	I I I I	A ₁ A ₂ B F	+ O - O	+ + - O	- - - O
AK (2.7.4.3)	M	1-3	I II	F J	O O	O O	- -
ALD (4.1.2.13)	T	2					
APX (1.11.1.7)			I I I I III III III	A ₁ B C D A ₂ B G	- + + - ++ + +	+ + ++ + ++ - -	- - - - M - -
CPX (1.11.1.7)			I I I III III	B C D B G	- ++ + - - -	- + + - - +	- - - - -
DIA (1.6.4.3)	M, D, T	1-4	I I I	B C D	O O O	O O O	- - -
EST (3.1.1.1)	M	variable	I I I	B C D	+ O +	+ O +	
FE (3.1.1.1)	M	variable	III	K	O	O	
FUM (4.2.1.2)	T	1	II	C	O	O	

GDH (1.4.1.2)	T	2	I I I	B C D	+ - O	+ - O	
GOT (2.6.1.1)	D	2-4	I I I II III III	B C D G B G	+ - - O ++ +++	+ - - 0 + ++	P (adultos)
G-3PD (1.2.1.12)	T	3					
G-6PD (1.1.1.49)	D	2	I	D	O	O	
HEX (2.7.1.1.)	M	2-3	I	D	+	+	
IDH (1.1.1.42)	D	1-2	II	C	O	O	
LAP (3.4.11.1)	M	2-3	I I I II III III	B C D G B G	+ - + O ++ +++	- - + O - -	P M (adultos) M (adultos)
LDH (1.1.1.27)	T	1	III				
MDH (1.1.1.37)	D	3	III III I III III	A ₁ A ₂ B B G	+++ +++ + ++ ++	+++ ++ + ++ +	P(embriones)
ME (1.1.1.40)	T	1	I III III	C B G	++ + +	++ - -	P
MNR (1.6.99.2)	D	1-4	I I I II III III	B C D G B G	++ + + ++ +++ ++	++ + + + +++ ++	P (ambos) P (ambos)
NADHDH (1.6.99.-)			II	G	O	O	
PGI (5.3.1.9)	D	2	I I I II III III III III	B C D G A ₁ A ₂ B G	++ - + - ++ ++ ++ +++	++ - + - ++ ++ ++ +++	P P P (ambos) P (ambos) P (ambos) P (ambos)
6-PGD (1.1.1.44)	D	2	II	C	O	O	-

PGM (2.7.5.1)	M	2	III III III III	C A.1 A.2 G	O O O O	O O O O	
RUB	M		I I I II III III	B C D G B G	+ + +++ + ++ +++	- + +++ - ++ +++	M M (ambos) M (ambos) M (ambos) M (ambos)
SDH (1.1.1.25)	M	1-3	III III III	A1 A2 B	O O +	O O +	- - -
SOD (1.15.1.1)	D	1-2	II III III	J B G	O ++ ++	O - +	P (adultos) P (adultos)
TPI (5.3.1.1.)	D	2	III III	C G	O O	O O	

Estimaciones genéticas

Cada uno de los genes, para cada enzima, fueron leídos para obtener las frecuencias genotípicas de cada población. A partir de las frecuencias genotípicas se obtuvieron las frecuencias alélicas. Para analizar la variabilidad genética de las diferentes poblaciones se obtuvo la proporción de loci polimórficos (P) como: $P = x/m$, donde x es el número de loci polimórficos y m es el número total de loci analizados. Se usó el criterio de polimorfismo del 99% (i.e., el alelo más común no excedió la frecuencia de 0.99). Un valor de $P = 1$ indica que todos los loci tienen dos o más alelos. Se obtuvo también la heterocigosis promedio esperada (H) como:

$H = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$, donde p_i es la frecuencia de los alelos del locus i . H toma valores de 0 a 1 (Hedrick 1983).

Se obtuvo el número de alelos promedio por locus como: $n_a = \sum \frac{n_i}{m}$, donde n_i es el número de alelos observados en el locus i , y m es el número de loci bajo análisis.

Estructura genética

Se obtuvieron el índice de fijación (F) y los estadísticos F de Wright (F_{it} , F_{is} , y F_{st}) para describir la estructura genética de las poblaciones de *R. mangle* (Wright 1978). Los estimados se obtuvieron separadamente para las poblaciones de cada costa, y para las poblaciones de ambas costas en su conjunto, usando las siguientes expresiones:

$F = 1 - \frac{H}{2pq}$, donde H es la heterocigosis observada en la población, y $2pq$ es la proporción de

heterocigotos esperada para cualquier par de alelos en el locus. F toma valores de -1 a +1, y los valores extremos indican un exceso y una deficiencia de heterocigotos, respectivamente. Valores de $F = 0$ indican que la población se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg (Hedrick 1983).

F_{it} mide el grado de endogamia total en la población (el conjunto de las poblaciones, que en términos de estos estadísticas pueden ser consideradas como subpoblaciones (Wright 1978). F_{it}

mide la reducción en la heterocigosis individual promedio a nivel de toda la población (el conjunto de todas las subpoblaciones) en relación a una población en apareamiento al azar (Hardy-Weinberg) y con las mismas frecuencias génicas (alélicas). F_{it} es el coeficiente total de endogamia de un individuo e incluye la contribución de apareamientos no aleatorios dentro de las subpoblaciones (F_{is}) y una contribución debida a la subdivisión en sí misma, F_{st} (Hart y Clark 1989). Si p_i es la frecuencia de un alelo en el locus i en la población total, $F_{it} = \frac{H_t - H_o}{H_t}$, donde H_o es la

heterocigosis individual promedio observada en la subpoblación, y $H_t = \frac{\sum_{i=1}^n 2p_i(1-p_i)}{n}$ es la heterocigosis promedio esperada en una población de apareamiento aleatorio, donde la suma de todos los loci es n . F_{is} mide la reducción en la heterocigosis individual promedio debida a apareamientos no aleatorios dentro de la subpoblación como (Hartl y Clark 1989):

$F_{is} = \frac{H_s - H_o}{H_s}$, donde H_s es la heterocigosis promedio observada, para todos los loci, a nivel de

subpoblación. Finalmente, F_{st} es una medida de diferenciación genética entre subpoblaciones, e implica una reducción en la heterocigosis de una subpoblación debido a deriva génica al azar (Hartl y Clark 1989); esta medida también es útil si el objetivo es inferir los patrones de flujo génico entre ellas (Slatkin 1993):

$$F_{st} = 1 - \frac{H_s}{H_t}.$$

F_{it} y F_{is} toman valores de -1 a +1 y miden la desviación en las frecuencias genotípicas respecto a una población ideal con las mismas frecuencias génicas, a nivel de toda la población y a nivel de la subpoblación, respectivamente.

La significancia de los estadísticos F o sus equivalentes, fue obtenida mediante el programa de Weir (1990). Este obtiene el error estándar de los estimados mediante un jackknife sobre todos los loci, y al mismo tiempo obtiene el intervalo de confianza de los estimados (al 95%) mediante la técnica de remuestreo denominada Bootstrap.

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

$$F_{st} \approx \frac{1}{4Nm + 1}, \quad \text{ec. (1)}$$

donde N es el tamaño de la población, m es la fracción de inmigrantes a N . A partir de F_{st} se puede estimar indirectamente el flujo génico entre las subpoblaciones que integran la población como (Wright 1951):

$$Nm \approx \frac{1}{4} \left(\frac{1}{F_{st}} - 1 \right). \quad \text{ec. (2)}$$

Valores de $Nm \ll 1$ producen un fuerte diferenciación entre las subpoblaciones (i.e., deriva génica actuando independientemente en cada subpoblación; Slatkin 1994), mientras que si $Nm > 1$, las subpoblaciones se comportan como una sola población panmíctica y el flujo génico restringe el efecto de la deriva génica (Kimura y Maruyama 1971, Hartl y Clark 1989, Slatkin 1994).

No existe forma de estimar m indirectamente de manera independiente (Slatkin 1994), por lo que la aproximación es estimar Nm a partir de F_{st} . Los estimadores promedio de Nm requieren, para ser confiables, ser insensibles a la acción de otras fuerzas evolutivas como la mutación y la selección natural. Crow y Aoki (1984) y Takahata y Nei (1984), han demostrado que G_{st} (el estimador de F_{st} para loci multialélicos) no depende ni de la tasa de mutación μ , ni del número de alelos (k). La expresión de G_{st} incluye sin embargo un factor que toma en cuenta el número de subpoblaciones en la población:

$$G_{st} = \frac{1}{4\alpha Nm + 1}, \quad \text{ec. (3)}$$

donde $\alpha = \left(\frac{n}{n-1} \right)^2$, siendo n el número de subpoblaciones; conforme el número de

subpoblaciones se incrementa, G_{st} se aproxima a la F_{st} de Wright a una tasa de $\frac{1}{m}$ siempre que

$\mu < m$. (Crow y Aoki, 1984, Takahata y Nei 1984, Hartl y Clark 1989).

Recientemente Slatkin (1993) ha encontrado que F_{st} puede ser usado obtener información sobre el aislamiento por distancia (*sensu* Wright 1946). Para ello se estima la F_{st} entre pares de poblaciones separadas una distancia k , y obtiene un estimado de Nm de la ecuación (2). Dicho estimador se designa como \hat{M} (Slatkin 1993). Para el caso de flujo génico en una dimensión (Fig. 3),

$$\hat{M} \approx \frac{4Nm}{k}, \quad \text{ec. (4)}$$

mientras que para flujo génico en dos dimensiones (Fig. 3)

$$\hat{M} \approx \frac{4Nm}{\sqrt{k}} \quad \text{ec. (5)}$$

Para poblaciones en equilibrio entre la deriva y la migración la relación:

$$\log(\hat{M}) = a + b \log(k) \quad \text{ec. (6)}$$

predice una pendiente (b) de -1 y de -05 para flujo génico en una y dos dimensiones, respectivamente (Fig. 3; Slatkin 1993, 1994).

Para estimar \hat{M} entre pares de poblaciones de *R. mangle* se usó el programa desarrollado por Slatkin (1993), el cual está basado en métodos de coalescencia y obtiene F_{st} entre pares de poblaciones estimando tanto θ (Weir y Cockerham 1984) o G_{st} (Nei 1973). El primero es un estimador insesgado pero en situaciones de flujo génico elevado puede ser negativo y por lo tanto su función inversa \hat{M} , está indefinida (Hellberg 1996). G_{st} es siempre positivo menor varianza que θ ; en situaciones donde \hat{M} es alta, G_{st} se correlaciona mejor con la distancia (Hellberg 1996). En el presente estudio, se obtuvieron las distancias entre poblaciones usando cartas (INEGI) a una escala de 1:250,000.

Slatkin (1985) desarrolló otros métodos para estimar el flujo génico indirectamente. Uno de ellos conocido como el de los alelos “privados” (private alleles), que son aquellos que se encuentran exclusivamente en una población. La estimación de Nm requiere conocer la frecuencia

promedio de los alelos privados, $\bar{p}(1)$, y Slatkin (1985) encontró que existe una relación entre la frecuencia de los alelos privados y Nm :

$$\ln \bar{p}(1) = \{(-0.505)(\ln Nm)\} - 2.44 \quad \text{ec. (7)}$$

Distancias y similitudes genéticas

Se obtuvieron las distancias genéticas y las similitudes entre poblaciones usando los estimadores de Nei (1972). Las similitudes toman valores de 0 si no comparten alelos un par cualquiera de poblaciones, a 1 si ambas tienen las mismas frecuencias alélicas:

$$I = \frac{J_{xy}}{\sqrt{J_{xx}J_{yy}}}, \text{ donde } J_{xy} \text{ es la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de una población sean}$$

idénticos, J_{xx} y J_{yy} son las probabilidades de homocigosis en la población X y Y, respectivamente (Hartl y Clark 1989). La distancia genética toma valores de 0 si las poblaciones tienen frecuencias alélicas idénticas, hasta ∞ si las poblaciones no comparten alelos, y se estima como:

$$D = -\ln I.$$

Relaciones genéticas entre poblaciones

Con el fin de obtener las relaciones evolutivas entre todas las poblaciones de *R. mangle* de México, y entre poblaciones dentro de cada costa, se realizaron análisis de cúmulos (cluster analysis) usando los estimadores insesgados de la similitud en la frecuencia de los alelos de cada loci (Nei 1972). Los “clusters” fueron obtenidos usando el método de promediado aritmético, no ponderado, de par- grupo (UPGMA). Los análisis se realizaron mediante el programa Biosys-1 (Swofford y Selander 1989), y se obtuvieron los fenogramas respectivos.

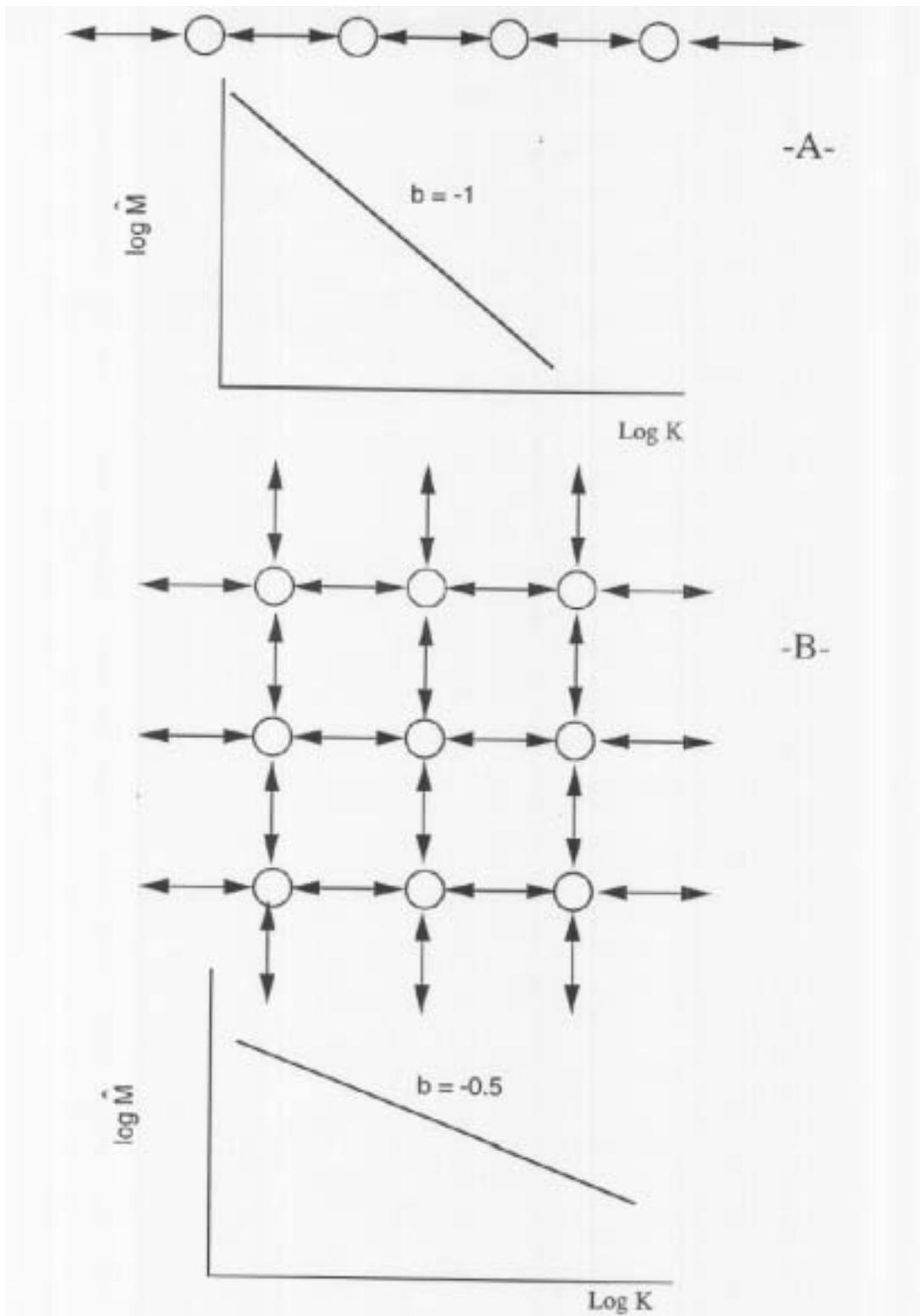


Figura. 3. Aislamiento por distancia cuando el flujo génico ocurre en una dimensión (A) y cuando es en dos dimensiones (B). Los gráficos representan la función esperada en cada condición (ver Métodos).

4

RESULTADOS

Seis enzimas tuvieron buena actividad y buena resolución en sus patrones de bandeo (Tabla 7, Figura 4), y fueron las usadas para la caracterización genética de las poblaciones de *R. mangle*. La enzimas son: AcPh, PGI, LAP, ME, MNR, RUB, para un total de 9 loci. Seis loci resultaron polimórficos (Tabla 7; Fig. 4A-F).

Tabla 7. Enzimas (loci) y sistemas ensayados en las poblaciones de *R. mangle*. (Sistemas de buffer y sus claves en tabs. 4,5, y 6.)

LOCUS	Número de alelos	SISTEMA BUFFERS
MNR-1	3	D
MNR-2	2	D
MNR-3	1	D
LAP	2	B
PGI-1	1	B
PGI-2	4	B
AcPh-1	1	C
AcPh-2	3	C
ME	2	C
RUB	1	B

Variabilidad genética de las poblaciones

Niveles entre moderados y altos de variabilidad genética (polimorfismo, heterocigosis y número promedio de alelos por locus) fueron detectados en 14 poblaciones de *R. mangle* de México (Tabla 8). La heterocigosis promedio obtenida para todas las poblaciones de *R. mangle*, en todos los loci, basada en el conteo directo fue de 0.15 (E.E. = 0.015), mientras que el estimador insesgado de la heterocigosis esperada (Nei 1978) obtenido fue de 0.16 (E.E. = 0.012). No obstante, a nivel local hubo una amplia variación en los niveles de heterocigosis observada (0.00-0.17) y esperada (0.06-0.22). La población de *R. mangle* de Ría Lagartos presentó los menores valores de heterocigosis esperada por locus (0.06), mientras que Cd. del Carmen, Centla, Chacagua, San Blas, Topolobampo

y Tamiahua presentaron los mayores niveles de heterocigosis esperada ($H \geq 0.15$; Tabla 8). El número promedio de alelos por locus fue de 1.52 (E.E. = 0.07), con el mayor número promedio de alelos en Chantuto (2.1) y el menor en Punta Paila, Sontecomapan y Ría Lagartos (1.2; Tabla 8). En términos generales, la variación genética, en todas las medidas, es mayor en las poblaciones del Pacífico que en las del Atlántico, con excepción de la heterocigosis observada cuyo promedio es similar en ambas costas (Tabla 8).

Tabla 8. Medidas de variabilidad genética medidas en catorce poblaciones de *Rhizophora mangle* de ambas costas de México.

POBLACIÓN	No.Ind. colectados	No. promedio individuos por locus	Número promedio alelos por locus	Porcentaje Loci polimórficos	Heterocigosis promedio	
					Conteo directo	HdyWbg (esperado)
Celestún	50	47.4 (1.6)	1.4 (0.2)	37.5	0.101 (0.101)	0.125 (0.071)
Ría Lagartos	50	49.3 (0.6)	1.3 (0.2)	25.0	0.03 (0.03)	0.066 (0.054)
PUNTA ALLEN	50	46.1 (2.8)	1.4 (0.2)	37.5	0.018 (0.018)	0.103 (0.055)
Sontecomapan	50	45.3 (0.5)	1.1 (0.1)	12.5	0.000 (0.000)	0.062 (0.062)
Centla	50	48.1 (1.1)	1.5 (0.2)	37.5	0.123 (0.108)	0.151 (0.078)
Tamiahua	50	39.6 (0.7)	1.4 (0.2)	37.5	0.109 (0.109)	0.133 (0.077)
Tuxpan	50	42.1 (1.5)	1.4 (0.2)	25.0	0.096 (0.089)	0.108 (0.068)
Cd. Carmen	50	45.0 (0.0)	1.6 (0.3)	37.5	0.072 (0.063)	0.197 (0.093)
PROMEDIO ATLANTICO	50	45.2 (1.2)	1.35 (0.06)	36.08 (4.89)	0.150 (0.025)	0.146 (0.019)
Chantuto	50	44.8 (0.3)	2.1 (0.4)	75.0	0.111 (0.065)	0.214 (0.061)
Chacagua	50	44.9 (0.1)	1.8 (0.3)	62.5	0.112 (0.067)	0.166 (0.074)
Coyuca	50	40.0 (0.0)	2.0 (0.3)	62.5	0.178 (0.055)	0.158 (0.064)
San Blas	50	44.8 (0.3)	1.8 (0.3)	50.0	0.088 (0.050)	0.173 (0.069)
Topolobampo	50	45.0 (0.0)	1.8 (0.3)	50.0	0.100 (0.062)	0.166 (0.062)
Kino	50	45.0 (0.0)	1.6 (0.2)	50.0	0.083 (0.074)	0.148 (0.062)
PROMEDIO PACIFICO	50	41.5 (1.07)	1.766 (0.06)	57.23 (3.45)	0.148 (0.017)	0.181 (0.009)

FOSFATASA ÁCIDA

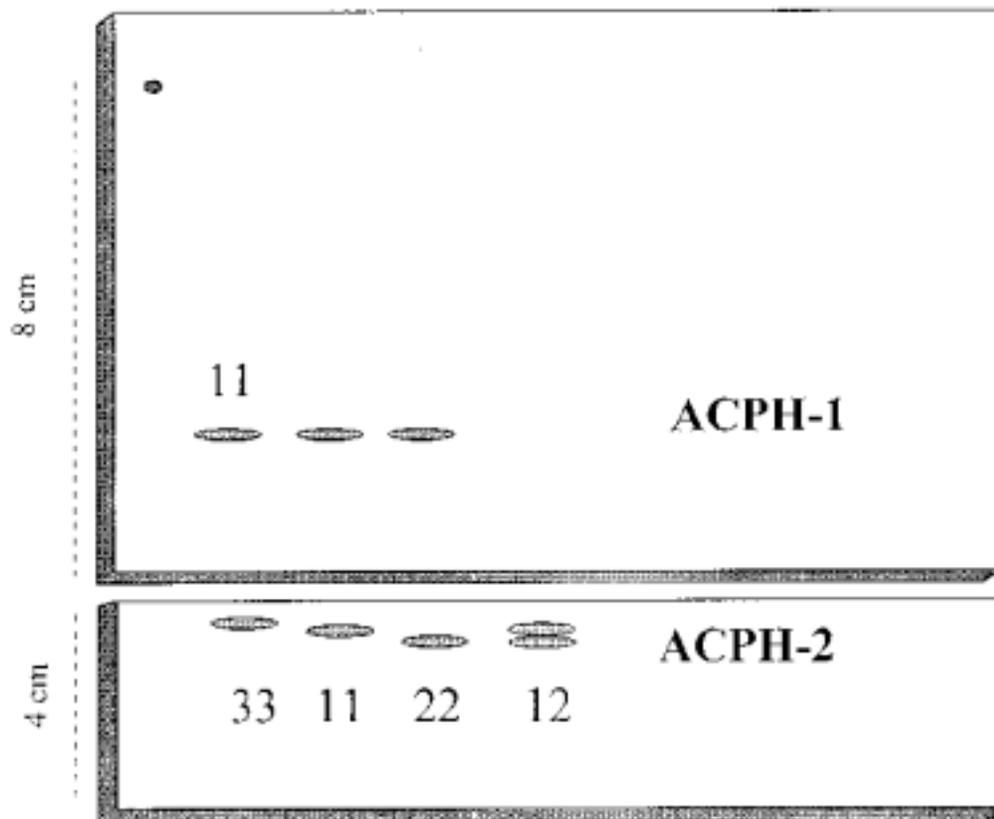


Figura 4A. Zimograma de la enzima ACPH en *Rhizoglyphus nigricans*.

LEUCIN-AMINO FOSFATASA

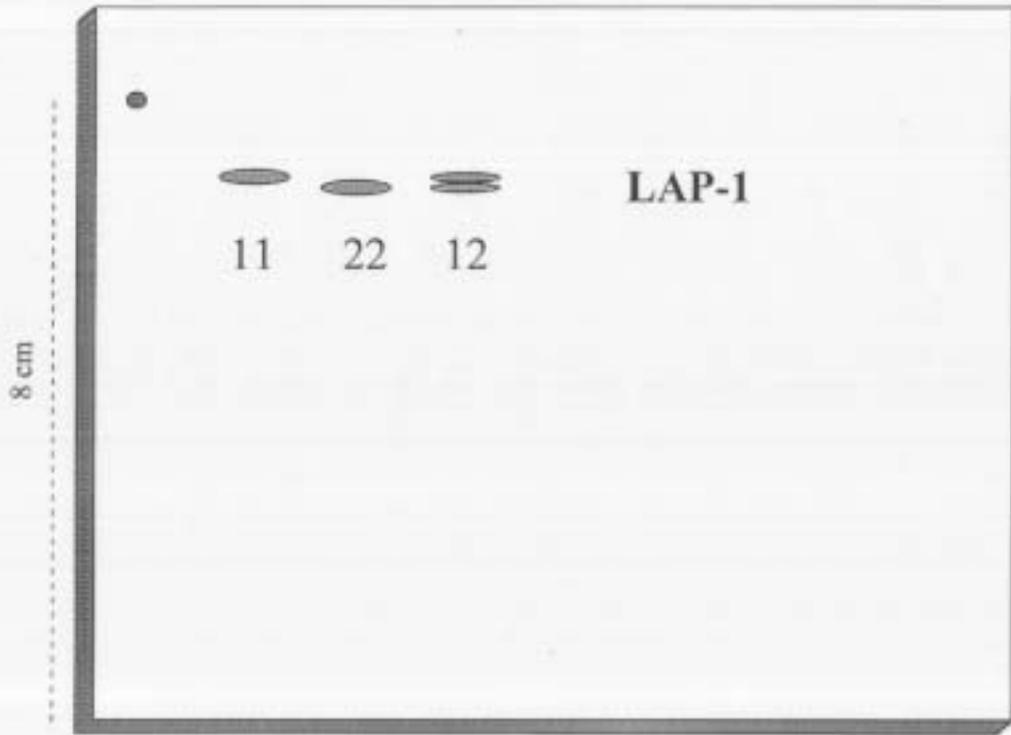


Figura 4B. Zincograma de la enzima LAP en *Rhizoglyphus microsporus*.

ENZIMA MÁLICA

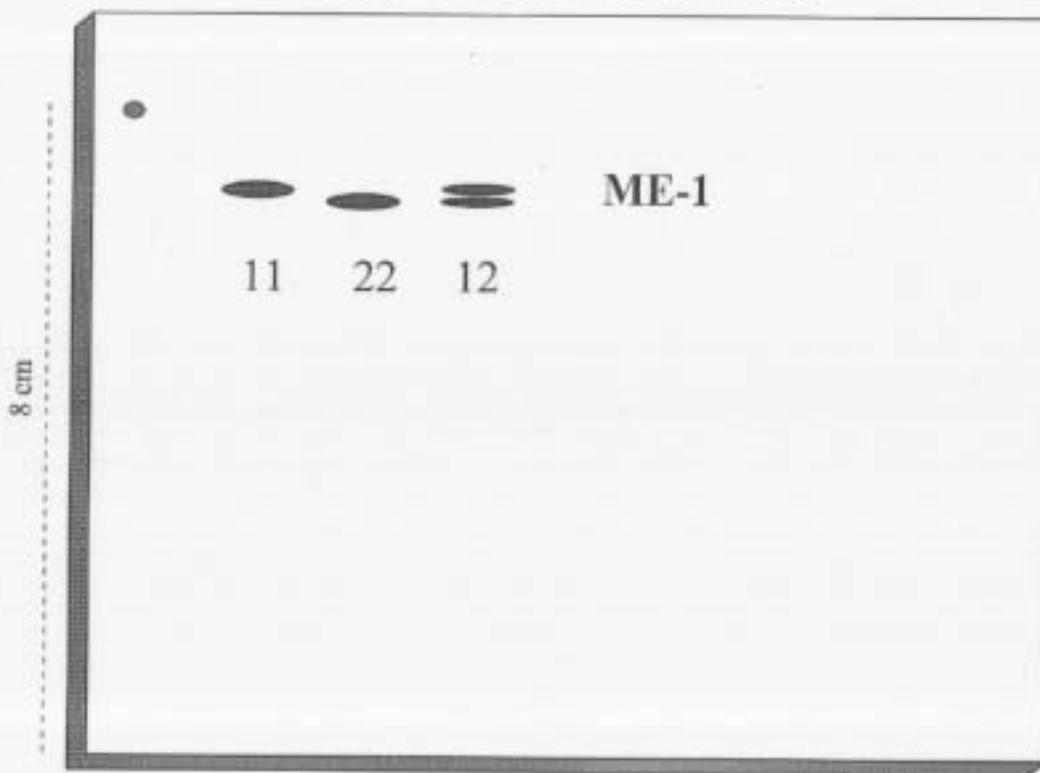
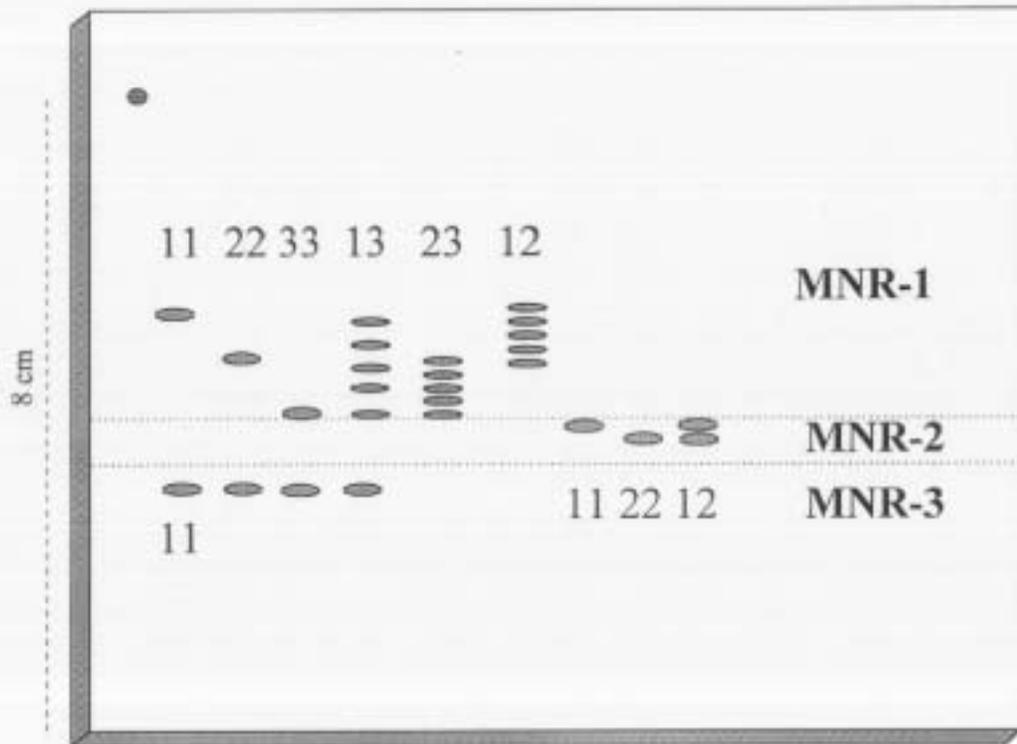


Figura 4C. Zimograma de la enzima ME en *Rhizoglyphus mozambicus*

MENADIONA REDUCTASA

Figura 4D. Zimogramas de la enzima MNR en *Rhizoglyphus mungii*



FOSFOGLUCOSA ISOMERASA

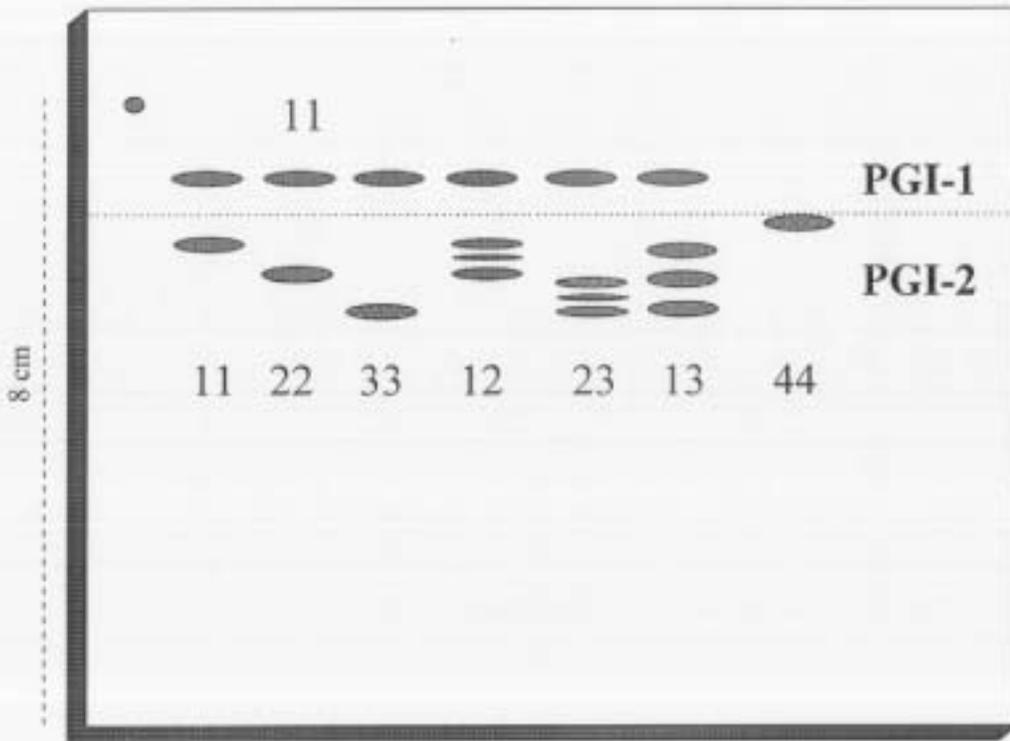


Figura 4E. Zincograma de la enzima PGI en *Rhizophora mangle*.

RUBISCO

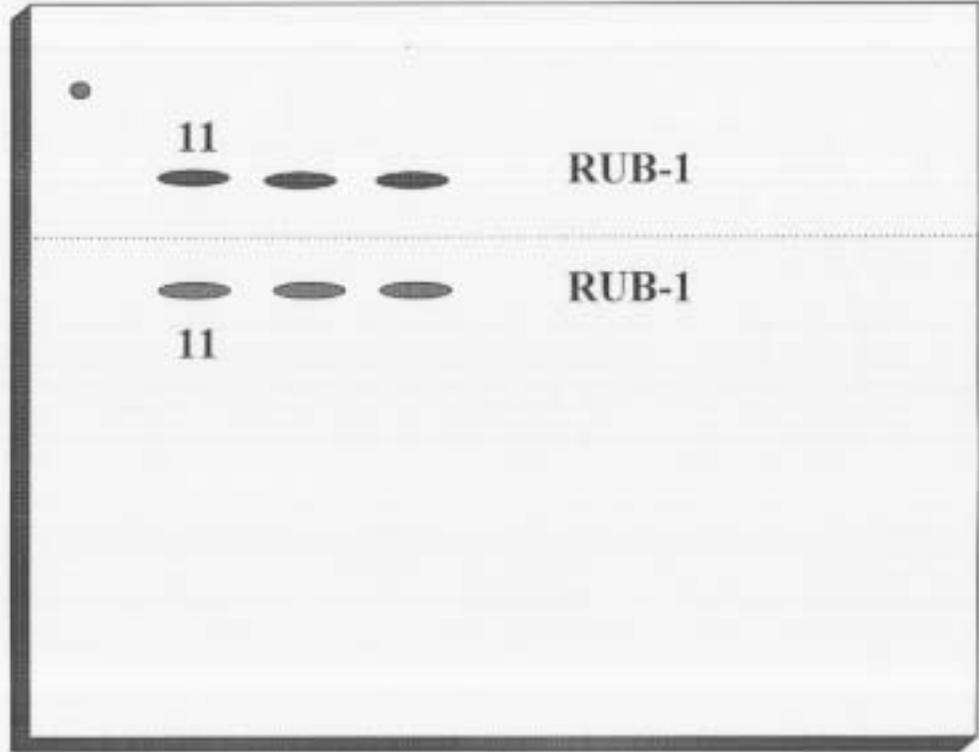


Figura 4F: Zimnograma de la enzima RUB en *Rhizoglyphus mosaicus*

Frecuencias alélicas

Las frecuencias alélicas para todos los loci analizados se presentan en el Apéndice, y la frecuencia relativa de cada alelo, en cada localidad, se presenta en las figura 5. Se encontraron diferencias marcadas en las frecuencias entre poblaciones para MNR-1 y MNR-2, siendo éstas monomórficas en la costa del Atlántico y polimórficas en el Pacífico (Fig. 5D y E). En PGI-2 se encontraron dos alelos exclusivos (3 y 4), aunque en frecuencias bajas, en las poblaciones de la costa del Pacífico (Fig. 5F). En contraste, el alelo 1 de la isoenzima ME-1 es más frecuente en las poblaciones del Atlántico que en las del Pacífico (Fig. 5C). El alelo más raro de la isoenzima LAP se ha perdido en varias poblaciones de ambas costas (Tamiahua, Sontecomapan y Celestún en el Atlántico, y Chacagua en el Pacífico; Fig. 5B). Finalmente, las frecuencias alélicas de la AcPh-2 en el Pacífico son similares entre sí, mientras que en el Atlántico la población de Cd. del Carmen es la más disímil, ya que es la única que presenta el alelo 3 (Fig.5A).

Similitud y distancia genética entre poblaciones

Los estimadores insesgados (Nei 1978) de la distancia genética entre poblaciones de *R. mangle* fueron, en general, pequeños aunque hubo variación amplia ($0 \leq D \leq 0.157$) (Tabla 2A). La máxima distancia genética registrada ($D = 0.157$) se observó entre las poblaciones de Bahía Kino, Sonora y Punta Allen, Quintana Roo (Tabla 9). A pesar de que la distancia genética máxima se obtuvo entre poblaciones de distinta costa, hubo poblaciones que mostraron distancias dentro de la costa del Atlántico grandes (e.g., $D = 0.136$ entre Cd. del Carmen y Sontecomapan). Esto ocurrió aún entre poblaciones geográficamente cercanas (e.g., $D = 0.105$ entre Cd. del Carmen y Centla; Tabla 9). Distancias genéticas pequeñas se observaron tanto entre poblaciones dentro de cada costa como entre costas (Tabla 9).

La distancia genética promedio entre poblaciones de cada costa fue relativamente pequeña ($D = 0.057$; Tabla 10). Los resultados indican que las poblaciones de la Costa del Pacífico son poco distintas entre sí ($D = 0.014$), mientras que las poblaciones del Atlántico son más distantes genéticamente entre ellas ($D = 0.048$).

Figura 5a. Frecuencias alélicas de la enzima Acph-2 en las poblaciones de *Blattella germanica*

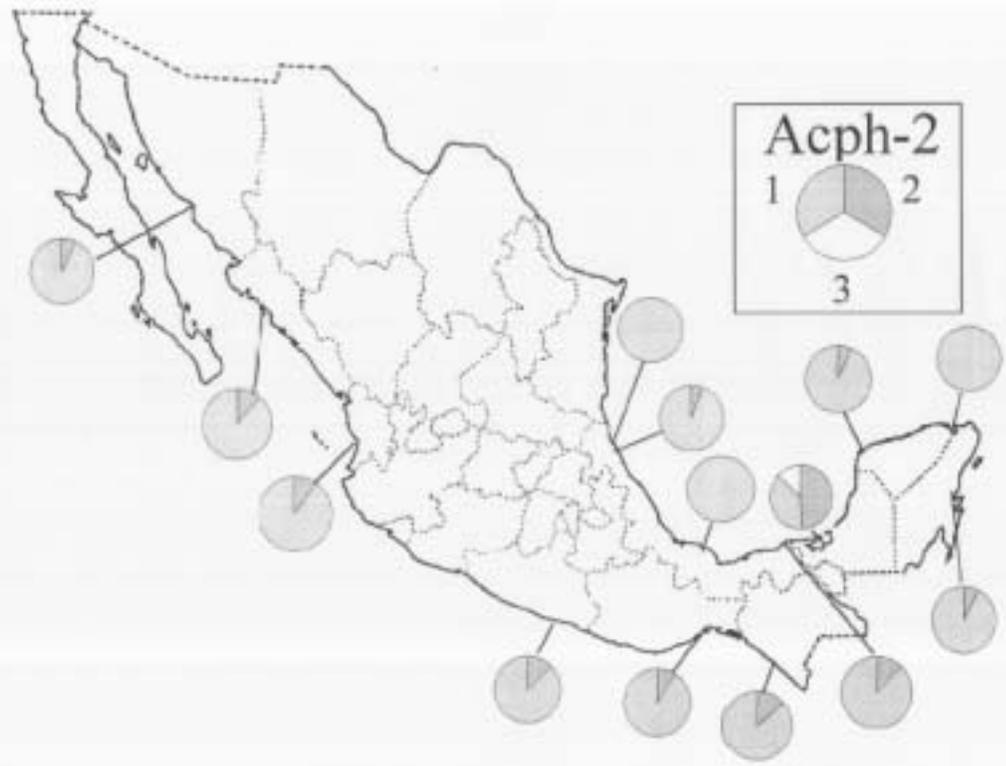


Figura 5B. Frecuencias alélicas de la enzima LAP en las poblaciones de *Photoperla mayae*

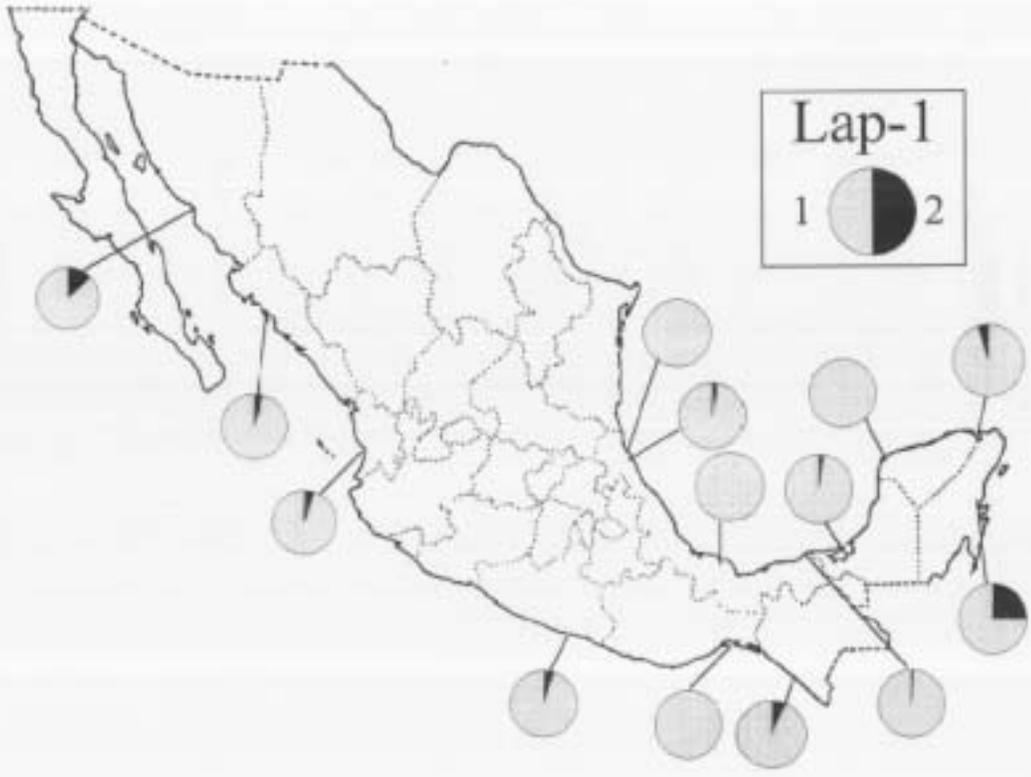


Figura 3C. Frecuencias alélicas de la enzima ME1 en las poblaciones de *Rhizoglyphus moryella*

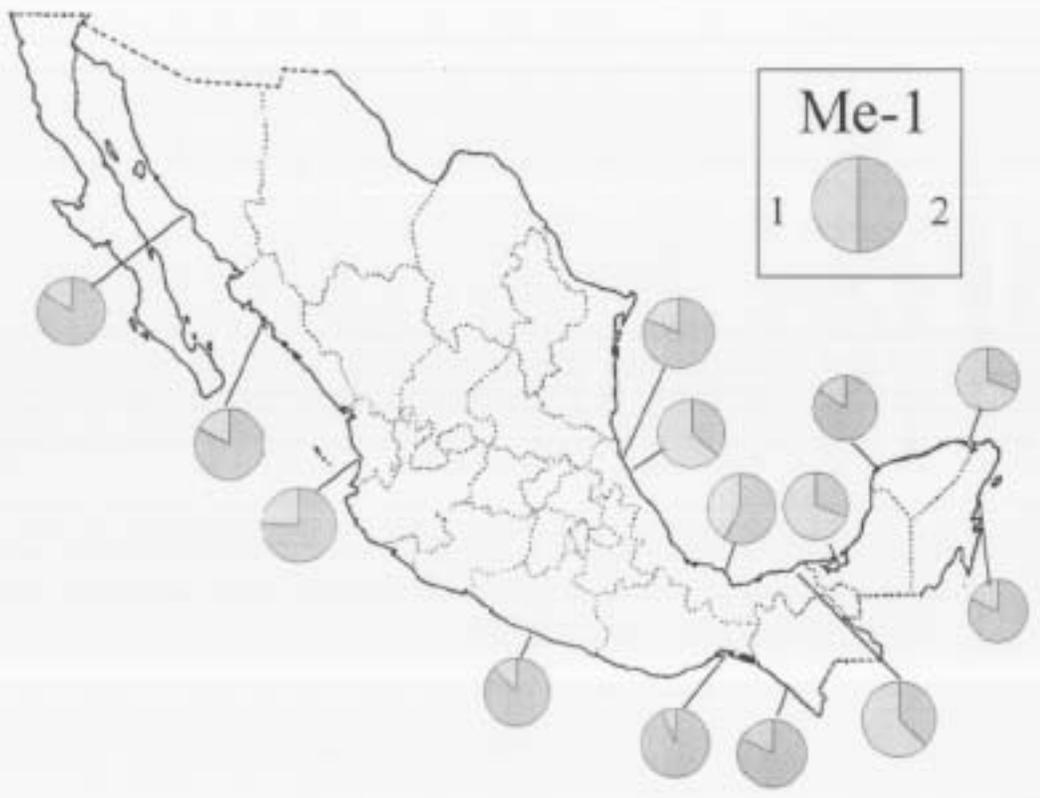


Figura 5D. Frecuencia alélica de la enzima Mnr-1 en las poblaciones de *Rhizophora mangle*

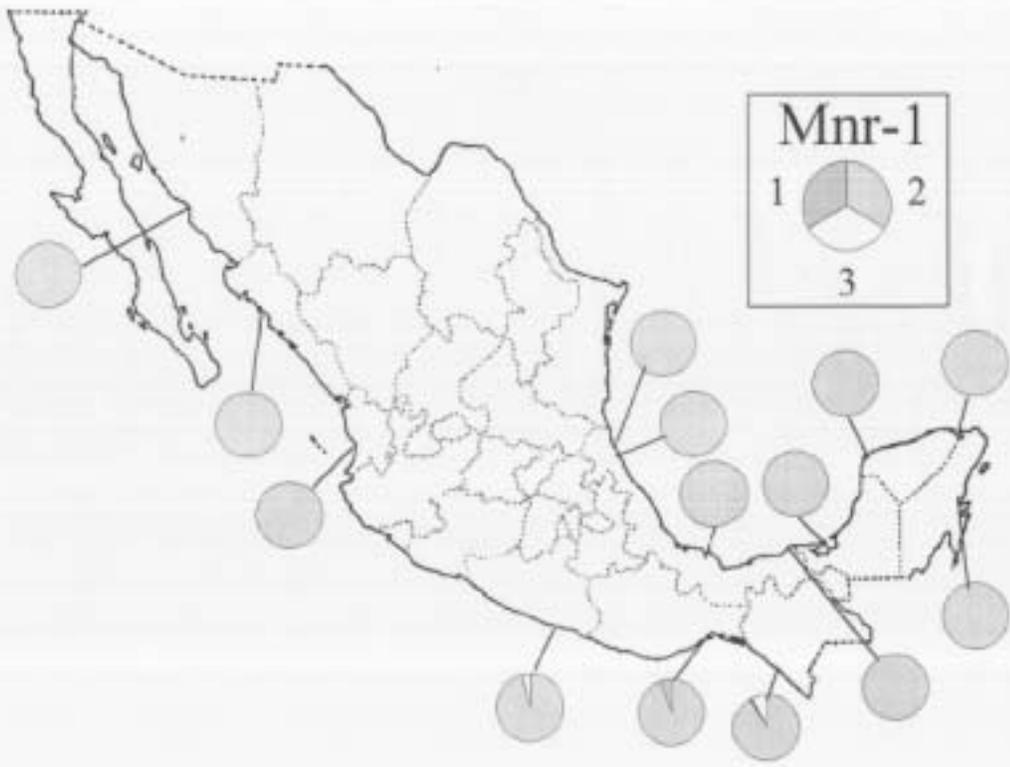


Figura SF. Frecuencia alélica de la enzima Pgi-2 en las poblaciones de *Microporus musciv*

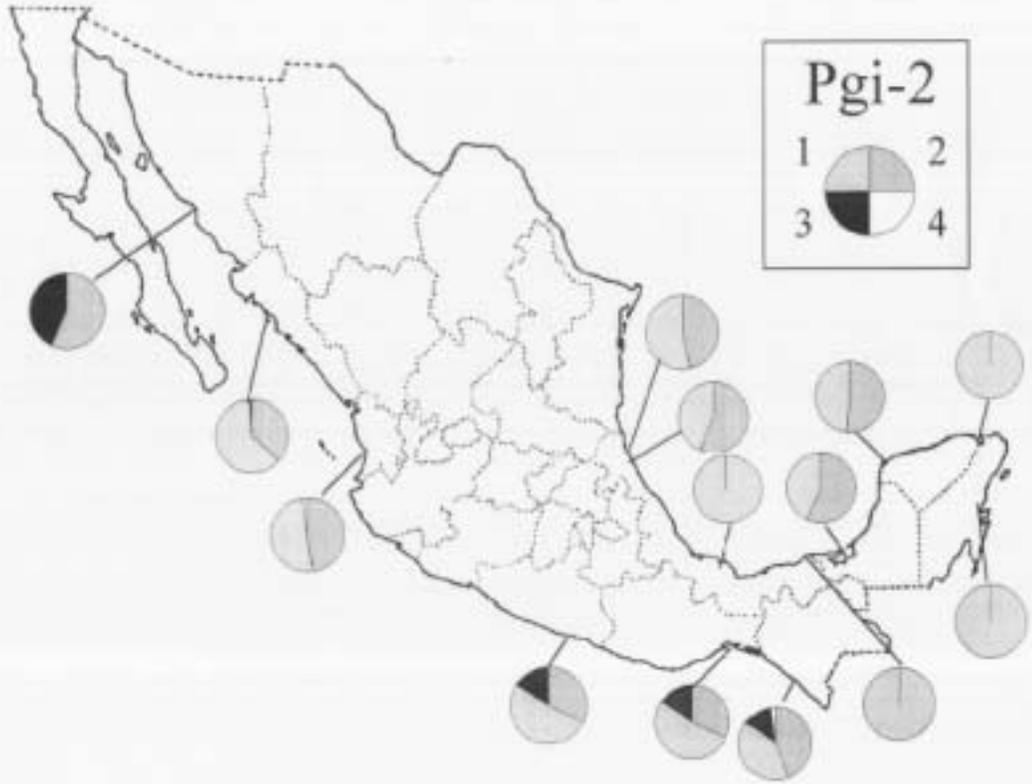


Tabla 10. Matriz de distancias (A) e identidades (B) genéticas promedio entre poblaciones de *R. mangle* en cada costa y entre costas de México.

-A-

COSTA	NO. DE POBLACIONES	ATLÁNTICO	PACÍFICO
ATLÁNTICO	8	0.048	0.057
PACÍFICO	6		0.014

-B-

COSTA	NO. DE POBLACIONES	ATLÁNTICO	PACÍFICO
ATLÁNTICO	8	0.953	0.946
PACÍFICO	6		0.987

Estadísticos F de Wright

Los estimados de los estadísticos F de Wright (1978) para todas las poblaciones de *Rhizophora mangle* en su conjunto, fueron significativamente mayores de cero, indicando deficiencia de heterocigotos dentro de las subpoblaciones (F_{is}) y entre las subpoblaciones (F_{st}) (Tabla 11A). La F_{is} promedio fue de 0.459 indicando un exceso de homocigotos, posiblemente como resultado de autofertilizaciones y cruce entre parientes. Valores de F_{is} de esta magnitud no se han reportado para árboles tropicales, pero coinciden con los reportados para hierbas que se autopolinizan (Eguiarte 1990). De igual forma, los valores de F_{is} encontrados podrían ser explicados por los valores de polinización cruzada (t) estimados en otras poblaciones de *R. mangle* en Puerto Rico, donde $t = 28.8\%$ (Klekowski et al. 1994). Bajo el supuesto de que la única fuente de endogamia fuera la autofertilización, Haldane (1924) derivó la fórmula para obtener la tasa de entrecruzamiento en el equilibrio como: $t = \frac{1-f}{1+f}$. Aplicándola para el caso de *R. mangle* y usando el estimador F_{is} , obtenemos una $t = 37\%$.

La F_{st} indica que existen diferencias significativas en la variación genética entre poblaciones de *R. mangle*. Esto implica del total de la variación genética existente en *R. mangle*, 22.5% se debe al componente entre poblaciones, mientras que el 77.5% de la variación se encuentra en el componente dentro de las poblaciones. El grado de diferenciación es elevado, ya que estos niveles no se han encontrado en árboles y si en hierbas (Eguiarte 1990). Los valores de diferenciación encontrados coinciden con los encontrados en plantas con un sistema de cruzamiento mixto (Hamrick y Godt 1996).

Al analizar por separado a las poblaciones de ambas costas, los niveles de F_{is} son similares entre costas ($0.4 \leq F_{is} \leq 0.5$), sin embargo el grado de diferenciación, F_{st} , es distinto. En las poblaciones del Pacífico F_{st} toma valores de 0.06, mientras que en la costa del Atlántico $F_{st} = 0.26$, indicando que las poblaciones del Pacífico son muy parecidas entre sí, mientras que en el Atlántico existe un fuerte diferenciación genética entre ellas (Tabla 11 B, C).

Tabla 11. Estimaciones de los estadísticos F de Wright calculados independientemente para cada locus de *Rhizophora mangle* en las poblaciones de ambas costas de México (A), y de manera independiente para la costa del Pacífico (B) y Atlántico (C). Los promedios y el error estándar se obtuvieron mediante Jackknife en todos los loci, y los intervalos de confianza (al 95%) fueron calculados usando “bootstrap” sobre todos los loci. Los equivalentes de los estadísticos F fueron aproximados mediante las expresiones de Weir y Cockerham (1984). El cálculo se hizo usando el programa de Weir (1990).

-A-

LOCUS	F=Fit	$\theta = F_{st}$	f = Fis
MNR-1	0.183	0.047	0.142
MNR-2	0.019	0.104	-0.095
LAP	0.966	0.075	0.963
PGI-2	0.176	0.262	-0.116
AcPh-2	0.944	0.180	0.932
ME	0.947	0.266	0.928
Promedio	0.581	0.225	0.459
Error estándar	0.297	0.032	0.379
Intervalo de confianza al 95%	0.1796-0.94	0.098-0.256	-0.074-0.922

-B-

LOCUS	F=Fit	$\theta = F_{st}$	f = Fis
MNR-1	0.175	0.037	0.143
MNR-2	-0.062	0.029	-0.094
LAP	1.000	0.013	1.000
PGI-2	0.258	0.123	0.154
AcPh-2	1.000	0.000	1.000
ME	0.915	0.005	0.915
Promedio	0.475	0.058	0.442
Error estándar	0.215	0.048	0.247
Intervalo de confianza al 95%	0.166-0.933	-0.001-0.103	0.116-0.933

-C-

LOCUS	F=Fit	$\theta = F_{st}$	f = Fis
LAP	0.935	0.143	0.925
PGI-2	0.020	0.348	-0.504
AcPh-2	0.912	0.315	0.871
ME	0.946	0.172	0.934
Promedio	0.612	0.257	0.478
Error estándar	0.377	0.073	0.551
Intervalo de confianza al 95%	0.020-0.945	0.160-0.344	-0.504-0.934

Estimaciones indirectas de flujo génico

Sewall Wright (1951) demostró que para poblaciones en equilibrio entre deriva génica y migración, se puede obtener un estimado indirecto del flujo génico Nm . Los estimados Nm , corregidos por Crow y Aoki (1984) fueron $Nm = 0.748$ para todas las poblaciones de *R. mangle* de ambas costas de México. Este valor de flujo génico es bajo y sugiere evolución independiente y la diferenciación podría ser resultado de la deriva o la selección (Wright 1969).

Al estimar el flujo génico entre las poblaciones (ec. 2) dentro de cada costa encontramos patrones contrastantes. En la costa del Pacífico se obtuvo el estimado $Nm = 3.14$, que indica que el flujo génico es importante y las poblaciones no se están diferenciando, mientras que en el Atlántico $Nm = 0.55$ indica una fuerte diferenciación entre las poblaciones. Además, para la costa del Atlántico se pudo estimar Nm mediante el método de los alelos privados (Slatkin 1985), ya que en la población de Cd. del Carmen se encontró de manera exclusiva el alelo 3 de la enzima AcPh-2. El valor estimado fue $Nm = 0.433$, corroborando la estimación de que existe poco flujo génico entre las poblaciones del Atlántico y alta diferenciación genética.

Debido a que la estimación de flujo génico usando el método de los alelos privados puede ser impreciso debido a problemas en el muestreo, se estimó Nm para pares de poblaciones (\hat{M}) para detectar el efecto del aislamiento por distancia, suponiendo flujo génico de una población con las inmediatamente adyacentes (*cf.* Fig. 3). La estimación de \hat{M} , se basa en obtener F_{st} para pares de poblaciones (usando θ o G_{st} ; Slatkin 1993). Para poblaciones en equilibrio entre el flujo génico y deriva se espera una pendiente de -1 o -0.5 para la relación $\log \hat{M}$ vs. \log distancia geográfica cuando el flujo génico es en una dimensión o en dos dimensiones, respectivamente (Fig. 3).

Los resultados obtenidos muestran que las poblaciones de *R. mangle* no se encuentran en equilibrio deriva-migración (Fig. 6). Este resultado es consistente usando a θ o G_{st} como estimador de F_{st} . En ambas costas las poblaciones no siguen un patrón de aislamiento por distancia, es decir el flujo génico entre poblaciones no se relaciona con la distancia geográfica entre ellas. Sin embargo, el análisis gráfico permite ver los patrones de flujo génico entre las poblaciones. En el Atlántico los valores de \hat{M} son generalmente pequeños y sólo algunas poblaciones tienen un

elevado flujo génico (Fig. 6), aunque no son necesariamente las más cercanas entre sí. Los resultados sugieren que las poblaciones del Atlántico tienen bajos niveles de flujo genético corroborando los análisis previos. En contraste, aunque las poblaciones del Pacífico tampoco siguen un patrón de flujo génico esperado bajo el modelo de aislamiento por distancia al igual que las del Atlántico, en éstas el flujo génico es mucho más alto, lo cual indica una diferenciación genética baja entre ellas (Fig. 6).

Relaciones filogenéticas entre las poblaciones

El fenograma de las relaciones filogenéticas entre poblaciones de *R. mangle* del Atlántico (UPGMA; Fig. 7A) indica una fuerte diferenciación entre las poblaciones de tres grupos: uno formado por las poblaciones del Caribe, incluyendo a Sontecomapan (Punta Allen, Ría Lagartos), otro que agrupa a las poblaciones de Tamiahua, Celestún, Centla y Cd. del Carmen, y un grupo formado sólo por Tuxpan (Fig. 7A). Las poblaciones de Celestún, Centla y Tamiahua tienen similitudes genéticas muy altas entre ellas (i.e., $I \geq 0.99$). Claramente, las relaciones genéticas entre las poblaciones de la costa del Golfo de México y Mar Caribe muestran poca relación con respecto a su posición geográfica. En contraste, en el Pacífico las distancias genéticas entre las poblaciones son más pequeñas, siendo la población de Bahía Kino la más distante (i.e., $I \geq 0.97$; Fig. 7B). Dentro del segundo grupo, Chacagua es la más diferenciada respecto de Chantuto, Coyuca, San Blas y Topolobampo, las cuales tienen una similitud genética muy grande (i.e., $I \geq 0.99$).

Al hacer el análisis global, los resultados anteriores se mantienen y se constituyen tres grupos: las poblaciones del Golfo, las del Caribe más Sontecomapan y las del Pacífico que incluyen a la población de Tuxpan (Fig 7C).

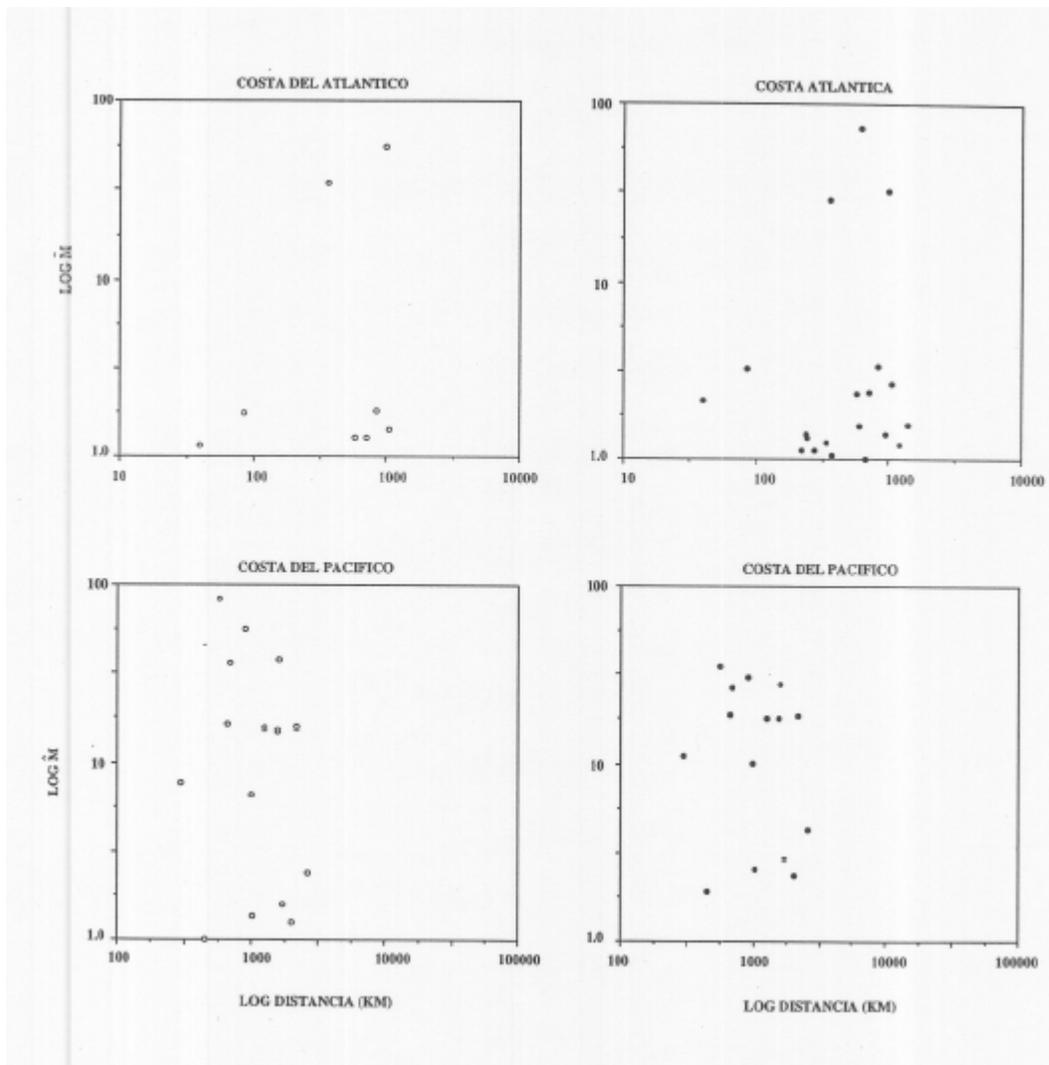


Figura 6. Relación del flujo génico (M ; individuos por generación) con la distancia geográfica que separa a las poblaciones. Se presentan las estimaciones para la costa del océano Atlántico y del Pacífico usando a_e (Weir y Cockerham 1984) y G_{st} (Nei 1973) como los estimadores de F_{st} (ver Slatkin 1993). Los valores negativos de M obtenidos en varias comparaciones del Atlántico fueron excluidos.

Figura 7A. Fenograma basado en la similitud genética entre las poblaciones de *Melospiza cinerea* de la costa del Atlántico.

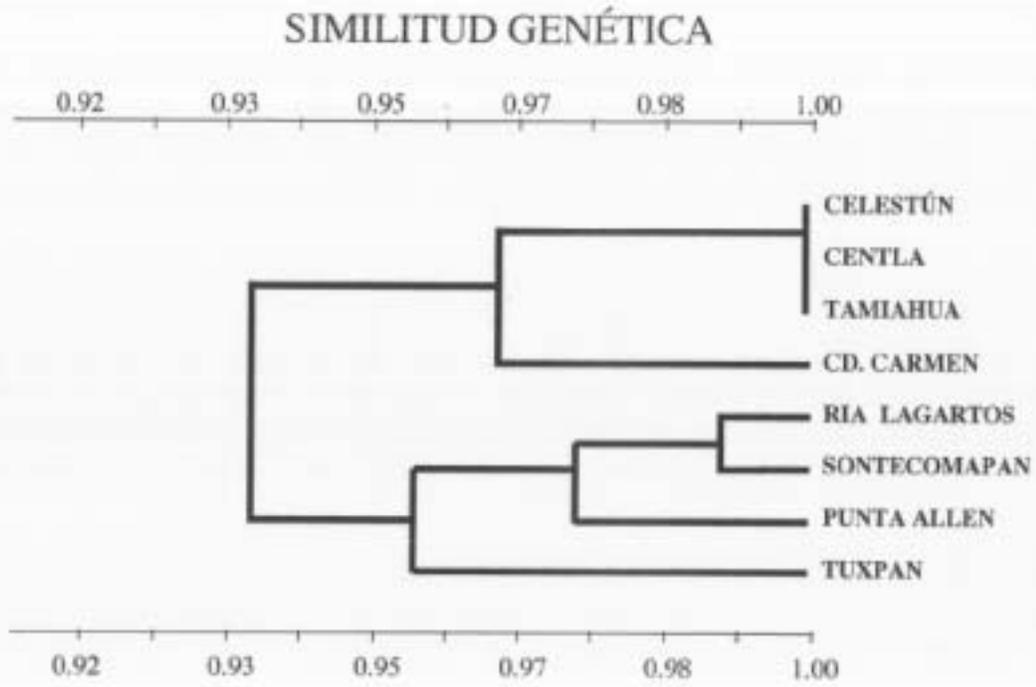
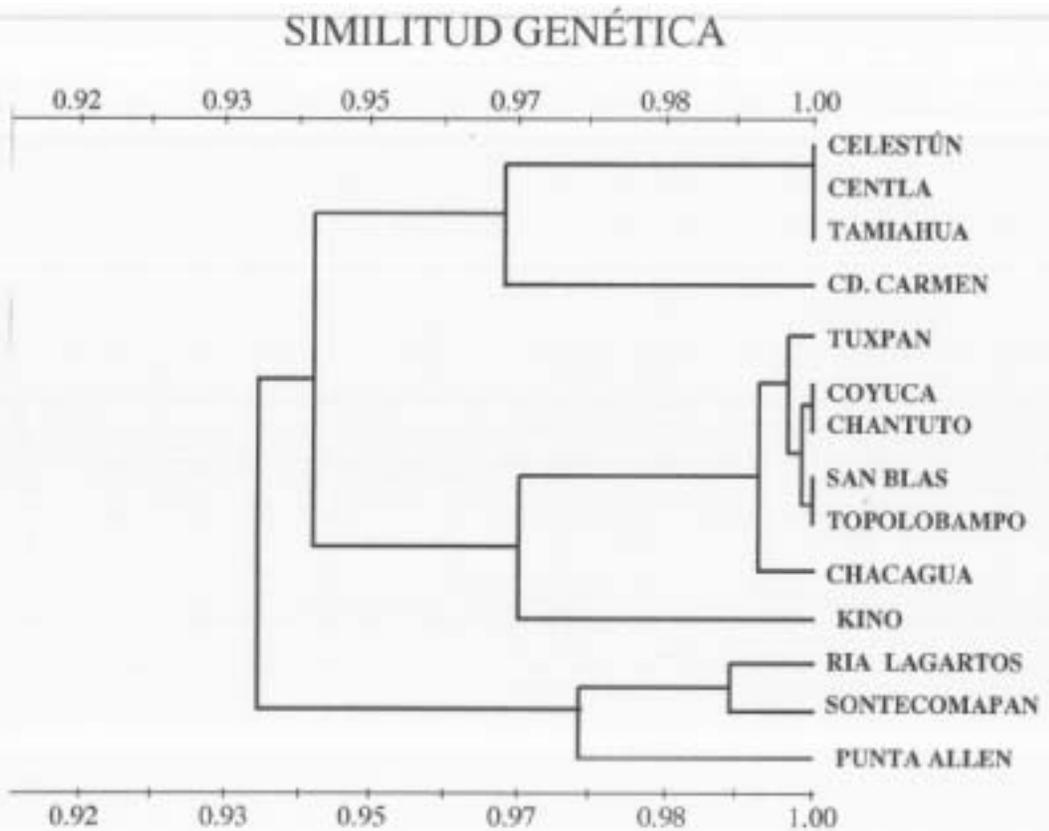


Figura 7C. Fenograma basado en la similitud genética entre las poblaciones de *Melospiza cinerea* de ambas costas de México.



5

DISCUSIÓN GENERAL

Los resultados del presente estudio indican que existe diferenciación genética entre las poblaciones de *R. mangle* en México, así como niveles elevados de endogamia dentro de las poblaciones. La diferenciación genética es mayor entre poblaciones ubicadas en el Golfo de México y Mar Caribe (Atlántico), que entre las poblaciones de la Costa del Pacífico. Dados los patrones de variabilidad y diferenciación genética generalmente encontrados en especies arbóreas tropicales (*cf.* Eguiarte 1990), los resultados obtenidos para *R. mangle* en este estudio son sorprendentes. Al mismo tiempo, los hallazgos de este estudio sugieren que las estrategias de conservación de la diversidad genética deben diferir de las propuestas hechas hasta ahora para especies arbóreas tropicales, donde la diferenciación genética entre poblaciones es baja y no se requiere, por ello, mantener un número elevado de poblaciones para matener la diversidad genética total de la especie (Eguiarte et al. 1992).

Los patrones y niveles de la distribución de la variación genética en esta especie impone limitaciones fuertes a la conservación si consideramos dos criterios de conservación: variabilidad genética dentro de cada población y variabilidad genética entre poblaciones (Tabla 12). Como puede apreciarse de la Tabla 12, el caso de *R. mangle* es uno de los más complicados ya que la variación está repartida entre poblaciones y dentro de las poblaciones.

Electroforesis

El estudio de la genética de poblaciones de árboles tropicales usando electroforesis, y en particular de especies de manglar (MacMillan, 1986 ; Goodall y Stoddart 1989), ha sido difícil por la gran cantidad de compuestos secundarios que poseen que interfieren con la actividad enzimática y por lo tanto con la interpretación genética. Por ello es necesario realizar un sinnúmero de ensayos de

Tabla 12. Poblaciones de una especie e individuos por población necesarios para conservar la variabilidad genética. Se ofrecen como ejemplo algunas especies de plantas mexicanas.

		DIFERENCIACIÓN GENÉTICA ENTRE POBLACIONES	
		BAJA	ALTA
VARIACIÓN GENÉTICA DENTRO DE LAS POBLACIONES	BAJA	Pocas poblaciones Pocos individuos por población <i>v.gr., Datura stramonium</i> (Núñez-Farfán 1991)	Muchas poblaciones Pocos individuos por población <i>v.gr., Phaseolus spp.</i> L.E. Eguiarte, obs. pers.)
	ALTA	Pocas poblaciones Muchos individuos por población <i>v.gr., Astrocaryum mexicanum</i> (Eguiarte et al. 1992, 1993). <i>Cecropia obtusifolia</i> (Alvarez-Buylla y Garay 1994)	Muchas poblaciones Muchos individuos por población <i>v.gr., Rhizophora mangle</i> (este estudio)

buffers de extracción de compuestos secundarios y sistemas de corrimiento. En el presente estudio logramos resolver estos problemas usando el buffer de extracción desarrollado por Goodall y Stoddard (1989; ver Métodos), pero pudimos resolver un número mayor de enzimas que ellos, lo cual hizo posible el presente estudio.

Variación genética en Rhizophora mangle

En términos generales, los niveles de variabilidad genética en las poblaciones de *R. mangle* son,

aunque moderados, comparativamente altos respecto a los reportados en árboles tropicales (Eguiarte 1990). El polimorfismo obtenido fue $P = 45\%$ vs. 24% en 16 especies de árboles tropicales de Barro Colorado (Eguiarte 1990). Por otra parte, la heterocigosis esperada para *R. mangle* fue $H = 0.16$, mientras que para los árboles de Barro Colorado fue de 0.09 (Eguiarte 1990). Los niveles encontrados en *R. mangle* es cercano a los obtenidos en coníferas ($P = 25\%$; $H = 0.13$), que es un grupo de plantas muy variable.

Es interesante hacer notar que el nivel de variación genética de *R. mangle* varía entre poblaciones, y entre la Costa del Pacífico y la del Atlántico. En general, las poblaciones del Pacífico tienen niveles más altos de variación que las del Atlántico. Esto posiblemente se deba a tamaños efectivos de población menores en el Atlántico o a eventos fortuitos, como la colonización reciente de varias poblaciones por pocos individuos.

Los resultados también son contrastantes con los obtenidos con *R. stylosa*, de donde el nivel de polimorfismo fue $P = 14\%$ (Goodall y Stoddard 1989). No existen otros datos comparables con especies arbóreas de manglar.

Endogamia y sistema de apareamiento

Klekowski et al. (1994) han estimado un coeficiente de endogamia (f) de 0.37 para *R. mangle* en poblaciones del Caribe, lo cual es cercano al valor promedio obtenido en las poblaciones de *R. mangle* de México ($Fis = 0.46$). Valores positivos de Fis indican endogamia (*i.e.*, exceso de homocigotos). La endogamia puede ser el resultado de autopolinización o de la cruce entre individuos emparentados. Las observaciones de biología floral sugieren que la autopolinización es frecuente en *R. mangle* (Tomlinson 1994), y esta explicación es apoyada por los datos obtenidos en poblaciones del Caribe (Lowenfeld y Klekowski 1993; Klekowski et al. 1994).

Considerando que toda la endogamia en las poblaciones estudiadas sea el resultado de autopolinización, se puede estimar la tasa de polinización cruzada (entrecruzamiento) en el equilibrio (t ; Haldane 1924). La \hat{t} fue de 0.37 , lo cual indica que 37% de las semillas son producto de fecundaciones cruzadas, y 63% producto de la autofertilización. La t promedio en

árboles es cercana a 1 (t promedio = 0.88; Eguiarte 1990), mientras que valores de entrecruzamiento bajos se han obtenido para hierbas y especies colonizadoras (t promedio = 0.42; Eguiarte 1990). Estos resultados indican al mismo tiempo que el sistema de apareamiento de *R. mangle* es mixto (Schemske y Lande 1985).

Las estimaciones obtenidas para el sistema de apareamiento en *R. mangle* permiten explicar los patrones de diferenciación genética observados y que describimos a continuación.

Diferenciación entre poblaciones de Rhizophora mangle

Los valores de F_{st} encontrados en *R. mangle* son más elevados que los encontrados hasta ahora en otras especies arbóreas tropicales (Eguiarte 1990). No obstante, la mayor contribución a la diferenciación genética de *R. mangle* es hecha por las poblaciones del Atlántico ($F_{st} = 0.26$), mientras que en el Pacífico la diferenciación es menor ($F_{st} = 0.06$). Mientras que las poblaciones del Pacífico tienen una F_{st} similar a la obtenida en otras especies de árboles ($F_{st} = 0.07$), la obtenida en el Atlántico es más alta aún que la F_{st} promedio obtenida en 34 especies de hierbas ($F_{st} = 0.15$; Eguiarte 1990).

En términos generales, las relaciones genéticas entre las poblaciones indican que en el Pacífico forman un grupo homogéneo y sólo la población de Bahía Kino es distinta de las demás. En contraste, en el Atlántico se forman tres grupos: uno denominado del Caribe y Sontecomapan, otro formado por las poblaciones del Golfo, Cd. del Carmen, Tamiahua y Celestún, y por último uno formado sólo por Tuxpan, que a su vez tiene similitud con las del Pacífico.

Flujo génico entre poblaciones de Rhizophora mangle

Las estimaciones indirectas de flujo génico indican valores moderados entre las poblaciones del Pacífico y bajo entre las poblaciones del Atlántico. En el Pacífico el promedio es $Nm = 3.14$ (a partir de F_{st}), y en el Atlántico $Nm = 0.43$ y $Nm = 0.55$ (usando alelos privados y F_{st} , respectivamente). Los valores encontrados en el Atlántico, al ser menores de uno, posibilitan que la deriva génica sea un proceso dominante en la diferenciación de las poblaciones, mientras que en el Pacífico el flujo

génico y/o la selección pueden jugar un papel importante.

Los análisis de aislamiento por distancia sugieren que las poblaciones no se encuentran en el equilibrio, es decir no existe una correspondencia entre el nivel de flujo génico y la distancia geográfica entre las poblaciones. Este resultado puede deberse a varios factores. Por una parte, que el flujo génico siga patrones aleatorios no esperados bajo el arreglo geográfico de las poblaciones. Por otra parte, la deriva genética o los cuellos de botella poblacionales podrían enmascarar los patrones de flujo génico original.

Evolución de Rhizophora mangle

Primack y Tomlinson (1980) y Tomlinson (1994) basados en el sistema reproductivo de las especies arbóreas de manglar han propuesto un modelo sobre la evolución genética de las poblaciones. Según su modelo, el sistema de apareamiento de estas especies daría como resultado que se comportaran como especies herbáceas colonizadoras, en lugar de especies arbóreas tropicales con niveles de entrecruzamiento elevados. Genéticamente, esto resultaría en un alto grado de endogamia y alta diferenciación entre poblaciones.

La destrucción de las poblaciones de estas especies por fenómenos naturales (*e.g.*, huracanes y recientemente humanas) y la posterior recolonización, en ocasiones por pocos individuos, puede favorecer también la diferenciación genética.

Los datos aportados en este estudio, así como los de diferenciación fenotípica en rasgos florales de *R. mangle* (Núñez-Farfán et al., 1996) y los obtenidos por Klekowski et al. (1994), apoyan el modelo anterior. Los estimados de F_{is} indican que existe un nivel alto de endogamia, mientras que el estimado de F_{st} indica una fuerte diferenciación entre poblaciones. Desde el punto de vista de la conservación, estos datos indican que el 23% de la variación genética se encuentra repartida entre poblaciones de *R. mangle*, mientras que 73% se encuentra dentro de cada una de las poblaciones. En el Atlántico, la diferenciación genética es mayor entre las poblaciones por lo que, desde el punto de vista genético, sugieren que es más factible la pérdida de variación genética si algunas poblaciones son destruidas.

De manera sorprendente, la divergencia temporal entre poblaciones de *R. mangle* en ambas costas de México no se refleja de manera clara en la divergencia genética entre ellas. El tiempo estimado del cierre del canal interoceánico en Centroamérica en el Plioceno tardío (Hace 3.5 millones de años) se esperaría que afectara la evolución de las poblaciones animales y vegetales a ambos lados (Svitil 1983, Collins et al. 1996). Por ejemplo, se ha documentado para animales que este fenómeno afectó la diversificación de corales (Collins et al. 1996). No obstante, no parece ser el caso de las plantas y en particular de *R. mangle*.

El género *Rhizophora*, al igual que otros de manglares, no tiene muchas especies (5 y tres supuestos híbridos). En América existen dos especies (*R. mangle* y *R. racemosa*), y un aparente híbrido entre ambas (*R. x harrisonii*) (Tomlinson 1994). Ninguno de los taxa está exclusivamente en la costa de Pacífico o del Atlántico para suponer que el cierre del canal interoceánico fomentó su especiación. Tampoco se detecta el efecto de este fenómeno en la divergencia genética de las poblaciones de *R. mangle* situadas a un lado y otro del Istmo de Panamá. Por ello es posible especular que las tasas de evolución en estas especies sean lentas. No obstante, otros estudios de variación genética usando isoenzimas, tampoco han encontrado relación entre la variabilidad genética y la edad geológica de las poblaciones o especies (Weller et al. 1996).

Sin embargo antes de concluir que posiblemente las tasas de evolución sean más lentas en los manglares, es posible que los marcadores genéticos usados no sean lo suficientemente sensibles para detectar la discontinuidad genética esperada entre poblaciones a un lado y otro del Istmo de Panamá. En un estudio con ostiones (*Crassostrea virginica*) no se detectó ninguna discontinuidad genética entre las poblaciones del Atlántico de Norteamérica y las del Golfo de México por medio de isoenzimas (Karl y Avise 1992), aún cuando otros organismos sí muestran una discontinuidad que obedece principalmente a la historia de las poblaciones. Por el contrario, análisis genéticos de las mismas poblaciones de *C. virginica* usando otros marcadores (DNA mitocondrial y DNA nuclear, RFLPs) sí detectan una discontinuidad entre las poblaciones del Atlántico y Golfo de México (Karl y Avise 1992).

Buscando la solución al porqué no se encontró una discontinuidad genética entre las

poblaciones de *R. mangle*, existen varias alternativas: 1) Que efectivamente las isoenzimas tengan una tasa evolutiva menor que otros marcadores genéticos (F.J. Ayala, com. pers.); 2) que exista variación enzimática críptica que sí refleje la separación entre el Pacífico y el Atlántico, pero que no fue detectada, y 3) que exista selección balanceadora sobre múltiples loci enzimáticos (Karl y Avise 1993).

El análisis genético usando isoenzimas subyace en varios supuestos, siendo el más importante, el que las enzimas sean selectivamente neutras. Si existe selección por una forma enzimática particular, entonces será difícil detectar un patrón geográfico de divergencia entre poblaciones, y éstas mostrarán homogeneidad. De la misma forma, si existe distinta probabilidad de migración de los alelos entre poblaciones o si en ciertas poblaciones algunos alelos están siendo seleccionados en contra será difícil detectar aislamiento por distancia o por separación temporal.

Finalmente, con el fin de obtener una respuesta a las nuevas interrogantes derivadas del estudio genético, creemos que es necesario abordar el problema utilizando varios marcadores genéticos a la vez. Esta perspectiva es promisoría, ya que el presente estudio han sentado las bases de nuevas investigaciones sobre la evolución de *Rhizophora mangle*, sin reducir la importancia de los estudios sobre conservación de la diversidad ya que estean íntimamente ligados.

6

LITERATURA CITADA

- Alvarez-Buylla, E. y A.A. Garay. 1994. Population-genetic structure of *Cecropia obtusifolia*, a tropical pioneer tree species. *Evolution* 48: 437-453.
- Baker, H.H. 1955. Self-compatibility and establishment after "long-distance" dispersal. *Evolution* 9: 347-349.
- Cintrón, G., A. Lugo y R. Martínez. 1985. Structural and functional properties of mangroves forest. In: D'Arcy, W.G. y M.D. Correa (eds.) *The Botanic and Natural History of Panama. Monogr. Bo. St. Louis Miss. Bot. Gard.* 10: 53-56.
- Cockerham, C.C. y B.S. Weir. 1993. Estimation of gene flow from F-statistics. *Evolution* 47:855-863.
- Collins, L.S., A.F. Budd, y A.G. Coates. 1996. Earliest evolution associated with closure of tropical American seaway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6069-6072.
- Contreras, F., M. Herzing y A. Botello. 1988. *Atlas del Golfo y del Caribe Mexicano*. Centro de Ecodesarrollo, México, D.F.
- Cordero, C. y J. Núñez-Farfán. 1993. Nada en biología tiene sentido sin evolución. In Núñez-Farfán, J. y C. Cordero. (eds.). *Tópicos de Biología Evolutiva. Diversidad y Adapatación*. UNAM, México.
- Crow, J.F. y K. Aoki. Group selection for a polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 6073-6077.
- Dinerstein, E., D.M. Olson, D.J. Graham, A.L. Webster, S.A. Primm, M.P. Bookbinder, y G. Ledec. 1995. *A consevation assesment of the terrestrial ecoregions of Latin America and the Caribbean*. WWF-The World Bank, Washington, D.C.

- Duke, N.C. 1995. Genetic diversity, distributional barriers and rafting continents—more thoughts on evolution of mangroves. *Hydrobiologia* 295: 167-181.
- Eguiarte, L.E. 1986. Una guía para principiantes a la genética de poblaciones. pp. 41-56 In Olea Franco, A. (ed.). *Polémicas contemporáneas en evolución*. A.G.T. Editores, México, D.F.
- Eguiarte, L.E. 1990. Genética de poblaciones de *Astrocaryum mexicanum* Liebm. en Los Tuxtlas, Veracruz. Tesis Doctoral, Centro de Ecología, UNAM.
- Eguiarte, L.E., N. Pérez-Nasser y D. Piñero. 1992. Genetic structure, outcrossing rate and heterosis in *Astrocaryum mexicanum* (tropical palm); implications for evolution and conservation. *Heredity* 68: 217-228.
- Eguiarte, L. E., A. Búrquez, J. Rodríguez, M. Martínez-Ramos, J. Sarukhán y D. Piñero. 1993. Direct and indirect estimates of neighborhood and effective population size in a tropical palm, *Astrocaryum mexicanum*. *Evolution* 47: 75-87.
- Flores-Verdugo, F., F. González -Fariás, D. Zamorano y P. Ramírez-García. 1992. Mangrove ecosystems of the Pacific Coast of Mexico. In: Seeliger, U, (ed). *Coastal Plant Communities of Latin America*. Academic Press, N.Y.
- Garay, A. 1991. Montaje de un sistema de loci polimórficos para una especie arbórea neotropical *Cecropia obtusifolia*. Tesis Profesional, Biología, Facultad de Ciencias, UNAM, México
- Goodall, J.A. y J.A. Stoddart. 1989. Techniques for the electrophoresis of mangrove tissue. *Aquatic Botanic*, 35: 197-207.
- Graham, A. 1993. Historical factors and biological diversity in Mexico. In Ramamoorthy, T.P., Bye, R., Lot, A. y Fa, J. (eds.). *Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution*. Oxford University Press, New York & Oxford. pp. 109-127.
- Haldane, J.B.S. 1924. A mathematical theory of natural and artificial selection. Part II. *Trans. Camb. Phil. Soc.* 23: 158-163.
- Hamrick, J.L., y J.W. Godt. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. En prensa.

- Hartl, D.L. y A.G. Clarck. *Principles of population genetics*. 2nd ed., Sinauer Ass., Inc., Sunderland, MA.
- Hedrick, P.W. 1983. *Genetics of Populations*. Science Books International, Boston, MA.
- Hellberg, M.E. 1996. Dependence of gene flow on geographic distance in two solitary corals with different larval dispersal capabilities. *Evolution* 50: 1167-1175.
- Karl, S.A., y J.C. Avise. 1992. Balancing selection at allozyme loci in oysters: implications from nuclear RFLPs. *Science* 256: 100-102.
- Kimura, M. y T. Maruyama. 1971. Patterns of neutral polymorphism in a geographically structured population. *Genet. Res.* 18: 125-131.
- Klekowski, E.J, Jr., R. Lowenfeld, y P.K. Hepler. Mangrove genetics II. Outcrossing and lower spontaneous mutation rates in Puersto Rican *Rhizophora*. *Int. J. Pl. Sci.* 155: 373-381.
- Lot, A. y A. Novelo. 1990. Forested Wetlands of Mexico. In: Lugo, A., M. Brinson y S. Brown. (eds). *Ecosystems of the World: 15 Forested Wetlands*. Elsevier, N.Y.
- Lot-Helgueras, A., Vázquez-Yanes C. y F. Menéndez. 1975. Physiognomic and floristic changes near the northern limit of mangroves in the Gulf coast of Mexico. In Walsh, G., Snedaker, S. y H. Teas (eds.). *Proceedings of the International Symposium on Biology and Management of Mangroves*, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville. pp 52-61.
- Lowenfeld, R. y E.J. Klekowski, Jr. 1992. Mangrove genetics. I. Mating system and mutation rates of *Rhizophora mangle* in Florida and San Salvador Island, Bahamas. *Int. J. Pl. Sci.* 153: 394-399.
- MacMillan, C. 1986. Isozyme patterns among populations of black mangrove *Avicennia germinans*, from the Gulf of México-Caribbean and Pacific Panama. *Contrib. Mar. Sci.* 29: 17-25.

- Maruyama, T. y M. Kimura. 1980. Genetic variability and effective population size when local extinction and recolonization of subpopulations are frequent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 6710-6714.
- May, B. 1992. Starch gel electrophoresis of allozymes. In Hoelzel, A.R. (ed.). *Molecular genetic analysis of populations. A practical approach*. IRL Press, Oxford University Press, Oxford. pp. 1-27.
- Miles, M.A., P.J. Toyle, S.C. Oswald y D.G. Godfrey. 1977. The identification by isozyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 71: 217- 225.
- Mittermeier, R. y C. Goettsch de Mittermeier. 1992. La importancia de la diversidad biológica en México. In: Sarukhán, J. y R. Dirzo. *México Ante los Retos de la Biodiversidad*. CONABIO. México, D.F.
- Murphy, R.W., J.W. Sites, D.G. Buth y C.H. Haufler. 1990. Isozyme electrophoresis. In Hillis, D.M. y C. Moritz (eds.). *Molecular Systematics*. Sinauer, Sunderland, MA.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283-292.
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 3321-3323.
- Nei, M. 1978. Estimates of average heterocigosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Núñez-Farfán, J. 1991. Biología evolutiva de *Datura stramonium* L. en el centro de México: selección natural de la resistencia a los herbívoros, sistema de cruzamiento y variación genética intra e interpoblacional. Tesis Doctoral, Centro de Ecología, UNAM.
- Núñez-Farfán, J., C.A. Domínguez, R. Dirzo, L.E. Eguiarte y M. Quijano. 1996. *Estudio ecológico de las poblaciones de Rhizophora mangle en México*. CONABIO, México, D.F.
- Primack, R.B. y P.B. Tomlinson. 1980. Variation in tropical forest breeding systems. *Biotropica*

12: 229-231.

Rabinowitz, D. 1978. Dispersal properties of mangrove propagules. *Biotropica* 10: 47-57.

Rabinowitz, D., Cairns, S. y T. Dillon. 1986. Seven forms of rarity and their frequency in the flora of the British Isles. In Soulé, M. (ed). *Conservation Biology*. Sinauer, Sunderland, Ma.

Ricklefs, R.E. y R.E. Latham. 1993. Global patterns of diversity in mangrove floras. ppp. 215-229, In Ricklefs, R.E. y D. Schluter (ed.). *Species diversity in ecological communities*. The University of Chicago Press, Chicago, Ill.

Rzedowski, J. 1978. *Vegetación de México*. Limusa. México, D.F.

Saíz, H. y J. Gutiérrez. 1992. Sistemas de manglar en México. *Jaina*, 3: 2.

Schemske, D.W. y R. Lande 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. II. empirical observations. *Evolution* 39: 41-52.

Slatkin, M. 1985. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution* 39: 53-65.

Slatkin, M. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution* 47: 264-279.

Slatkin, M. 1994. Gene flow and population structure. pp. 3-17, In Real, L. (ed.). *Ecological Genetics*. Princeton University Press, Princeton, N.J.

Soltis, D.E. y P.S. Soltis (eds.). 1989. *Isozymes in plant biology*. Dioscorides Press, Portland, OR.

Soulé, M. 1992. Conservation Biology Today: the Most Pressing Questions. In Sarukhán, J. y R. Dirzo (eds.). *México Ante los Retos de la Biodiversidad*. CONABIO. México, D.F.

Swofford, D.L. y S.H. Selander. 1989. *Biosys-1: a computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and systematics*. Release 1.7. Illinois Natural History Survey, Champaign, Ill.

Svitil, K.A. 1993. Oceans divided. *Discovery* Nov., 38-39.

Takahata, N. y M. Nei. 1984. Fst and Gst statistics in the infinite island model. *Genetics* 107: 501-504.

Tomlinson, P.B. 1994. *The Botany of Mangroves*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

- Weller, S.G., A.K. Sakai. y C. Straub. 1996. Allozyme diversity and genetic identity in *Schiedea* and *Alsinidendron* (Caryophyllaceae: Alsinoideae) in the Hawaiian islands. *Evolution* 50: 23-34.
- Weir, B.S. 1990. *Genetical Analysis*. Sinauer, Ass., Sunderland, MA.
- Weir, B.S. y C.C.Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wright, S. 1946. Isolation by distance under diverse systems of mating. *Genetics* 31: 39-59.
- Wright, S. 1951. The genetical structure of populations. *Ann. Eugenics* 15: 97-159.
- Wright, S. 1969. *Evolution and genetics of populations*. Vol. 2, Chicago University Press, Chicago, Ill.
- Wright, S. E. 1978. *Evolution and genetics of populations*. Vol. 4, Chicago University Press, Chicago, Ill.

7

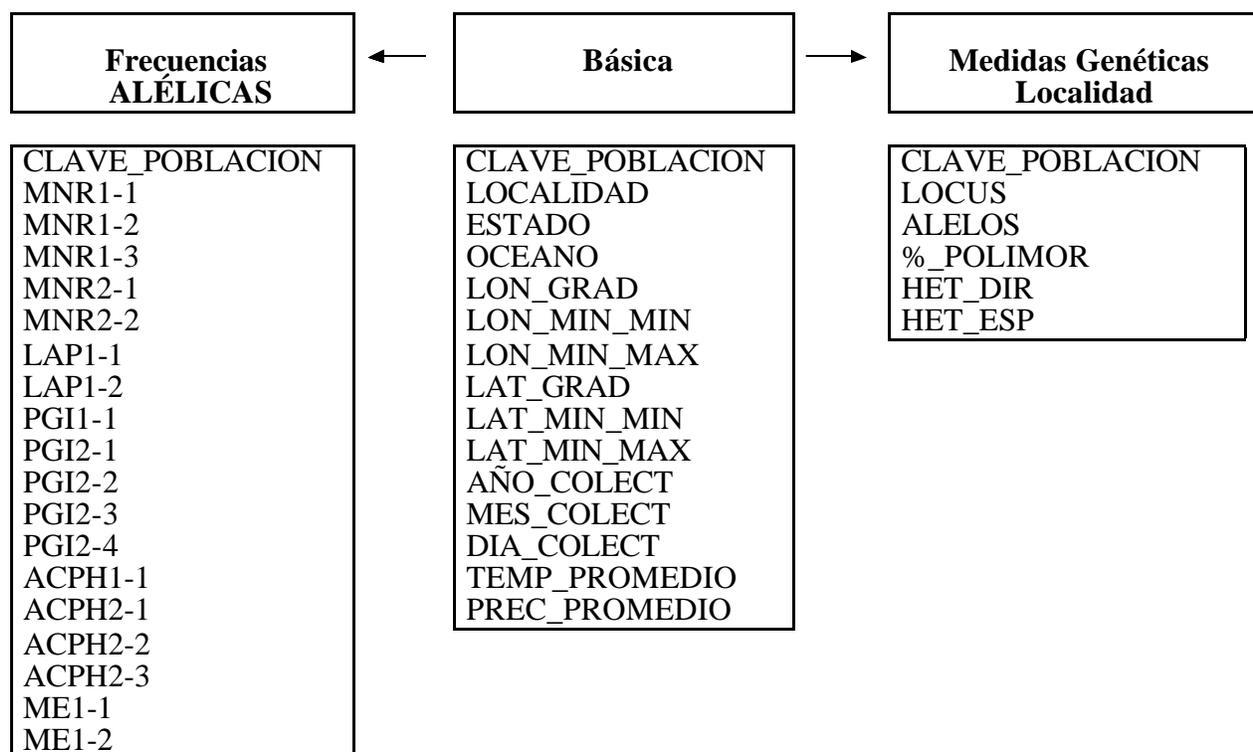
APÉNDICE

**FRECUENCIAS ALÉLICAS DE 15 POBLACIONES DE *Rhizophora mangle*
EN MÉXICO**

LOCUS	CEL	RIA	PPA	SON	CEN	TAM	TUX	CAR	CHN	CHC	CUY	SBL	TOP	KIN
MNR-1														
1	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.011	0.056	0.000	0.000	0.000	0.000
2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.911	0.944	0.962	1.000	1.000	1.000
3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.078	0.000	0.038	0.000	0.000	0.000
MNR-2														
1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.844	0.800	0.950	0.867	0.844	0.967
2	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.156	0.200	0.050	0.133	0.156	0.033
MNR-3														
1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
LAP-1														
1	1.000	0.949	0.750	1.000	0.990	1.000	0.971	0.978	0.933	1.000	0.950	0.956	0.956	0.857
2	0.000	0.051	0.250	0.000	0.010	0.000	0.029	0.022	0.067	0.000	0.050	0.044	0.044	0.133
PGI-2														
1	0.486	1.000	1.000	1.000	0.488	0.436	0.538	0.433	0.407	0.523	0.463	0.500	0.622	0.000
2	0.514	0.000	0.000	0.000	0.512	0.564	0.462	0.567	0.423	0.318	0.488	0.477	0.367	0.567
3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.128	0.159	0.025	0.000	0.011	0.433
4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.023	0.000	0.025	0.023	0.000	0.000
ACPH-1														
1	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
ACPH-2														
1	0.939	1.000	0.927	1.000	0.880	0.950	1.000	0.378	0.867	0.911	0.875	0.911	0.889	0.933
2	0.061	0.000	0.073	0.000	0.120	0.050	0.000	0.489	0.133	0.089	0.125	0.089	0.111	0.067
3	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.133	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
ME-1														
1	0.245	0.311	0.815	0.581	0.370	0.361	0.816	0.300	0.822	0.933	0.875	0.756	0.822	0.844
2	0.755	0.689	0.185	0.419	0.630	0.639	0.184	0.700	0.178	0.067	0.125	0.244	0.178	0.156

Base de datos

La base de datos denominada como GENETICA.MDB fue hecha en formato de Access (v. 2.0) y contiene tres tablas. Se presenta una tabla base (Básica) a la cual están subordinadas por medio de una unión de 1 a ∞ las otras dos tablas (Frecuencias Alélicas y Medidas Genéticas Localidad). Las tablas contienen 15 campos con 14 registros cada uno, a continuación se muestran los nombres de las tablas y sus campos correspondientes:



La tabla denominada como **Básica** contiene información sobre la ubicación geográfica de cada población muestreada, el intervalo geográfico cubierto en cada muestreo (datos del GPS), la fecha de colecta y datos ambientales (temperatura y precipitación promedio). Si se desea saber datos más exactos de los transectos realizados en cada localidad se puede consultar la tabla denominada Georreferencias de la base de datos del proyecto B007.

La tabla llamada Frecuencias Alélicas contiene las frecuencias de cada alelo para las cinco enzimas polimórficas leídas en *Rhizophora mangle*, para cada población. Las abreviaturas representan el nombre práctico que recibe cada enzima, a saber significan:

- MNR (menadione reductasa): esta enzima presentó dos loci denominados MNR1 con tres alelos (MNR1-1, MNR1-2, MNR1-3) y MNR2 con dos alelos (MNR2-1, MNR2-2).
- LAP (leucin amino peptidasa): se leyó un locus denominado LAP-1 con dos alelos (LAP1-1, LAP1-2).
- PGI (fosfoglucoasa isomerasa): se encontraron dos loci, el primero nombrado PGI1 fue monomórfico (PGI1-1) y el segundo locus se le llamo PGI2 con cuatro alelos (PGI2-1, PGI2-2, PGI2-3, PGI2-4).
- ACPH (fosfatasa alcalina): en esta enzima se encontró un locus en la parta anódica y se le denominó como ACPH1 con un alelo (ACPH1-1) y otro en la parte catódica, llamado ACPH2 con tres alelos (ACPH2-1, ACPH2-2, ACPH2-3).

- ME (enzima mítica): se pudo leer un solo locus llamado ME1 con dos alelos (ME1-1, ME1-2).
La tabla Medidas Genéticas Localidad contiene las medidas e índices de diversidad genética para cada población muestreada. Las medidas son tamaño promedio de muestra por locus (LOCUS), número promedio de alelos por locus (ALELOS), porcentaje de loci polimórficos (%:POLIMOR) y la heterocigosis observada (HET_DIR) y la esperada (HET_ESP).

Tabla 4. Sistemas de buffers electrodo-gel ensayados en *Rhizophora mangle*.

BUFFER A.1			
TRIS-CITRATOS (DE GOODALL Y STODDART 1989)			
BUFFER DE ELECTRODO	pH	BUFFER DE GEL	TIEMPO
167 mM de Trizma Base (20.22 g)	7.2	45 g de almidón +	4 horas
52 mM Acido Cítrico (9.98 g)		17 ml buffer I + 483 ml	
Aforar a 1 l de H ₂ O dest.		de H ₂ O dest.	

BUFFER A.2			
TRIS-CITRATOS (DE GOODALL Y STODDART 1989)			
BUFFER DE ELECTRODO	pH	BUFFER DE GEL	TIEMPO
135 mM de Trizma Base (16.34 g)	7.78	45 g de almidón +	4 1/2 horas
32 mM Acido Cítrico (6.14 g)		40 ml buffer II + 460 ml	
1 mM de EDTA (1.48 g)		de H ₂ O dest.	
Aforar a 1 l de H ₂ O dest.			

BUFFER B			
TRIS-CITRATOS (MILES ET AL. 1977)			
BUFFER DE ELECTRODO	pH	BUFFER DE GEL	TIEMPO
150 mM de Trizma Base (18.17 g)	9.0	45 g de almidón +	8 horas
7.5 mM de Acido Cítrico monohídr. (1.58 g) Aforar a 1 l de H ₂ O dest.		50 ml buffer III + 450 ml de H ₂ O dest.	

Figura 4A. Zimograma de la enzima AcPh en *Rhizophora mangle*

Figura 4B. Zimograma de la enzima LAP en *Rhizophora mangle*

Figura 4C. Zimograma de la enzima ME en *Rhizophora mangle*

Figura 4D. Zimograma de la enzima MNR en *Rhizophora mangle*

Figura 4E. Zimograma de la enzima PGI en *Rhizophora mangle*

Figura 4F. Zimograma de la enzima RUB en *Rhizophora mangle*

Figura 5A. Frecuencias alélicas de la enzima AcPh-2 en las poblaciones de *Rhizophora mangle*

Figura 5B. Frecuencias alélicas de la enzima LAP en las poblaciones de *Rhizophora mangle*

Figura 5C. Frecuencias alélicas de la enzima ME en las poblaciones de *Rhizophora mangle*

Figura 5D. Frecuencias alélicas de la enzima MNR-1 en las poblaciones de *Rhizophora mangle*

Figura 5E. Frecuencias alélicas de la enzima MNR-2 en las poblaciones de *Rhizophora mangle*

Figura 5F. Frecuencias alélicas de la enzima PGI-2 en las poblaciones de *Rhizophora mangle*