



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Centro Interdisciplinario de Investigación para el
Desarrollo Integral Regional Unidad-Oaxaca

Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de
Recursos Naturales

(Biodiversidad del Neotrópico)

**“ESTUDIO ALOENZIMÁTICO EN POBLACIONES DE *Malacomeles
denticulata*, EN LA REGIÓN CENTRAL DE OAXACA, MÉXICO.”**

TESIS

Que presenta:

Nancy Irais Bautista Colmenares

Para obtener el grado académico de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Comité tutorial

M. en C. Sonia Trujillo Argueta (Director de Tesis)

Dr. Rafael del Castillo Sánchez (co-director)

Dr. Rodolfo Aniceto Solano Gómez

Dra. Demetria Martha Mondragón Chaparro

Dr. Jose Antonio Vargas Mendoza



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARIA DE INVESTIGACION Y POSGRADO

ACTA DE REVISION DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez siendo las 13:00 horas del día 06 del mes de diciembre del 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación del **Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca (CIIDIR-OAXACA)** para examinar la tesis de grado titulada: "Estudio aloenzimático en poblaciones de *Malacomeles denticulata*, en la región Central de Oaxaca, México"

Presentada por la alumna:

Bautista Apellido paterno	Colmenares materno	Nancy Irais nombre(s)
		Con registro: B 1 0 1 7 3 8

aspirante al grado de: **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **SU APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

Directores de tesis

M. en C. Sonia Trujillo Argueta

Dr. Rafael Felipe del Castillo Sánchez

Dra. Demetria Martha Mondragón Chaparro

Dr. Aniceto Rodolfo Solano Gómez

Dr. José Antonio Vargas Mendoza

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Rafael Pérez Pacheco



CENTRO INTERDISCIPLINARIO
DE INVESTIGACION PARA EL
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
C.I.I.D.I.R.
UNIDAD OAXACA
I.P.N.

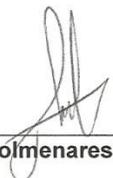


INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESION DE DERECHOS

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día 06 del mes diciembre del año 2012, el (la) que suscribe **Bautista Colmenares Nancy Irais** alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro **B101738**, adscrito al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la M. en C. Sonia Trujillo Argueta y el Dr. Rafael Felipe del Castillo Sánchez y cede los derechos del trabajo titulado: "Estudio aloenzimático en poblaciones de *malacomeles denticulata* en la región Central de Oaxaca, México", al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **Calle Hornos 1003, Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca**, e-mail: posgradoax@ipn.mx ó nindo@hotmail.com Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Bautista Colmenares Nancy Irais



RESUMEN

Malacomeles denticulata, es una especie arbustiva de amplia distribución que prospera en ambientes perturbados y en varios tipos de vegetación nativa. En el estado de Oaxaca se encuentra tanto en bosques templados y tropicales secos así como en matorrales. También tiene capacidad de desarrollarse en sitios altamente erosionados donde contribuye a retener el suelo. En estudios anteriores se determinó mediante técnicas de genética cuantitativa, que en cuatro poblaciones de Oaxaca, México, existen diferencias de variación fenotípica con un significativo componente genético. En el presente trabajo se estudió si dichas variaciones fenotípicas mostraron patrones genéticos diferentes para esta especie, y se incluyó una población más caracterizada por su alto grado de erosión. Para analizar la variabilidad genética en *Malacomeles denticulata* utilizamos la técnica electroforesis de proteínas y se analizaron las mismas poblaciones en las que se hizo anteriormente el estudio de genética cuantitativa. Se encontraron cinco enzimas polimórficas para el estudio genético de esta especie: PGI (fosfogluco isomerasa), AAT (aspartato amino transferasa), MDH (Malato deshidrogenasa), PGM (Fosfoglucomutasa), 6PGDH (fosfogluco deshidrogenasa). Las poblaciones se encuentran diferenciadas genéticamente y se detectó un significativo exceso de heterocigosis a nivel de individuos dentro de poblaciones. La población del sitio erosionado tuvo un nivel de heterocigosis elevado y similar a las de las otras regiones y variación genética elevada.

Palabras clave: isoenzimas polimórficas, aloenzimas, electroforesis, *Malacomeles denticulata*, rosáceas, perturbación.

ABSTRACT

Malacomeles denticulata, is a widely distributed shrub that thrives in disturbed environments, and in several types of native vegetation. In the state of Oaxaca grows in temperate and tropical dry forests, shrublands and in severely eroded sites, where it contributes to soil retention

Previous studies determined by quantitative genetic techniques, in four populations of Oaxaca, Mexico, showed that there are differences of phenotypic variation with a significant genetic component. In this work, we studied whether these phenotypic variations showed different genetic patterns for this species, and included a new population (Yanhuitlan gullies) which, because of its high degree of erosion is of great interest for this study. To analyze the genetic variability in *Malacomeles denticulate*, the technique used was protein electrophoresis and analyzed the same populations in which they did before the study of quantitative genetics.

We found five polymorphic enzymes for genetic studies of this species: PGI (phosphoglucosomerase), AAT (aspartate amino transferase), MDH (malate dehydrogenase), PGM (Phosphoglucomutase), and 6PGDH (6 phosphogluco dehydrogenase). The studied population is genetically differentiated, and exhibited a significant excess of heterozygotes at population level probably caused by heterosis. Of particular importance is the high level of heterozygosity detected in the population of Yanhuitlan gullies and its high genetic variation observed.

Key words: isozymes, allozymes, starch electrophoresis, Rosaceae, Malacomeles, disturbance.

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo agradecimiento a la Maestra **Sonia Trujillo Argueta**, por ser una excelente profesora, por su esfuerzo en hacer relucir lo mejor de nosotros mismos, por su crítica certera, por las conversaciones, por cada jornada en el laboratorio, porque sus consejos y experiencia fueron invaluable para mí en éste proceso, por su preocupación que iba desde lo académico a lo cotidiano. Más allá de que hoy mi tiempo de ser su alumna se agota, usted seguirá siendo mi Maestra.

Al Dr. Rafael Felipe del Castillo Sánchez, por estar siempre dispuesto a compartir sus conocimientos, por el tiempo que se tomó en revisar y corregir este trabajo.

Al Biólogo Raúl Rivera García, por el valioso apoyo en cada colecta, por el ingenio aportado al laboratorio de Genética y Ecología Vegetal, por ser un gran ser humano.

Al comité revisor de ésta tesis, con admiración y aprecio, por las aportaciones, correcciones y consejos en cada seminario, Dr. José Antonio Vargas Mendoza, Dra. Demetria Martha Mondragón Chaparro, Dr. Aniceto Rodolfo Solano Gómez.

Con gran cariño y aprecio Al Dr. José Antonio Santos Moreno, Dr. Alejandro Flores Martínez (Q.E.P.D), M. en C. Gladys Isabel Manzanero Medina.

Al M.C. José Cristóbal Leyva López, por ser un excelente amigo, sus enseñanzas y consejos aún rendirán más frutos.

DEDICATORIA

A **Luis** por tu amor, apoyo y paciencia durante éste largo viaje, sé que no fue fácil.

A **Joshua** por tu fortaleza, y comprensión a pesar de tu corta edad, porque una sonrisa tuya siempre me llenará de ánimo y fuerzas.

A **María Fernanda** por la alegría que nos brindas cada día, además de convertimos en la gran familia que somos ahora.

A **Balám Quitzé** por permitirme ser parte de tu vida, éste esfuerzo realizado y el éxito obtenido también es para ti hijo.

A **Ana María y Fernando**, por todo el amor y cuidado que han tenido conmigo y mis hermanos desde siempre.

A **Citlally e Ivan**, por que en todo momento sentí sus manos sobre mis hombros confortándome y animándome a seguir adelante.

A **Lidia, José Luis e Ili**, porque ahora son parte de mi vida y éste logro, ahora es parte de ustedes también.

Al humilde Carpintero de Galilea, por trazar el camino por los que mis pies avanzan y en el que mi mente y corazón viven felices...

A Alicia, entrañable amiga y compañera de viaje.

A Paulina, Andrea, Anielka, Paola, Xochitl, Rebeca porque la amistad perdura.

A Carlos, Cristian, Pau Mayoral, Rosita, Migue, Migue, Margarita y Magaly, porque compartimos la necesidad de obtener conocimientos, motivados por la convicción de que un mundo mejor es posible.

A Emmanuel por preguntar siempre “como vas con la tesis”.

INDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
INDICE DE CUADROS	vii
INDICE DE FIGURAS	viii
I Introducción.....	9
II Justificación.....	12
III Objetivos e hipótesis	13
3.1 Objetivo general	13
3.2 Objetivos específicos	13
3.3 Hipótesis	13
IV Revisión de Literatura	14
4.1 Genética molecular	14
4.2 Electroforesis de proteínas	14
4.3 Variabilidad genética	15
4.4 Técnicas para estudiar la variabilidad genética	16
4.4.1 Estudio a nivel molecular de ADN por medio de marcadores moleculares	16
4.4.2 Análisis de Genética Cuantitativa de rasgos continuos mediante marcadores morfológicos	16
4.4.3 Estudio de isoenzimas y aloenzimas por medio de marcadores bioquímicos	16
4.5 Electroforesis de proteínas en geles de almidón (Técnica)	17
4.6 Isoenzimas	18
4.7 Aloenzimas	18
4.8 Zimogramas	18
4.9 Endogamia	19
4.10 Malacomeles denticulata	19
4.10.1 Taxonomía	21
4.10.2 Descripción botánica	21
4.11 Estudios genéticos en la familia Maloideae	22
4.11.1 Estudios genéticos recientes en Malacomeles denticulata	23
V Materiales y Métodos.....	24

5.1 Electroforesis de proteínas (Procedimiento).....	24
5.1.1 Obtención de muestras.....	25
5.1.2 Extracción enzimática y homogenización.....	25
5.1.3 Elaboración del gel de almidón.....	26
5.1.4 Carga de muestras.....	27
5.1.5 Desarrollo del corrimiento.....	27
5.1.6 Tinción.....	27
5.1.7 Lectura de bandas y análisis	28
5.2 Variables a estudiar.....	28
5.3 Sitios de estudio.....	28
VI Resultados	30
6.1 Buffer de extracción.....	30
6.2 Isoenzimas.....	30
6.3 Zimogramas de las enzimas analizadas	34
6.3.1 Glucosa 6 fosfato isomerasa (PGI; E.C. 5.3.1.9)	34
6.3.2 Aspartato transaminasa (AAT, EC 2.6.1.1)	35
6.3.3 Malato deshidrogenasa (MDH; E.C. 1.1.1.37)	36
6.3.4 Fosfoglucomutasa (PGM; E.C.5.4.2.2).....	36
6.3.5 Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH; E.C.1.1.1.49)	37
6.4 Análisis Genéticos	38
6.4.1 Polimorfismo, número de alelos por locus y número de alelos por locus polimórfico.....	38
6.4.2 Riqueza alélica.....	39
6.4.3 Heterocigosidad.....	40
6.5 Estadística F de Wright.....	41
VII Discusión	42
7.1 Isoenzimas.....	42
7.2 Análisis Genéticos	45
7.2.1 Polimorfismo, número de alelos por locus y número de alelos por locus polimórfico.....	45
7.2.2 Estadística F de Wright	46
VIII Conclusiones	48
IX Recomendaciones	49
BIBLIOGRAFIA	50

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Enzimas probadas en <i>Malacomeles denticulata</i>. Se probaron en total catorce enzimas y veinticinco protocolos de revelado.	31
Cuadro 2. Enzimas que mostraron polimorfismo genético, en <i>Malacomeles denticulata</i>, en las poblaciones de estudio Díaz Ordaz, Teotitlan del Valle, Yanhuitlan, Yanhuitlan-Cárcavas y Huitzo, en la región de Valles centrales, Oaxaca, México.	32
Cuadro 3. Resumen de genotipos encontrados, en <i>Malacomeles denticulata</i>. en las poblaciones de estudio Díaz Ordaz, Teotitlan del Valle, Yanhuitlan, Yanhuitlan-Cárcavas y Huitzo) en la región de Valles centrales, Oaxaca, México.	32
Cuadro 4. Total de individuos observados por locus y por genotipo en <i>Malacomeles denticulata</i>. en cada una de las poblaciones estudiadas.	33
Cuadro 5. Número de alelos por locus (A) y número de alelos por locus polimórfico (Ap), obtenidos en <i>Malacomeles denticulata</i> en las poblaciones de estudio, (Díaz Ordaz, Teotitlan del Valle, Yanhuitlan, Yanhuitlan-Cárcavas y Huitzo) en la región de Valles centrales, Oaxaca, México.	39
Cuadro 6. Riqueza alélica por locus y población, basada en una muestra mínima de 10 individuos diploides, para <i>Malacomeles denticulata</i> en las poblaciones de estudio, (Díaz Ordaz, Teotitlan del Valle, Yanhuitlan, Yanhuitlan-Cárcavas y Huitzo) en la región de Valles centrales, Oaxaca, México.	39
Cuadro 7. Heterocigosidad observada (H_o), y heterocigosidad esperada (H_e) bajo un equilibrio Hardy-Weinberg, para <i>Malacomeles denticulata</i> en las poblaciones de estudio, (Díaz Ordaz, Teotitlan del Valle, Yanhuitlan, Yanhuitlan-Cárcavas y Huitzo) en la región de Valles centrales, Oaxaca, México.	40
Cuadro 8. Estadística F de Wright obtenida en siete loci polimórficos de <i>Malacomeles denticulata</i> en las poblaciones de estudio, (Díaz Ordaz, Teotitlan del Valle, Yanhuitlan, Yanhuitlan-Cárcavas y Huitzo) en la región de Valles centrales, Oaxaca, México. F_{it}=coeficiente de endogamia total de las poblaciones, F_{st}=coeficiente de endogamia entre poblaciones, F_{is}=coeficiente de endogamia dentro de las poblaciones obtenidos con un intervalo de confianza al 0.95 % por medio de la técnica de bootstrapping.	41

INDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Zimograma de la enzima PGI. Dos loci encontrados (PGI-1, PGI-2) con las combinaciones alélicas observadas (11,12,22,33,44,45 y 55) en Malacomeles denticulata en las poblaciones de estudio.....</i>	34
<i>Figura 2. Zimograma correspondiente a la enzima AAT. Dos loci encontrados (AAT-1, AAT-2) con las combinaciones alélicas observadas (11,12, y 22) para Malacomeles denticulata en las poblaciones de estudio.....</i>	35
<i>Figura 3. Zimograma correspondiente a la enzima MDH. Un locus encontrado, con las combinaciones alélicas observadas (11,12, y 22) en Malacomeles denticulata en las poblaciones de estudio.....</i>	36
<i>Figura 4. Zimograma correspondiente a la enzima PGM. Un locus encontrado, con las combinaciones alélicas observadas 11,12, y 22 para Malacomeles denticulata en las poblaciones de estudio (Díaz Ordaz, Teotitlan del Valle, Yanhuitlan, Yanhuitlan-Cárcavas y Huitzo) en la región de Valles centrales, Oaxaca, México. 37</i>	
<i>Figura 5. Zimograma correspondiente a la enzima 6PGDH. Un loci encontrado, con las combinaciones alélicas observadas (11,12, y 22) para Malacomeles denticulata en las poblaciones de estudio (Díaz Ordaz, Teotitlan del Valle, Yanhuitlan, Yanhuitlan-Cárcavas y Huitzo) en la región de Valles centrales, Oaxaca, México.</i>	38
Diagrama 1.....	24

I Introducción

México, al igual que otros países megadiversos, tiene una alta proporción de ecosistemas amenazados, siendo los más afectados el bosque mesófilo de montaña y la selva alta perennifolia (Toledo y Ordóñez, 1998). Dentro de las principales amenazas producidas por diversas actividades humanas como la agricultura, los fuegos provocados, la tala inmoderada y en general, el crecimiento demográfico desmedido; se encuentran la fragmentación del hábitat, la deforestación, la pérdida o degradación del suelo y la desertificación (CONABIO, 2000).

La pérdida y fragmentación del hábitat está considerada como una de las causas principales de la actual crisis de biodiversidad, el humano ha alterado en su propio beneficio la mayor parte de la tierra emergida (Loh y Wackernagel, 2004). Esto ha provocado en las especies una transformación de las distribuciones originales y, en muchos casos, la fragmentación de sus poblaciones en subpoblaciones cada vez más pequeñas y aisladas, sometidas a problemas crecientes de viabilidad genética y demográfica (Frankham, 1995).

En el estado de Oaxaca, la Mixteca es una de las regiones que presenta mayor deterioro de suelo en México (León, 2007). estudios recientes demuestran que los procesos de erosión van en aumento Estimaciones recientes para esta región revelan un 17% de terrenos con suelos con evidencia de erosión muy severa y 83% de terrenos con suelos con erosión ligera o moderada (Altieri et al., 2006).

Sin embargo, existen especies que han logrado permanecer en estas condiciones adversas. Una de ellas es *Malacomeles denticulata*, una especie arbustiva que

prospera en ambientes perturbados, y se encuentra presente en la Mixteca Oaxaqueña (Rzedowski y Calderón, 2005).

Malacomeles denticulata es una especie que habita, ambientes con alto grado de disturbio y zonas de vegetación natural menos degradadas, Ramírez (2009), determinó mediante técnicas de genética cuantitativa, que en cuatro poblaciones de Oaxaca, México, existen diferencias de variación genética entre poblaciones,. En el presente trabajo se explorará la variación aloenzimática a fin de contrastarla con el estudio anterior. Además, se incluirá un sitio adicional ocupado por cárcavas generadas por la erosión, que, a diferencia de los cuatro anteriores que no muestran evidencia de erosión, a fin de contrastar la variación genética de los individuos de éste con las otras poblaciones. Esperamos que la variación genética detectada en cárcavas de las pautas para proponer hipótesis sobre los posibles mecanismos evolutivos que están influyendo en la colonización de este sitio tan adverso y generar recomendaciones para la restauración de este tipo de sitios. Si la capacidad de colonización está determinada por heterosis y una alta variación genética, esperamos encontrar en este sitio un nivel de heterocigosidad y de diversidad genética al menos similar al obtenido en las poblaciones de vegetación nativa. Si por el contrario, sólo unos cuantos genes pueden habitar estas regiones esperamos que la población de cárcavas muestre una variación genética muy restringida producto de la acción de la selección natural Este tipo de estudios está justificado en virtud de que la habilidad de las especies para adaptarse a los cambios del ambiente a lo largo del tiempo depende del nivel de variabilidad genética que contengan; es decir, mientras más diferencias existan entre los individuos, la población en su conjunto tendrá más oportunidades de sobrevivir los constantes cambios que ocurren en la naturaleza (Marcucci, s/f). Por tal motivo, la pérdida de variabilidad genética en las especies es un tema preocupante ya que la declinación de la variación genética puede disminuir la habilidad de una especie para responder a la selección natural y por consiguiente limitar su potencial evolutivo (Storfer, 1996). Para analizar la variabilidad genética en *Malacomeles denticulata* se utilizó la técnica electroforesis de proteínas. Con ésta técnica es posible evidenciar variaciones en la migración electroforética de las enzimas al

ocurrir alguna mutación en el locus que las codifica. Por consiguiente, con el empleo de esta técnica es posible, identificar poblaciones evolutivamente distintas y establecer prioridades de conservación (Trujillo y del Castillo, 2003).

II Justificación

Malacomeles denticulata una especie con alto potencial para cobertura vegetal, ya que presenta una gran capacidad de rebrote y sobrevivencia, es utilizada como forraje, ya que es ramoneada por todo tipo de ganado, en especial por el caprino (Cruz, 1992).

Ramírez (2009) reporta para *Malacómeles denticulata* variaciones genética entre poblaciones asociadas con la dentición de las hojas y el área foliar. por lo que es de gran interés comparar las diferencias fenotípicas reportadas con las características genéticas de ésta especie en las cuatro localidades de estudio

La técnica de Electroforesis de Proteínas, es una técnica molecular robusta para determinar variabilidad genética, dado que es una técnica co-dominante., Con la estandarización de las enzimas estudiadas en *Malacomeles denticulata*, se tendrá una base para futuros estudios genético ecológicos.

III Objetivos e hipótesis

3.1 Objetivo general

Determinar la variabilidad genética de *Malacomeles denticulata* en cuatro poblaciones contrastantes de vegetación nativa y una en terrenos severamente erosionados identificadas como cárcavas.

3.2 Objetivos específicos

- a) Estandarizar la técnica electroforética para *Malacómeles denticulata*. Esto es, extracción de proteínas y determinación de las isoenzimas polimórficas que mejor estimen la variación genética de *Malacomeles denticulata*.
- b) Estimar la diversidad genética y la estructura genética de *Malacomeles denticulata* en cuatro poblaciones, con diferente grado de perturbación y tipo de vegetación.

3.3 Hipótesis

Debido a que se ha reportado que *Malacomeles denticulata* presenta diferencias fenotípicas en sitios conservados con respecto a sitios contrastantes de degradación de bosque, se espera que exista un patrón genético diferente en las poblaciones contrastantes que habitan dichas localidades, si hay flujo genético limitado.

IV Revisión de Literatura

En la actualidad existen varias técnicas genéticas utilizadas para estudiar las similitudes y diferencias entre organismos de la misma especie, entre las técnicas más importantes se encuentra la citogenética, la genética molecular y la electroforesis de proteínas.

4.1 Genética molecular

Es una rama de la genética que cuantifica y estudia la variación genética dentro y entre poblaciones, determina la divergencia entre las mismas, investiga la constitución genética individual y trata de entender los procesos evolutivos que generan la diversidad genética. Para ello, se emplean marcadores genéticos, basados en proteínas o ADN. El uso de marcadores genéticos ha ayudado a resolver problemas ecológicos y sistemáticos, como son la paternidad, patrones de diversidad, hibridación, variación, geografía, especiación y filogenias, entre otros. Estos marcadores se pueden explorar en cualquier gen o producto génico de cualquier organismo (González, 1998).

4.2 Electroforesis de proteínas

La electroforesis de proteínas es una técnica por medio de la cual es posible detectar proteínas (enzimas) y se basa en la movilidad diferencial de las mismas a través de un soporte en gel que puede ser de almidón, poliacrilamida, acetato de celulosa y agarosa. Con excepción del gel de poliacrilamida, ninguno es tóxico y su manejo es usualmente fácil. La poliacrilamida, es una neurotoxina que debe ser manejada con las precauciones de seguridad apropiadas para evitar la

intoxicación. El gel de almidón es el único con el que se puede obtener más de una rebanada por gel (Murphy *et al.*, 1996).

Los estudios sobre electroforesis de aloenzimas (formas alternativas de una enzima codificada por diferentes alelos del mismo locus) se basan en la movilidad diferencial de las aloenzimas de acuerdo a su carga eléctrica neta y a su tamaño mediante el empleo de corriente eléctrica (Lorenzo, *et al.*, 2003).

Al colocar las proteínas en el gel y aplicar una corriente eléctrica, las moléculas se mueven a través de la matriz a una velocidad diferente, determinada en gran medida por su carga eléctrica total, su configuración y su masa.

El uso de la electroforesis ha permitido ampliar el conocimiento que existe sobre las relaciones de parentesco, la variabilidad y diversidad genética de las poblaciones y la manera en que se relacionan filogenéticamente. Esto se realiza mediante el uso de diversas tinciones diferenciales y específicas lo cual permite reconocer las aloenzimas en el gel.

4.3 Variabilidad genética

La variabilidad genética se refiere a la variación en el material genético de una población o especie, e incluye los genomas nuclear, mitocondrial y de cloroplasto.

La variabilidad genética nueva puede estar causada por mutaciones, recombinaciones y alteraciones en el cariotipo (el número, forma, tamaño y ordenación interna de los cromosomas). O bien puede ocurrir en un segmento determinado de ADN.

Los procesos que afectan la variabilidad genética son la selección natural y la deriva genética y los factores que intervienen en la misma pueden ser accidentales (mutaciones aleatorias), dirigidos (mejoramiento genético), y factores ambientales (adaptación).

4.4 Técnicas para estudiar la variabilidad genética

Storfer (1996), menciona tres técnicas mediante las cuales se puede estudiar la variabilidad genética:

4.4.1 Estudio a nivel molecular de ADN por medio de marcadores moleculares.

Es el estudio de la variabilidad, y se utiliza para determinar progenitores además de caracteres que se transmiten en forma estable a la progenie (Campos, 1995).

Un marcador molecular se puede definir a su vez como un marcador genético, siempre y cuando se verifique su comportamiento de acuerdo con las leyes básicas de herencia mendeliana segregante (León, 1998).

4.4.2 Análisis de Genética Cuantitativa de rasgos continuos mediante marcadores morfológicos.

De acuerdo con Egger (1992), los marcadores morfológicos en plantas pueden ser: altura, diámetro, formas o color, etc., y son aquellos que tienen un limitado número de alelos y que generalmente son afectados por las condiciones ambientales, lo que los hace caracteres poco estables, además de que generalmente presentan dominancia, es decir no se pueden inferir todos los genotipos a partir del fenotipo, o epistasia (un gen puede enmascarar o modificar la acción de otro gen de otro locus).

4.4.3 Estudio de isoenzimas y aloenzimas por medio de marcadores bioquímicos.

La utilidad de las isoenzimas y aloenzimas como marcador molecular está bien documentada y han sido de gran utilidad para determinar variabilidad genética en un sin número de especies.

Esta técnica es relativamente barata, accesible y no destructiva ya a que utiliza pequeñas cantidades de material. Además, el control genético de la mayoría de las isoenzimas es bien conocido, por lo que es posible realizar inferencias genéticas a partir de los patrones de bandas observados en los geles (Solís-Ramos, 2005).

Por otro lado, las isoenzimas tienen una base genética co-dominante, (es decir, que en un individuo diploide es posible visualizar la expresión de ambos alelos); son selectivamente neutrales y están libres de efectos deletéreos (cuando los alelos tienen efectos negativos que imposibilitan la reproducción del genotipo que los posee), efectos pleiotrópicos (cuando un gen controla la expresión de más de un carácter en un individuo) y/o epistáticos (dominancia de un gen sobre otro).

4.5 Electroforesis de proteínas en geles de almidón (Técnica).

La técnica de electroforesis de proteínas a grandes rasgos consiste en impregnar, pequeñas tiras de papel filtro (pabilos), de 1.8cm x 2mm, con extractos proteicos de las muestras a analizar en un soporte gel hecho de almidón, que se someterá al campo eléctrico durante varias horas para que se separen las proteínas de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica.

Una vez concluida la migración de las proteínas, el gel es colocado en una solución que contiene los compuestos químicos necesarios (colorantes) para que se lleve a cabo la reacción (revelado) y se puedan observar posteriormente las isoenzimas en forma de bandas de color en el soporte o gel.

Las diferencias en la movilidad electroforética de las isoenzimas son resultantes de las diferencias en las secuencias del ADN que codifican tales enzimas

4.6 Isoenzimas

La mayoría de los organismos contiene diferentes formas de muchas de sus enzimas activas, estas formas (isoenzimas) son enzimas que difieren en la secuencia de aminoácidos, pero que comparten una misma actividad catalítica y son específicas del estado de desarrollo del individuo y de la especie, en muchos casos, son codificadas por genes homólogos que han divergido con el tiempo (Egger, 1992).

Es importante mencionar que éstas proteínas pueden ser producidas tanto en el núcleo, como en los organelos.

4.7 Aloenzimas

Las isoenzimas pueden presentar varias formas alélicas (aloenzimas) que pueden dar idea de las variación genética entre poblaciones. La diferente de movilidad en las aloenzimas en un gel sometido a un campo eléctrico da lugar a un patrón de bandeo que se conoce como zimograma. Aunque, con esta técnica sólo se detectan diferencias en la composición de aminoácidos que implican cambio de carga. (Trujillo y Del Castillo, 2003).

4.8 Zimogramas

Para observar la actividad de las enzimas, se utiliza la zimografía o zimograma la cual es una técnica electroforética, ya que las enzimas se pueden presentar en varios compartimentos celulares (mitocondrias, cloroplastos, citoplasma, peroxisomas) y esto puede influir en el número de loci esperados. Pueden encontrarse loci carentes de variación (monomórficos) o loci con variación (polimórficos); estos últimos son los más importantes para estudios comparativos en genética de poblaciones.

De acuerdo con la estructura que presenten las isoenzimas será el patrón de bandeo en los zimogramas. Si son monómeras se obtendrán dos bandas en los

organismos heterocigotos, si son dímeras tres bandas, y así sucesivamente, de acuerdo con las combinaciones de las subunidades (Gottlieb, 1981).

4.9 Endogamia

La endogamia es el resultado de apareamientos entre individuos emparentados. Matemáticamente puede definirse como la probabilidad de que dos alelos en un locus sean idénticos por descendencia y se cuantifica por el coeficiente de endogamia. La endogamia tiende a tener efectos mayores en poblaciones pequeñas ya que aumenta la probabilidad de cruza entre individuos emparentados, esto a su vez disminuye la heterocigosidad y aumenta la homocigosidad, lo cual aumenta el riesgo de que las poblaciones estén expuestas a la extinción (Frankham et al.,2002).

4.10 *Malacomeles denticulata*

Malacomeles denticulata o tlaxistle, un arbusto que se distribuye ampliamente en las cadenas montañosas de México, Texas (Estados Unidos) y Guatemala, en bosques de pino-encino y bosque tropical seco, a altitudes que van de los 1350 a 3000 msnm en climas templados a fríos y preferentemente en suelos alcalinos.

En México se han encontrado poblaciones de esta especie en los estados de Aguascalientes, San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Jalisco, México D.F., Puebla, Tlaxcala, Veracruz, Oaxaca y Chiapas (Rzedowski y Calderón, 2005).

En la Mixteca Oaxaqueña se le halla en bosque de Juníperus, bosques de pino, bosque de encino, con sus diversos grados de alteración, como bosque de encino-vegetación secundaria arbustiva, en la que forma el principal estrato arbustivo y chaparral usualmente (INEGI, 1985).

Los nombres comunes en español son duraznillo, membrillo cimarrón, madronillo, membrillo, membrillo silvestre, manzanita y mimbre. En idiomas indígenas de

México son “tlaxisqui”, “tomistlacatli”, “tlaxioqui”, “clasisle”, “tlachistle”, “yagalpan”, “claldurazno”, “tlaxistle” (Rzedowski y Calderón, 2005); a éste último es como se le conoce en la Mixteca. Su nombre común en inglés es Southern false serviceberry o Big bend serviceberry (Hanan *et al.*,2006).

Descripciones de la vegetación realizadas por Blanco y Martínez (2001), consideraron que este arbusto tiene características para considerarla como una especie potencial para el enriquecimiento de la cobertura vegetal en estratos de vegetación con arbolado denso y ralo ya que puede convivir con especies existentes o crecer bajo laderas de terrenos marginales. En estas condiciones puede encontrarse importantes poblaciones.

De acuerdo con Cruz (1992), en estratos geológicos de la Formación Yanhuitlán con vegetación dominante por matorral, escasa cobertura, sobrepastoreo y erosión grave, esta planta se mantiene sobre montículos a manera de manchones, donde puede observarse acumulación de materia orgánica bajo la cubierta de sus tallos. Por lo que se le ha considerado útil para programas de reforestación y prácticas de conservación de ambientes deteriorados (Flores y Linding, 2005), debido a que prospera en ambientes perturbados y no se le considera en ningún estatus de conservación (Rzedowski y Calderón, 2005).

También se le reconocen algunos usos medicinales, sus frutos se consideran comestibles y la madera es utilizada para elaboración de artesanías y construcciones (Rzedowski y Calderón, 2005).

4.10.1 Taxonomía

El género Malacomeles es un género de taxonomía sumamente complicada, se calculan entre 20 y 23 especies de zonas de clima templado del Hemisferio Norte, principalmente de Norteamérica, en su mayoría de Estados Unidos, unas cuantas se extienden a México y Centroamérica (Rzedowski y Calderón, 2005).

Pertenece al Reino: Plantae; Subreino: Traqueobionta (plantas vasculares); Superdivisión: Spermatophyta (plantas con semillas); División: Magnoliophyta (plantas con flor); Clase: Magnoliopsida (dicotiledóneas); Subclase: Rosidae; Orden: Rosales; Familia: Rosaceae; Subfamilia: Maloideae; Género: Malacomeles; Especie: *Malacomeles denticulata* (Kunth) Engelm. (Hanan, *Et al*, 2006; Evans et al, 2002).

4.10.2 Descripción botánica

Malacómeles denticulata, antes *Amelanchier denticulata* (Campbell, *et al*, 2007) es una planta arbustiva que crece en formaciones cerradas o en manchones, mide de 1 a 3m de alto, por lo general gris o blanco tomentosa, sobre todo hacia las porciones jóvenes, a veces glabra; tallos muy ramificados y entrecruzados, de color grisáceo o café. Hojas alternas, elípticas o obovadas o casi circulares de ápice truncado o redondeado y terminado en una diminuta puntilla, regularmente denticulado, entonces a menudo con una glándula oscura en la punta del diente, con pelillos blancos y erguidos sobre la cara inferior, sin pelillos y brillante en la cara superior. Sus racimos son de pocas flores en los ápices de las ramas. Las flores de alrededor de 1cm de diámetro con una base acampanada llamada hipando, en cuyo ápice se disponen 5 sépalos anchamente triangulares, de hasta 2mm de largo; 5 pétalos, de hasta 4mm de largo, blancos, más o menos circulares; estambres numerosos de filamentos cortos; estilos 2.5; ovario ínfero o semi-ínfero. Los frutos carnosos como “manzanitas”, son elipsoides a más o menos globosos, de aproximadamente 1cm de largo, de color rojo, cubierto de

pelillos erguidos (Rzedowski y Calderón, 2005). En el estado de Oaxaca, se distribuye en las regiones Norte, Valles Centrales y Mixteca Oaxaqueña (Cruz, 2005).

4.11 Estudios genéticos en la familia Maloideae.

Raspe, *et al* (1998), trabajaron con la técnica de electroforesis de proteínas con siete enzimas polimórficas: AAT, ADH, IDH, MDH, PRX, 6PGD y PGM, en *Sorbus aucuparia* L, debido a que ésta especie pertenece a la misma familia (Rosaceae) que *Malacomeles denticulata* se probaron dichos sistemas enzimáticos en *Malacómeles denticulata*.

Chevreau, *et al* (1997), mencionan haber obtenido buenos resultados con: ADH, DIA, PGD, PGI, PGM, en Pera (*Pyrus communis* L.). También se analizaron estas enzimas en *Malacómeles denticualta*.

Evans, *Et al* (2002), menciona que en la familia Maloideae ocurre aneuploidía la cual se produce cuando un individuo presenta accidentalmente algún cromosoma de más o de menos en relación con su condición de diploide, pero sin que se llegue a alcanzar la dotación de un juego completo de cromosomas.

Evans (1999) concluyó lo anterior, al presentar evidencia morfológica y demostrar que un género con $x = 9$, en *Gillenia*, especie hermana de Maloideae. El supuso que el antepasado de *Gillenia* era también $x = 9$, el evento de poliploidización originario habría producido una $x = 18$ en la que la pérdida de un par de cromosomas homólogos dio lugar a $x = 17$ en Maloideae, aproximadamente al mismo tiempo.

Al igual que con otros aloploidoides, este hijo habría sido fértil y ya que no se pudo cruzar con los padres, debido a incompatibilidades en la constitución cromosómica dio como resultado, un linaje de plantas de gran éxito (Campbell *et al*, 2007).

A pesar de la gran afinidad de la *Gillenia* con Maloideae, la derivación de la supuesta Maloideae, de los antepasados de *Gillenia* estuvo acompañada probablemente por importantes cambios morfológicos. *Gillenia* es herbácea, y todos los miembros de Maloideae son leñosas. Las hojas son compuestas en *Gillenia*, pero sólo una minoría de Maloideae (*Cormus*, *Osteomeles* y *Sorbus*) tiene hojas compuestas (Campbell et al, 2007).

4.11.1 Estudios genéticos recientes en *Malacomeles denticulata*.

Ramírez (2009), determinó que las poblaciones de Huitzo, Teotitlán del Valle y Yanhuitlán, que se incluirán en este estudio son genéticamente variables, no así las poblaciones de Díaz Ordáz para área foliar. Para dentición foliar, solo la población de Teotitlán del Valle resulto sin variación genética detectada. Finalmente, para la tasa relativa de crecimiento sólo se detectó variación genética en San Pablo Huitzo. Ramírez (2009) también reporta resultados, obtenidos mediante técnicas de genética cuantitativa, que indican que existen diferencias genéticas dentro y entre poblaciones y que los valores más altos de heredabilidad se obtuvieron para área foliar media y dentición.

En éste mismo estudio se concluye que las cuatro poblaciones estudiadas poseen un alto grado de diferenciación genética en las variables: área foliar media y dentición. En la tasa relativa de crecimiento (TRC), el grado de diferenciación no fue detectable.

Los valores de heredabilidad en las poblaciones de San Pablo Huitzo y Yanhuitlán indican la existencia de una alta varianza aditiva y por ende, alta habilidad para responder a la selección natural y a la artificial (por programas de mejoramiento genético) (Ramírez, 2009). Esto podría ser debido a un alto grado de adaptación a las condiciones ambientales adversas que enfrenta *Malacomeles denticulata*.

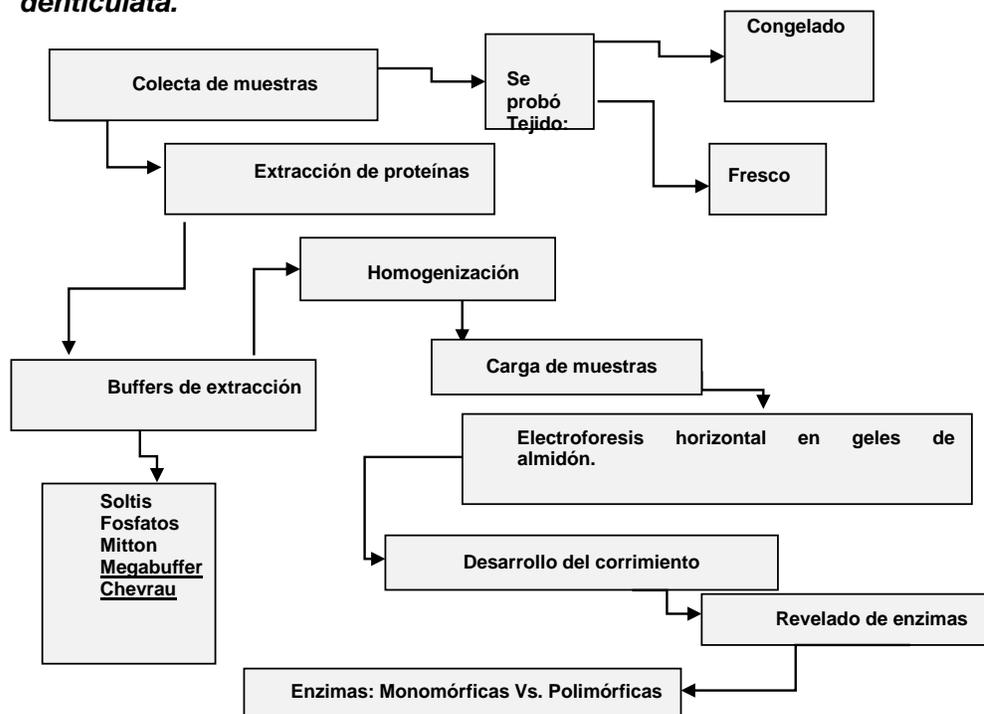
V Materiales y Métodos

Los análisis genéticos se realizaron en el Laboratorio de Genética y Ecología Vegetal del Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) Unidad Oaxaca, ubicado en la población de Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca.

5.1 Electroforesis de proteínas (Procedimiento)

Para el caso particular de *Malacomeles denticulata*, a continuación se detalla el procedimiento realizado (Diagrama 1):

Diagrama 1. Procedimiento de estandarización para *Malacomeles denticulata*.



5.1.1 Obtención de muestras.

Se colectaron muestras en cuatro localidades, ubicadas en la Región de Valles Centrales, del Estado de Oaxaca, en las cuales se encuentra presente *Malacomeles denticulata*:

- Teotitlán del Valle, y Díaz Ordáz (Distrito de Tlacolula).
- Yanhuitlán, (Distrito de Nochixtlan).(vegetación natural)
- Yanhuitlán, (Distrito de Nochixtlan).(cárcavas, terreno severamente erosionado)
- Huitzo, (Distrito de ETLA).

Se eligieron las hojas más tiernas, ya que es donde hay mayor actividad enzimática, se cortaron con tijeras de podar y se resguardaron en hojas de plástico con cierre hermético.

Todas las muestras se etiquetaron con el número de individuo y la clave de la localidad y se introdujeron en una hielera para conservarlas frescas durante el traslado al laboratorio de Genética y Ecología Vegetal del CIIDIR-OAXACA.

Las muestras se mantuvieron a -20°C ya que de acuerdo a la literatura, es la temperatura necesaria para conservar la actividad isoenzimática (Perfectti y Pascual 1996).

5.1.2 Extracción enzimática y homogenización.

Aproximadamente 2g de hojas fueron trituradas en un mortero de porcelana con nitrógeno líquido para facilitar el molimiento. Posteriormente se añadió dos mililitros del tampón megabuffer (Soltis et al 1983., modificado por Kelly y Adams, 1977) citado en Werth (1985). Puesto que cuando se probaron varios buffers de

extracción, fue el que ofreció mejores resultados. La extracción se colocó en micro tubos Eppendorf de 2ml de capacidad y se centrifugó por 5 minutos a 4°C y 13 rpm. Una vez centrifugadas las muestras se impregnaron pequeñas tiras de papel filtro (18mmx3mm), del sobrenadante obtenido en los microtubos. Las enzimas fueron sometidas a electroforesis en geles de almidón al 13% en un sistema continuo de histidina y en un sistema discontinuo de borato de litio a una corriente de 50mA y 75mA (Conkle et al 1982). Todo el proceso se realizó dentro de un refrigerador a 4 °C.

5.1.3 Elaboración del gel de almidón.

Se empleó almidón de papa hidrolizado para electroforesis (Sigma Chemical Co.). Los geles fueron preparados de acuerdo con Wendel y Weeden (1989), con una modificación al porcentaje de almidón, ya que para *Malacomeles denticulata*, se elevó a 13.5%. Esta fue una modificación a las recetas originales que se han mencionado, ya que se buscó el porcentaje adecuado de almidón hidrolizado para obtener geles con buena consistencia y que ofrecieran mejores resultados.

Los componentes del gel, contenidos en un matraz, se calentaron en horno de microondas por ciclos de 30 segundos, seis ciclos para el gel de histidina y 9 para el de Borato de Litio, agitando perfectamente la mezcla antes de cada ciclo, hasta alcanzar la ebullición, posteriormente se aspiró con una bomba, el aire para evitar que el gel tuviera burbujas ya que podrían dificultar la migración de proteínas, inmediatamente después se agregó la mezcla sobre el molde para la elaboración del gel, previamente engrasado con aceite.

Como moldes de gelificación se emplearon marcos de metacrilato transparente; luego de una hora se almacenaron en el refrigeración por 18 horas aproximadamente, para su utilización al día siguiente.

5.1.4 Carga de muestras.

Previo a la colocación de las muestras en el gel se efectuó un corte transversal a dos centímetros del extremo catodal; se colocaron los pabilos, impregnados con los extractos y se colocaron a lo largo del corte realizado en el gel. Después se insertó al inicio del extremo derecho del gel un recorte de papel filtro con azul de bromofenol que sirvió como indicador del desarrollo del corrimiento electroforético.

5.1.5 Desarrollo del corrimiento.

Se empleó como fuente de poder el modelo Sigma P500B. Los geles se situaron sobre cubas de plástico conectadas a la fuente de poder, y todo el corrimiento se realizó en refrigeración a una temperatura de 4 °C; a los 15 minutos de iniciarse el corrimiento, se retiraron del gel los papeles filtro y se restablecieron las condiciones eléctricas preliminares durante cinco horas en promedio para ambos geles, en cada caso se detuvo el corrimiento cuando el indicador alcanzó 1 ó 2 cm del extremo anodal. El gel fue inmediatamente cortado en rebanadas horizontales de 2mm a 3mm de grosor aproximadamente, las rebanadas fueron colocadas en recipientes rectangulares, para su tinción.

5.1.6 Tinción.

Las tinciones se llevaron a cabo en bandejas rectangulares de plástico. El tiempo de incubación para las enzimas fue de aproximadamente 2 horas, a una temperatura constante que va de acuerdo a los requerimientos que indica cada receta. Una vez obtenido el revelado, y cuando los resultados fueron satisfactorios los geles fueron fotografiados y almacenados en refrigeración para su conservación y posible consulta.

5.1.7 Lectura de bandas y análisis

La interpretación genética de los zimogramas se realizó en el laboratorio de Genética, y en todos los casos las bandas se apreciaron a simple vista por lo que no fue necesario utilizar algún otro recurso para la lectura de las bandas.

Se analizaron los datos de los genotipos hallados en los individuos con el programa FSTAT versión 2.9.3 de Gaudet (1995).

5.2 Variables a estudiar

Para determinar la diversidad genética, o bien la variación genética de las poblaciones a muestrear, se determinó:

- a) Porcentaje de polimorfismo de la población (P). Número de loci polimórficos dentro del total de los loci muestreados.
- b) Número de alelos por locus (A).
- c) Número de alelos por locus polimórfico (A_p).
- d) Riqueza alélica (R_t).
- e) Heterocigosidad observada (H_o) y heterocigosidad esperada (H_e)
- f) Coeficiente de endogamia (F). Podrá variar de cero (no hay endogamia) a uno (endogamia perfecta)

5.3 Sitios de estudio

Para el estudio genético de *Malacomeles denticulata*, se trabajó con las siguientes cuatro poblaciones:

- 1) Sto. Domingo Yanhuitlan. 17°30'54.4" N, 97°17'47.6" O, Matorrales, lugar con fuerte erosión del suelo.

2) Sto. Domingo Yanhuitlan cárcavas 17°30'54.4" N, 97°17'47.6" O, Matorrales, Cárcavas muy pronunciadas, lugar con fuerte erosión del suelo

3) Sn. Pablo Huitzo, 17°19'25.9" N, 96°52'34.9" O, Bosque de Encino.

4) Teotitlán del Valle, 17°3' N, 96°31' O, Selva Baja Caducifolia y chaparrales, lugar con poca perturbación.

5) Villa de Diaz Ordáz, 16°1' N 96° 43' 46'' O Selva Baja Caducifolia.

VI Resultados

6.1 Buffer de extracción

El buffer de extracción de proteínas que mostró mejores resultados fue el “megabuffer” de Werth, (1985) modificado de Soltis (1983) por lo que se utilizó para todas las extracciones realizadas en las hojas de *Malacomeles denticulata*.

6.2 Isoenzimas

De las 14 enzimas probadas (Cuadro 1), cinco se tiñeron y mostraron polimorfismo genético: PGI, AAT, MDH, PGM y 6GPDH. Se registró diferente número de alelos totales en cada población estudiada (Cuadro 2). Para Díaz Ordáz se encontraron 15 alelos, para Teotitlán del Valle 17 alelos, para Yanhuitlán 14 alelos, para Yanhuitlán Cárcavas 17 alelos y para Huitzo 17 alelos. Todas las bandas de las isoenzimas migraron anodalmente.

Cuadro 1. Enzimas probadas en *Malacomeles denticulata*. Se probaron en total catorce enzimas y veinticinco protocolos de revelado.

Phosphoglucomutase (PGM; E.C.5.4.2.2 Modificado de Wendel y Weeden, 1989).
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH; E.C.1.1.1.49) Soltis et al 1983.
Peroxidasa (PER; E.C.1.11.1.7) Murphy et al 1996.
Peroxidasa (PER; E.C.1.11.1.7 Wendel & Weeden, 1989)
Isotrato deshidrogenasa IDH; E.C. 1.1.42 + Fosfoglucomutasa PGM E.C.2.7.5.1 (Cheliak & Pitel 1984)
Isotrato deshidrogenasa (IDH; E.C.1.1.1.42 Soltis et al 1983)
Malato desidrogenasa (MDH; E.C. 1.1.1.37) (Soltis et al 1983)
Malato desidrogenasa (MDH; E.C. 1.1.1.37) (del Castillo 1992)
Fosfogluconato deshidrogenasa (PGD; E.C. 1.1.1.44) (Soltis et al 1983)
Fosfogluconato deshidrogenasa (6PGD E.C. 1.1.1.44 del Castillo 1992)
Fosfogluconato deshidrogenasa (PGD E.C. 1.1.1.44 Wendel y Weeden)
Diaforasa (DIA; E.C.1.6.99) Wendel y Weeden, 1989)
Esterasa (EST E.C.3.1.1.) (Wendel y Weeden, 1989)
Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH; E.C. 1.2.1.9) (Wendel & Weeden 1989).
Alcohol deshidrogenasa (ADH; E.C.1.1.1.1.) (Murphy et al 1996)
Fosfato Glucomerasa (PGM; E.C. 2.7.5.1) (Conkle et al 1982)
Fosfato Glucomerasa (PGM; E.C. 5.4.2.2) Wendel y Weeden 1989.
Fosfato Glucomerasa (PGM; E.C.5.4.2.2 Modificado de Wendel y Weeden (1989)
Fosfato Glucomerasa (PGM; E.C. 2.7.5.1) (Soltis et al 1983).
Aspartato amino transferasa (AAT) E.C. 2.6.1.1. (Modificado de Shaw y Prasad, 1970)
Aspartato amino transferasa (AAT; E:C: 2.6.1.1) (Wendel y Weeden 1989)
Fosfato glucoisomerasa (PGI; E.C. 5.3.1.9) Modificado de Wendel y Weeden (1989)
Diaforasa (DIA E.C.1.6.99, Wendel y Weeden, 1989), Método I
Diaforasa (DIA; E.C.1.6.4.3 Wendel y Weeden, 1989), Método II
Esterasa (EST E.C.3.1.1.) (Wendel y Weeden, 1989)

Cuadro 2. Enzimas que mostraron polimorfismo genético, en *Malacomeles denticulata*, en las poblaciones de estudio Díaz Ordaz, Teotitlán del Valle, Yanhuitlan, Yanhuitlan-Cárcavas y Huitzo, en la región de Valles centrales, Oaxaca, México.

ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN *Malacomeles denticulata*.

ENZIMAS QUE MOSTRARON POLIMORFISMO GENÉTICO									
LOCALIDADES	INDIVIDUOS COLECTADOS	TOTAL DE ALELOS ENCONTRADOS POR LOCALIDAD	PGI-I	PGI-II	AAT-I	AAT-II	MDH	PGM-II	6PGDH
Díaz Ordaz	27	15	2 alelos (11,12,22)	3 alelos (22,44,45)	2 alelos (11,12,22)	2 alelos (11,12)	2 alelos (11,12,22)	2 alelos (12,22)	2 alelos (11,12,22)
Teotitlán del Valle	41	17	2 alelos (11,12,22)	5 alelos (11,22,33,45,55)	2 alelos (11,12)	2 alelos (11,12,22)	2 alelos (11,12,22)	2 alelos (12,22)	2 alelos (11,12,22)
Yanhuitlan	34	14	2 alelos (11,12,22)	2 alelos (45,55)	2 alelos (11,12,22)				
Yanhuitlan Cárcavas	39	17	2 alelos (11,12,22)	5 alelos (11,22,33,45)	2 alelos (11,12,22)	2 alelos (11,12,22)	2 alelos (11,12,22)	2 alelos (11,12,22)	2 alelos (11,12)
Huitzo	36	17	2 alelos (11,12,12)	5 alelos (11,22,33,44,45)	2 alelos (11,12,22)	2 alelos (12,22)	2 alelos (11,12,22)	2 alelos (11,12)	2 alelos (11,12,22)
TOTALES	177	17	2 alelos (11,12,22)	5 alelos (11,22,33,44,45,55)	2 alelos (11,12,22)				

Se contabilizaron los genotipos encontrados en las enzimas analizadas por localidad. PGI-I, presentó tres genotipos, PGI-II; seis genotipos. AAT-I, AAT-II, MDH, PGM y 6PGDH, tres genotipos (Cuadro 3).

Cuadro 3. Resumen de genotipos encontrados, en *Malacomeles denticulata*, en las poblaciones de estudio Díaz Ordaz, Teotitlán del Valle, Yanhuitlan, Yanhuitlan-Cárcavas y Huitzo) en la región de Valles centrales, Oaxaca, México.

LOCUS													
PGI-I		PGI-II		AAT-I		AAT-II		MDH		PGM		6PGDH	
Genotipos	Individuos	Genotipos	Individuos	Genotipos	Individuos	Genotipos	Individuos	Genotipos	Individuos	Genotipos	Individuos	Genotipos	Individuos
11	69	11	7	11	19	11	16	11	38	11	21	11	31
12	86	22	6	12	65	12	85	12	75	12	39	12	21
22	15	33	6	22	22	22	8	22	18	22	30	22	17
		44	3										
		45	118										
		55	25										
						Genotipo más frecuente				Genotipo menos frecuente			

En el cuadro 4, se muestra con detalle, el número obtenido de individuos por locus y número de individuos por genotipo, en cada una de las diferentes poblaciones estudiadas.

Cuadro 4. Total de individuos observados por locus y por genotipo en *Malacomeles denticulata*. en cada una de las poblaciones estudiadas.

	PGI-I	PGI-II	AAT-I	AAT-II	MDH	PGM	6PGDH
LOCALIDADES	genotipo 11						
Díaz ORDAZ	19	0	3	3	7	0	2
TEOT. DEL VALLE	10	4	8	3	2	0	3
YANHUITLAN	8	0	4	7	16	6	4
YANHUITLAN - CARCAVAS	15	2	3	3	7	5	7
HUITZO	17	1	1	0	6	10	15
total	69	7	19	16	38	21	31
	genotipo 12	genotipo 22	genotipo 12				
Díaz ORDAZ	6	1	9	15	4	7	1
TEOT. DEL VALLE	25	3	5	20	30	14	6
YANHUITLAN	20	0	16	19	10	8	8
YANHUITLAN - CARCAVAS	22	1	24	14	11	2	5
HUITZO	13	1	11	17	20	8	1
total	86	6	65	85	75	39	21
	genotipo 22	genotipo 33	genotipo 22	genotipo 22	genotipo 22	genotipo 22	alelo 22
Díaz ORDAZ	1	0	7	0	9	5	7
TEOT. DEL VALLE	6	4	0	5	3	4	7
YANHUITLAN	3	0	9	1	3	12	2
YANHUITLAN - CARCAVAS	2	1	4	1	1	9	0
HUITZO	3	1	2	1	2	0	1
total	15	6	22	8	18	30	17
		genotipo 44					
Díaz ORDAZ		1					
TEOT. DEL VALLE		0					
YANHUITLAN		0					
YANHUITLAN - CARCAVAS		0					
HUITZO		2					
total		3					
		genotipo 45					
Díaz ORDAZ		23					
TEOT. DEL VALLE		6					
YANHUITLAN		27					
YANHUITLAN - CARCAVAS		34					
HUITZO		28					
total		118					
		genotipo 55					
Díaz ORDAZ		0					
TEOT. DEL VALLE		22					
YANHUITLAN		3					
YANHUITLAN - CARCAVAS		0					
HUITZO		0					
total		25					

6.3 Zimogramas de las enzimas analizadas

6.3.1 Glucosa 6 fosfato isomerasa (PGI; E.C. 5.3.1.9)

La enzima PGI, es una enzima dimérica (dos subunidades). Se observaron dos loci polimórficos (isoenzimas) con siete alelos (aloenzimas) en total (Figura 1). PGI-I presentó dos alelos y tres genotipos en cada localidad estudiada. El genotipo 12 fue el más común para el loci PGI-I, con un porcentaje de 50% de los genotipos observados. (Figura 1).

Para el locus PGI-II, se encontraron, cinco alelos, el genotipo 45 fue el más común, ya que alcanzó un total de 72% del total de genotipos. El genotipo 44, fue el menos común con un 2%, ya que sólo se detectó un individuo en Díaz Ordáz y dos individuos en la población de Huitzo.

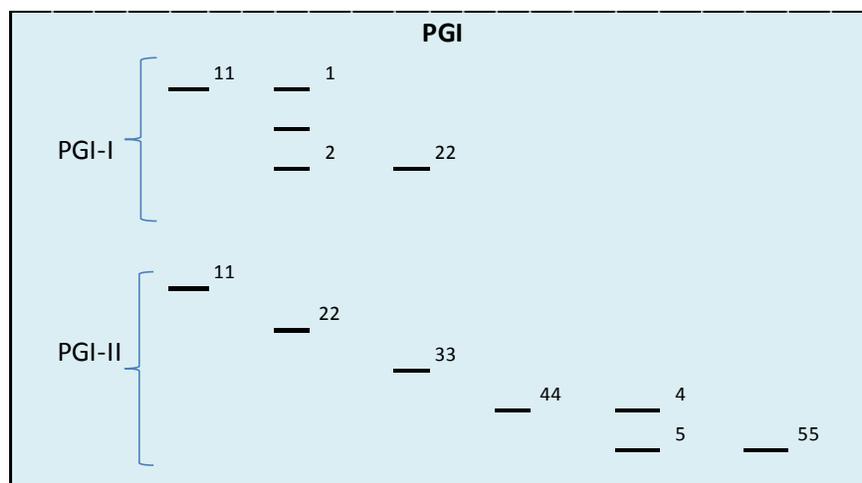


Figura 1. Zimograma de la enzima PGI. Dos loci encontrados (PGI-1, PGI-2) con las combinaciones alélicas observadas (11,12,22,33,44,45 y 55) en *Malacomeles denticulata* en las poblaciones de estudio.

6.3.2 Aspartato transaminasa (AAT, EC 2.6.1.1)

La enzima AAT, dimérica, presentó dos loci polimórficos con tres alelos cada uno (Figura 2). El genotipo 12 fue el más común en ambos loci, con un total de 61% en AAT-I y 78% en AAT-II,. AAT-I presentó tres alelos en Díaz Ordáz, dos alelos en Teotitlán del Valle, tres alelos en Yanhuitlan, tres alelos en Yanhuitlan-Cárcavas y tres alelos en Huitzo. Para AAT-I, no se detectaron alelos exclusivos ni únicos.

AAT-II presentó dos alelos en las poblaciones muestreadas, con dos genotipos en Díaz Ordáz, tres genotipos en Teotitlán del Valle, Yanhuitlan, y Yanhuitlan-Cárcavas y dos genotipos en Huitzo. Tampoco se detectaron alelos exclusivos ni únicos en éste loci.

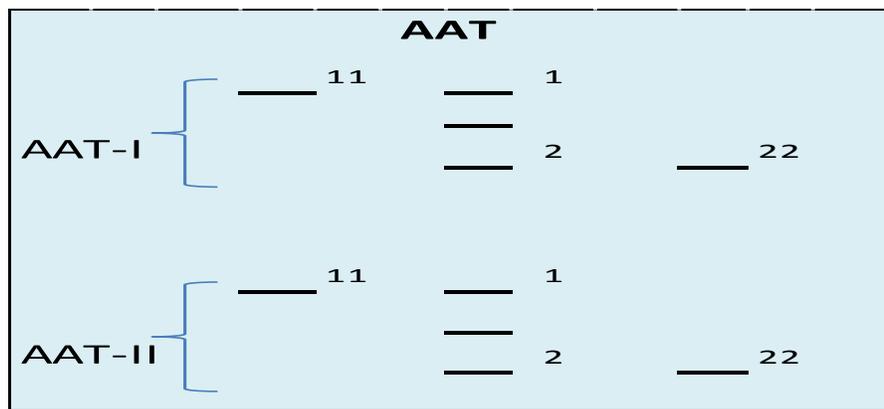


Figura 2. Zimograma correspondiente a la enzima AAT. Dos loci encontrados (AAT-1, AAT-2) con las combinaciones alélicas observadas (11,12, y 22) para *Malacomeles denticulata* en las poblaciones de estudio.

6.3.3 Malato deshidrogenasa (MDH; E.C. 1.1.1.37)

La enzima MDH es dimérica. Se observaron dos alelos en el único locus observado (Figura 3). El genotipo 12 fue el más común (57%), y el genotipo 22 fue el menos común (14%), en Teotitlán del Valle, únicamente se observó en un individuo. Se observaron los tres alelos en cada localidad estudiada, no hubo alelos únicos ni exclusivos para ninguna localidad.

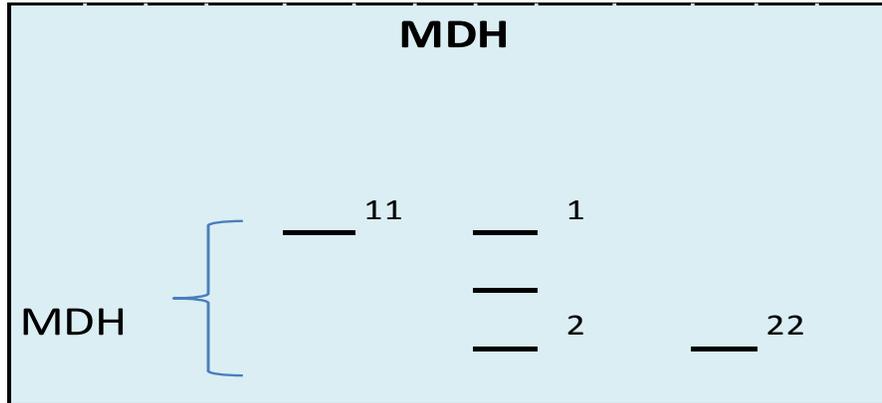


Figura 3. Zimograma correspondiente a la enzima MDH. Un locus encontrado, con las combinaciones alélicas observadas (11,12, y 22en *Malacomeles denticulata* en las poblaciones de estudio.

6.3.4 Fosfoglucomutasa (PGM; E.C.5.4.2.2)

La enzima PGM fue la única enzima monomérica (una unidad en su configuración terciaria) analizada. Se registraron dos alelos en el único locus observado (figura 4). El genotipo 12 fue el más común (43%). Se observaron dos genotipos en Díaz Ordaz, y Teotitlán del Valle, tres genotipos en Yanhuitlan, y Yanhuitlan-Cárcavas y

dos genotipos en Huitzo. Huitzo fue la única localidad en donde no se observó el genotipo 22.

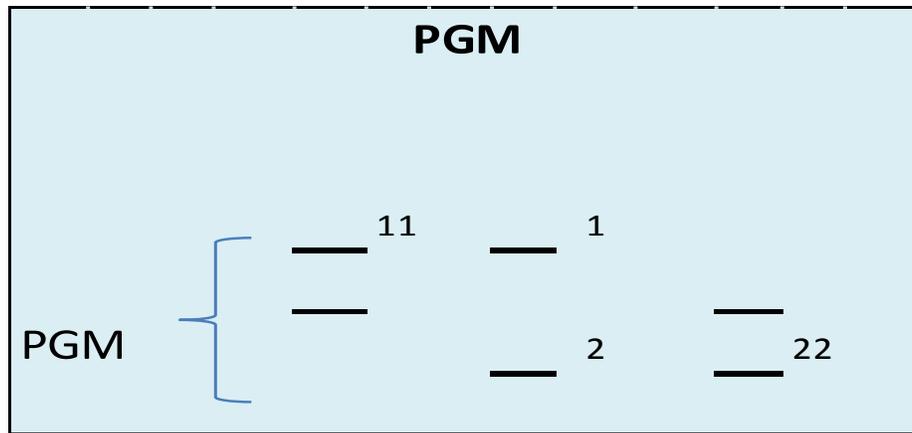


Figura 4. Zimograma correspondiente a la enzima PGM. Un locus encontrado, con las combinaciones alélicas observadas 11,12, y 22 para *Malacomeles denticulata* en las poblaciones de estudio (Díaz Ordaz, Teotitlan del Valle, Yanhuitlan, Yanhuitlan-Cárcavas y Huitzo) en la región de Valles centrales, Oaxaca, México.

6.3.5 Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH; E.C.1.1.1.49)

En la enzima G6PDH, dimérica, se notaron dos alelos en el único locus observado (figura 5). El genotipo 11 fue el más común (45%). Se observaron tres genotipos en Díaz Ordaz, Teotitlán del Valle, Yanhuitlan y en Huitzo, y dos alelos en Yanhuitlan-Cárcavas. Yanhuitlan-Cárcavas fue la única localidad en donde no se observó el genotipo 22.

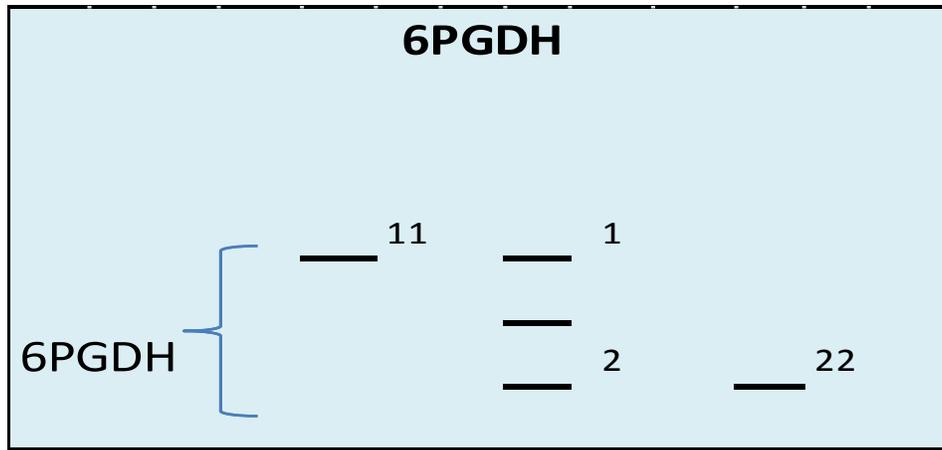


Figura 5. Zimograma correspondiente a la enzima 6PGDH. Un loci encontrado, con las combinaciones alélicas observadas (11,12, y 22) para *Malacomeles denticulata* en las poblaciones de estudio (Díaz Ordaz, Teotitlan del Valle, Yanhuitlan, Yanhuitlan-Cárcavas y Huitzo) en la región de Valles centrales, Oaxaca, México.

6.4 Análisis Genéticos

6.4.1 Polimorfismo, número de alelos por locus y número de alelos por locus polimórfico.

Debido a que los 7 loci analizados fueron polimórficos, el porcentaje de polimorfismo fue del 100% y los valores del número de alelos por locus (A) y número de alelos por locus polimórfico (A_p) fueron iguales. Estos parámetros genéticos se presentan en el Cuadro 5. El locus PGI-2, fue el que mostró mayor número de alelos con hasta 5 alelos observados en las poblaciones de Teotitlán del Valle, Yanhuitlán cárcavas y Huitzo.

Cuadro 5. Número de alelos por locus (A) y número de alelos por locus polimórfico (Ap), obtenidos en *Malacomeles denticulata* en las poblaciones de estudio, (Díaz Ordaz, Teotitlan del Valle, Yanhuitlan, Yanhuitlan-Cárcavas y Huitzo) en la región de Valles centrales, Oaxaca, México.

	Díaz ORDAZ	TEOT. DEL VALLE	YANHUITLAN	YANHUITLAN - CARCAVAS	HUITZO
PGI-1	2	2	2	2	2
PGI-2	3	5	2	5	5
AAT-1	2	2	2	2	2
AAT-2	2	2	2	2	2
MDH-1	2	2	2	2	2
PGM-1	2	2	2	2	2
PGD-1	2	2	2	2	2
<i>Promedio</i>	2.143	2.429	2.000	2.429	2.429

6.4.2 Riqueza alélica.

Para la Riqueza alélica (R_t) por locus y por población, los resultados, se basaron en un tamaño de muestra mínima de 10 individuos diploides (Cuadro 6). En general el valor de la Riqueza alélica tuvo un valor promedio de 2 con excepción de la población de Teotitlan del Valle, en la que se observó en el locus PGI-II, un valor más elevado (4.521), que el resto de las poblaciones y loci estudiados.

Cuadro 6. Riqueza alélica por locus y población, basada en una muestra mínima de 10 individuos diploides, para *Malacomeles denticulata* en las poblaciones de estudio, (Díaz Ordaz, Teotitlan del Valle, Yanhuitlan, Yanhuitlan-Cárcavas y Huitzo) en la región de Valles centrales, Oaxaca, México.

	DIAZ ORDAZ	TEOT. DEL VALLE	YANHUITLAN	YANHUITLAN CARCAVAS	HUITZO
PGI - I	1.986	2	2	2	2
PGI - II	2.645	4.521	2	3.633	3.552
AAT - I	2	2	2	2	2
AAT - II	2	2	2	2	2
MDH	2	2	2	2	2
PGM	2	2	2	2	2
PGD	2	2	2	2	1.939
<i>Promedio</i>	2.090	2.360	2.000	2.233	2.213

6.4.3 Heterocigosidad

Los valores de la heterocigosidad observada (H_o) así como la heterocigosidad esperada bajo un equilibrio Hardy-Weinberg (H_e) obtenidas en todas las poblaciones estudiadas, se muestran en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Heterocigosidad observada (H_o), y heterocigosidad esperada (H_e) bajo un equilibrio Hardy-Weinberg, para *Malacomeles denticulata* en las poblaciones de estudio, (Díaz Ordaz, Teotitlan del Valle, Yanhuitlan, Yanhuitlan-Cárcavas y Huitzo) en la región de Valles centrales, Oaxaca, México.

POBLACIONES

LOCUS	DIAZ ORDAZ		TEOT. DEL VALLE		YANHUITLAN		YANHUITLAN CARCAVAS		HUITZO	
	H_o	H_e	H_o	H_e	H_o	H_e	H_o	H_e	H_o	H_e
PGI-I	0.231	0.266	0.610	0.500	0.645	0.492	0.564	0.449	0.394	0.417
PGI-II	0.920	0.540	0.154	0.569	0.900	0.497	0.895	0.600	0.848	0.587
AAT-I	0.474	0.491	0.385	0.321	0.552	0.493	0.774	0.503	0.786	0.505
AAT-II	0.833	0.490	0.714	0.503	0.704	0.480	0.778	0.500	0.888	0.500
MDH	0.200	0.516	0.857	0.502	0.345	0.408	0.579	0.459	0.714	0.495
PGM	0.583	0.424	0.778	0.480	0.308	0.486	0.409	0.496	0.444	0.353
PGD	0.100	0.411	0.375	0.488	0.571	0.505	0.417	0.341	0.059	0.169
PROMEDIO	0.477	0.448	0.553	0.480	0.575	0.480	0.631	0.478	0.590	0.432
DESV.EST.	0.320	0.093	0.255	0.076	0.205	0.033	0.261	0.078	0.337	0.138

6.5 Estadística F de Wright

Los análisis realizados con la prueba estadística F de Wright, mostraron con un intervalo de confianza del 95%, valores negativos en la endogamia total (Fit= - 0.290) y en la endogamia dentro de poblaciones (fis= - 0.355). No obstante, en el cálculo de la endogamia entre poblaciones, se detectó un valor positivo (Fst= 0.087) que indica que las cinco poblaciones estudiadas, se encuentran genéticamente diferenciadas. En el cuadro 8, se muestran los valores de la estadística F de Wright obtenidos en cada locus estudiado.

Cuadro 8. Estadística F de Wright obtenida en siete loci polimórficos de *Malacomeles denticulata* en las poblaciones de estudio, (Díaz Ordaz, Teotitlan del Valle, Yanhuitlan, Yanhuitlan-Cárcavas y Huitzo) en la región de Valles centrales, Oaxaca, México. Fit=coeficiente de endogamia total de las poblaciones, Fst= coeficiente de endogamia entre poblaciones, Fis=coeficiente de endogamia dentro de las poblaciones obtenidos con un intervalo de confianza al 0.95 % por medio de la técnica de bootstrapping.

Loci	fit	fst	fis
PGI-I	-0.113	0.043	-0.163
PGI-II	-0.182	0.07	-0.271
AAT-I	-0.206	0.063	-0.288
AAT-II	-0.562	0.01	-0.577
MDH	-0.159	0.039	-0.206
PGM	0.15	0.112	0.042
PGD	0.404	0.264	0.19
Promedios	-0.096	0.087	-0.2
Intervalo de confianza al 95%, por el método bootstrapping			
	-0.29	0.04	-0.355
	0.118	0.151	-0.034

VII Discusión

7.1 Isoenzimas

Con base en uno de los objetivos específicos, se logró estandarizar la técnica electroforética para *Malacomeles denticulata*. De los buffers probados para ésta especie, el buffer de extracción que mostró mejores resultados fue el “megabuffer de Werth (1985).

Se encontraron cinco enzimas polimórficas y siete loci: PGI-I, PGI-II, AAT-I, AAT-II, PGM, PGD y MDH. Debido a la inexistencia de trabajos realizados con aloenzimas en *M. denticulata*, se realizaron comparaciones con especies cercanas. En *Pyrus communis* (pera), la cual también pertenece a la subfamilia Maloideae, Chevreau et al (1997), reportan once enzimas polimórficas en distintas variedades de pera. Entre éstas, AAT, PGI, PGM y PGD que coinciden con las enzimas polimórficas halladas en *M. denticulata*. En otra rosaceae, *Sorbus aucuparia* L. (azarrollo), Raspe et al (1998) encontraron, siete enzimas polimórficas, de las cuales AAT, 6PGD, PGM y MDH coinciden con el presente estudio.

En *Pyrus communis* L., en la enzima AAT, se reportan tres loci, en *Sorbus aucuparia* L., se reportan dos loci en AAT al igual que lo observado en *M. denticulata*, en la cual predominaron los individuos heterocigotos. El genotipo 12 fue el más común en ambos loci, con un total de 61% en AAT-I y 78% en AAT-II

En *Pyrus communis* L., Chevreau et al (1997), reportan en la enzima PGD, un locus y dos alelos, lo cual también fue observado en *Malacomeles denticulata*. No obstante, en *S. aucuparia* L. se reportan cinco locus de los cuales, mencionan que el tercer loci constó de un patrón de bandeo que evidenció tres genotipos. Esto concuerda con lo que se reporta en este estudio para *M. denticulata*, tanto en el loci observado y los patrones de bandeo.

Para PGI, en *Pyrus communis* L., se encontraron hasta 6 patrones de bandeo, y fueron identificados cinco alelos activos, (a,b,c,d y e) lo cual también ocurrió con ésta enzima en *Malacomeles denticulata*, (1,2,3,4, y 5). Los patrones de bandeo que mostró PGI en este estudio son de gran importancia, ya que en el loci PGI-II, se observó la variabilidad genética más alta de las poblaciones estudiadas. En PGI-2 registramos cinco alelos con cuatro genotipos. El genotipo 45 fue el más común, con 72% de frecuencia genotípica. El genotipo 44, fue el menos común con 2%, sólo fue observado un individuo en Díaz Ordáz y dos individuos en la población de Huitzo.

La evidencia de que el genotipo homocigoto se encuentre presente en éstas poblaciones, en un porcentaje tan bajo (2%), y que exista predominio de heterocigotos (72%), puede indicar que la planta ante factores ambientales

estresantes, presenta heterosis como estrategia de sobrevivencia, es decir, debido a su amplio acervo genético, su genoma se adapta a las necesidades presentes, lo que le permite subsistir ante éstas condiciones.

En PGM, para *Sorbus aucuparia* L., Raspe *et al* (1998) reportan tres zonas de actividad, con un patrón de bandeo monomérico, y dos genotipos, los cuales se reportan también para *Pyrus communis* L., y coincide con el bandeo que se observó en *M. denticulata*.

Raspe *et al* (1998) mencionan que la presencia de isoenzimas en un organelo es la consecuencia de cada una de las duplicaciones de genes o de la adición del genoma en especies poliploides. Las numerosas isoenzimas observadas en *M. denticulata* posiblemente obedezcan a la poliploidía que caracteriza a la subfamilia Maloideae. Evans *et al* (2002) en un estudio realizado en la secuencia del gen de la síntesis del almidón (GBSSI) en esta subfamilia, proponen que el número cromosómico de 17 hallado en este grupo taxonómico, obedece a un evento de aneuploidía, a partir de un número cromosómico de 18.

7.2 Análisis Genéticos

7.2.1 Polimorfismo, número de alelos por locus y número de alelos por locus polimórfico.

De acuerdo con los valores promedio obtenidos en el porcentaje de polimorfismo, riqueza alélica, número de alelos por locus, así como la heterocigocidad observada en *Malacomeles denticulata*, se evidencia una elevada variabilidad genética en las poblaciones estudiadas.

Aunque no existen estudios aloenzimáticos previos para ésta especie, que reporten parámetros genéticos que puedan ser comparables a los observados en éste estudio, se han realizado trabajos de variabilidad morfológica. Hernández *et al* (2011), al estudiar la variabilidad en las semillas de *M. denticulata*, en seis poblaciones pertenecientes al estado de Guanajuato, encontraron una elevada variabilidad intrapoblacional, (se reportan valores obtenidos por el índice de varianza interna, en un rango de 0.2659 a 0.8196). Distinguieron las poblaciones del oriente del estado de Guanajuato de las del occidente, y hacen mención de que éstas regiones presentan climas diferentes (semicálido, templado y estepa seca) Hernández *et al*, (2011) suponen que las variaciones de tamaño de semilla observadas pudieran tener una base genética y por consiguiente tener al menos dos diferentes acervos genéticos dentro del estado de Guanajuato.

Ramírez (2009), quien realizó un estudio de genética cuantitativa en *M. denticulata* con caracteres morfológicos de área foliar, dentición de la hoja y tasa relativa de crecimiento, en las mismas poblaciones aquí estudiadas (con excepción de las cárcavas de Yanhuitlán), observó que la población de Huitzo y Yanhuitlan mostraron mayor variación genética, así como los valores más altos de heredabilidad para los tres caracteres foliares que él analizó (área foliar, TCR y dentición: 0.65, 0.34, y 0.73 respectivamente). Concluye que estos valores muestran variación y presume que dichos valores sugieren la existencia de variabilidad genética entre poblaciones. Resultados que concuerdan con el estudio aloenzimático en *M. denticulata*, donde Yanhuitlán cárcavas es la población que muestra el valor más alto de heterocigosidad promedio observada (0.631).

7.2.2 Estadística F de Wright

La estadística F de Wright obtenida muestra un valor de F_{is} negativo (-0.355) y significativo, lo que indica exceso de heterocigotos dentro de las cinco poblaciones estudiadas de *Malacomeles denticulata*. La heterosis parece ser un mecanismo importante en esta rosácea silvestre que le permite subsistir en los ambientes más erosionados y degradados como lo es en las cárcavas de Yanhuitlán, donde se observó la heterocigosidad mas elevada. Por consiguiente, es una especie que puede ser considerada en procesos de restauración y reforestación en zonas degradadas, dada la elevada variación genética que posee esta especie en sus

poblaciones lo que le puede conferir una gran capacidad para adaptarse a diversas condiciones ambientales.

El valor de F_{st} (0.087) fue positivo, lo cual muestra evidencia de que existe diferenciación genética entre las poblaciones estudiadas.

VIII Conclusiones

Los resultados obtenidos de la estandarización, muestran que la actividad isoenzimática en el extracto protéico de *Malacomeles denticualta*, puede ser analizada por medio de técnicas electroforéticas.

Las enzimas polimórficas encontradas en este estudio, son similares a las reportadas en otras rosáceas de la subfamilia Maloideae como lo son *Pyrus communis* L., y *Sorbus aucuparia* L.,

El locus PGI-II, mostró la variabilidad más alta en todas las poblaciones, con cinco alelos, (cuatro genotipos) donde el genotipo heterocigoto 45 fue el más común, (72%). La diversidad genética estimada en *Malacomeles denticulata*, mediante el porcentaje de polimorfismo (P), número de alelos por locus (A), número de alelos por loci polimórfico (A_p), riqueza alélica (R_t), así como el grado de heterocigosidad resultó elevada. Se encontró evidencia de una alta heterocigosidad en prácticamente todos los loci estudiados.

Se encontró evidencia genética de diferenciación entre poblaciones, con base en estadístico F de Wright, así como evidencia de exceso de heterocigotos en todas las poblaciones lo que sugiere la posibilidad de heterosis.

IX Recomendaciones

Este estudio es el primero en determinar variabilidad genética en poblaciones de *Malacomeles denticulata*, por medio de isoenzimas, por lo tanto sus resultados son de gran valor para la toma de decisiones, en cuanto a su manejo y protección.

Los resultados encontrados en las cinco poblaciones de *Malacomeles denticulata* sugieren continuar con los estudios genéticos, aún escasos para ésta especie, con el fin de conocerla mejor y tener herramientas suficientes para determinar estrategias de conservación y programas de restauración tanto de suelo, como de cobertura vegetal.

BIBLIOGRAFIA

Altieri, M.; Anta, F.S.; Caballero, J.J y Hernpandez, J.J. 2006. Manejo del agua y restauración productiva en la región indígena Mixteca de Puebla y Oaxaca. Banco Internacional de Reconstrucción y Formento-Banco Mundial. P.93.

Blanco, A. A. y Martínez, R. S. 2001. Aplicación de un modelo de balances hídricos en la cuenca alta del Río Mixteco (Oaxaca). Universidad Tecnológica de la Mixteca-Politécnica de Madrid. Huajuapán de León, Oaxaca. P. 180.

Campbell, C.S.; Evans, R.C.; Morgan, D.R.; Dickinson, T.A.; Arsenault, M.P. (2007). Phylogeny of subtribe Pyrinae (formerly the Maloideae, Rosaceae): Limited resolution of a complex evolutionary history. *Plant Systematics and Evolution*. 266(1–2): 119–145.

Campos, H. 1995. Marcadores moleculares: conceptos. *Agrosur* 23(1): 68 – 75.

Cheliak, W.M. y J.A. Pitel. 1984. Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species. Information report PI-X-42. Petawa National Forestry Institute, Berkeley, EUA.

Chevreau, E., S. Leuliette and M. Gallet, *Inheritance and linkage of isozyme loci in pear (Pyrus communis L.)*, *Theor. Appl. Genet.* 94 (1997), pp. 498-506

Conabio, 2000. Estrategia nacional sobre biodiversidad de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. Edición digital: Conabio 2000).

Conkle, M.T., Hoopskiss, P.D., Nunnally, L.B. y S.C. Hunter. 1982. Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual. Pacific southwest forest and range experiment station. Berkeley, California, USA. 18 p.

Cornuet JM, Liudart G (1996) Description and power análisis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frecuencia data. *Genetics* 144: 2001-2014.

Cruz, C. E. 1992. Los agostaderos cumunales de Tiltepec, un caso típico del deterioro ambiental de la Mixteca Alta Oaxaqueña. Tesis de Maestría. CP. Montecillo, México. P. 213.

Cruz, C. E. 2005. Morphological variabiliti and seed dormancy of *Amelanchier* (Rosaceae) grown in Oaxaca, México. Tesis Doctoral. Oregon State University. p. 200.

Egger, K. N. 1992. Analysis of fungal population structure using molecular techniques. En. "The fungal Community, its organization and role in ecosystem", 2da edic. GC Carroll y Dt Wiclow edic. Mycology 9:2 193 – 208.

Evans R. C. 1999 Molecular, morphological, and ontogenetic evaluation of relationships and evolution in the Rosaceae. Ph.D., University of Toronto, Toronto, Ontario, Canada.

Evans, Et al, 2002. The origin of the Apple subfamily (Maloideae; Rosaceae) is clarified by DNA seunce data from duplicated GBSSI genes. *American Journal of Botan*, 89(9):1478-1484.

Flores, O.M. y Linding, C. R. 2005. La lista de nombres vulgares y botánicos de árboles y arbustos propicios para repoblar los bosques de la República de Fernando Altamirano y José Ramírez a más de 110 años de su publicación. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 76:11-35.

Frankham, R., 1995. Conservation Genetics. *Annual Review of Genetics* 29: 305-327.

Frankham JD, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to conservation genetics*. University Press Cambridge: Reino Unido, 617 pp.

Gilpin, M.E., & Soulé, M.E. (1986). Minimum viable populations: The processes of species extinctions. In M. Soulé (Ed.). Conservation biology: The science of scarcity and diversity, pp. 13-34. Sunderland Mass: Sinauer Associates.

González, D. 1998. "Marcadores moleculares para los estudios comparativos de la variación en ecología y sistemática". Revista Mexicana de Micología 14:1-21 p.

Gottlieb LD (1981) Electrophoretic evidence and plant populations. *Prog phitochem* 7: 1-46. Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm [accessed 1 January 1995];

Hanan, A. A. M.; Mondragón, P. J.; Vibrans, H. y Lezama, P. 2006. Malezas de México, Rosaceae, *Malacomeles denticulata* (Kunth) Engelm.

<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/rosaceae/amelanchier-denticulata/fichas/ficha.htm>. Consultado el 10 de noviembre de 2010.

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, Miguel Ángel; NÚÑEZ-COLÍN, Carlos Alberto; GUZMÁN-MALDONADO, Salvador Horacio; ESPINOSA-TRUJILLO, Edgar y HERRERA-HERNÁNDEZ, María Guadalupe. VARIABILIDAD MORFOLÓGICA MEDIANTE CARACTERES DE SEMILLA DE POBLACIONES DE *Amelanchier denticulata* (Kunth) Koch, ORIGINARIAS DE GUANAJUATO, MÉXICO. Revista Chapingo. Serie Horticultura [en línea] 2011, vol. 17 [citado 2012-11-25]. Disponible en Internet:

<http://www.redalyc.org/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=60921383007.ISSN 0186-3231>.

INEGI. 1985. Carta uso del suelo y vegetación. 1:250,000. Oaxaca E14-9.

Izquierdo LY, Piñero D (1998) Allozyme divergente among four species of *Podaechmeas* and the status of *Ursulaea* (Bromeliaceae, Bromelioideae) Plant Systematics and Evolution 213: 207-215.

León, O. 1998. Marcadores moleculares. Principales tipos y bases moleculares, ventajas y limitaciones. Comide, M. T. (Editora), CNIC, p 1 – 18.

León, S.J. 2007. Acciones que contribuyen a la restauración de suelos y el mejoramiento del medio ambiente. DEDICAM Programa Escuela Campesina, primera parte. Asunción Nochixtlán. Oaxaca. P.1-20

Loh, J. y Wackernagel, M. (eds.). 2004. Informe Planeta Vivo 2004. WWF, Gland.

Lorenzo, C. 1998. "Estudios cromosómicos en conejos y liebres silvestres de México. TIP" Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. División de Investigación. 1(1):17-29 p.

Lorenzo, M. C., M. García B., E. Espinoza M. 2003. La Sistemática en la Conservación de especies. ECOFRONTERAS No. 19. 38-41 pp.

Marcucci, P. S.; Acuña, C.; Torales, S.; Zelener, N.; Pathaver, P. y López, G. s/f. En huertos semilleros de especies de Eucalyptus: Evaluación de la Variabilidad Genética. *idiaXXI*. pp. 180-184.

Mitton, J. B. y B. Linhart, B. K. Sturgeon and J. L. Hamrick, 1979. *Allozyme polymorphisms detected in mature needle tissue of Ponderosa pine, Pinus ponderosa Laws.* J. Heredity 70:86-89.

Murphy RW, Sites JW, Buth DG, Haufler CH (1996). Proteins: Isozyme electrophoresis. En: Hillis, D. M Moritz C y Mable B. K. (eds). *Molecular systematics*. Sinauer: Estados Unidos. Pp 51-120.

Nuez, F. y Carrillo, J.M. (2000) Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Valencia. Universidad Politécnica de Valencia.

Perfectti F. & L. Pascual. 1996. Segregation distortion of isozyme loci in cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) *Theor Appl Genet*; 93: 440-446.

Ramírez, I. 2009. "VARIABILIDAD GENÉTICA EN POBLACIONES DE *Amelanchier denticulata* EN OAXACA, MÉXICO". Tesis Maestría. CIIDIR-OAXACA. IPN. 48p.

Rzedowski, J. y Calderón G. 2005. rosaceae. Flora del Bajío y regiones adyacentes. Instituto de Ecología-Centro Regional del Bajío. Patzcuaro, Michoacán, México. p. 163.

Solís-Ramos, 2005. L. Y., y A. Andrade-Torres. ¿Qué son los marcadores moleculares? *La Ciencia y El Hombre*. Enero-Abril. Vol. XVIII (1): 41-46. ISSN: 0187-8786. <http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol18num1/articulos/moleculares/index.htm>

Soltis DA, Haufler CH, Darrow DC, Gastony GJ (1983) Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. *Am Fern J* 73: 9-27

Storfer, A. 1996. Quantitative genetics: a promising approach for the assessment of genetic variation in endangered species. *PERSPECTIVES*. Vol. II. pages 343-347.

Toledo V. M. y M. J. Ordóñez. 1998. El panorama de la biodiversidad de México: una revisión de los hábitats terrestres. En: Ramamoorthy, T.P. Fa. (eds.) *Diversidad biológica de México: orígenes y distribución*. Instituto de Biología, UNAM. p 739- 755. CONABIO: La diversidad biológica de México: Estado del País. 1998 CONABIO.

Trujillo, A. S. Y R. F. Del Castillo. Electroforesis de proteínas: el rastreo genético de poblaciones y especies. *Conversus*. 2003. núm. 17. pp 16-22.

Valadez, E. y Gunter, K. (2000) *Huellas de ADN en genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio)*. México: Universidad Autónoma de Chapingo/Mundi Prensa.

Wendel, J.F.& N.F. Weeden. 1989. Visualization and interpretation of plant isozymes. *In*: Soltis, D.E. y P.S. Soltis (Eds.). *Isozymes in plant biology*. Chapman and Hall. London.

Werth, C.R. 1985. *Implementing an isozyme laboratory at a field station*. *Virginia Journal of Science* Vol. 36 Number 1.

