



**Instituto Politécnico Nacional**  
Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo  
Integral Regional, Unidad Oaxaca

Maestría en ciencias en conservación y  
aprovechamiento de los recursos naturales  
(Biodiversidad del neotrópico)

**“Diversidad genética de una bromelia de  
importancia comercial”**

Tesis que para obtener el grado de Maestra en Ciencias

Presenta:  
**Zaneli Gómez Ocampo**

Directores de tesis:

**Dr. Rafael Felipe del Castillo Sánchez**  
**M. en C. Sonia Trujillo Argueta**

Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México. Noviembre 2007.



# 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 05 del mes de Noviembre del 2007 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:

**“Diversidad genética de una bromelia de importancia comercial”**

Presentada por la alumna:

Gómez  
Apellido paterno

Ocampo  
materno

Zaneli  
nombre(s)

Con registro: 

B	0	5	1	3	7	0
---	---	---	---	---	---	---

aspirante al grado de: **MAESTRO 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.

#### LA COMISION REVISORA

Directores de tesis:

Dr. Rafael Felipe del Castillo Sánchez

M. en C. Sonia Trujillo Argueta

Dr. José Antonio Vargas Mendoza

Dra. Demetria Martha Mondragón Chaparro

M. en C. Alejandro Flores Martínez

LA PRESIDENTA DEL COLEGIO

Dra. María del Rosario Arnaud Viñas



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL  
CIIDIR-UNIDAD OAXACA



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

*CARTA CESION DE DERECHOS*

En la Ciudad de Oaxaca de Juárez el día 06 del mes Noviembre del año 2007, el (la) que suscribe **GÓMEZ OCAMPO ZANELI** alumno (a) del Programa de **MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES** con número de registro **B051370**, 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 del Dr. Rafael Felipe del Castillo Sánchez y la M. en C. Sonia Trujillo Argueta y cede los derechos del trabajo titulado: **“Diversidad genética de una bromelia de importancia comercial”**, 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](mailto:posgradoax@ipn.mx) ó [gooz0117@yahoo.com.mx](mailto:gooz0117@yahoo.com.mx). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.



INSTITUTO POLITÉCNICO  
NACIONAL  
CIDIR-UNIDAD-OAXACA

---

**GÓMEZ OCAMPO ZANELI**

## Resumen

La bromelia epífita *Catopsis berteroniana* es una especie comercial para pobladores oaxaqueños por lo que es extraída de su hábitat natural. Por lo anterior, se determinó y se comparó el grado de afectación en la estructura genética de dos poblaciones de *C. berteroniana* con distinto grado de extracción, usando nueve isoenzimas en Santa Catarina Ixtepeji, Ixtlán de Juárez, Oaxaca, México. La variación genética en los sitios de estudio fue notablemente elevada. En promedio 90 % de los loci fueron polimórficos, con una media de 3.2 alelos por locus y una media de 3.4 alelos por locus polimórfico, una media de 3.2 en riqueza alélica, 0.402 en la diversidad genética promedio y finalmente 0.292 en heterocigosidad observada promedio. La endogamia total y dentro de las poblaciones resultó significativamente diferente de 0 ( $F_{it} = 0.271$ ,  $F_{is} = 0.256$ ). No obstante, la estadística F de Wright no detectó diferencia entre las poblaciones estudiadas ( $F_{st} = 0.021$ ). Se efectuó un análisis de autocorrelación espacial multialélica y multilocus, se observa una estructura genética de aislamiento por distancia y es significativamente positiva para individuos separados a menos de 1 Km de distancia y en individuos separados por más de 3 Km es significativamente negativa. Los datos no muestran evidencia de cuello de botella. La morfología floral de la planta, junto con los datos electroforéticos, sugieren que se trata de una planta funcionalmente dioica y por lo tanto de reproducción cruzada. Lo anterior puede influir en la alta variación genética encontrada en la especie comparada con otras bromelias autógamas o principalmente clonales. Al menos para este estudio, los datos no presentan evidencia de alguna afectación en la variación genética de la especie debida a la presión de explotación en la que se encuentra *Catopsis berteroniana*.

**Palabras clave:** *Catopsis berteroniana*, dioica, diversidad genética, cuello de botella, autocorrelación espacial global

## Abstract

The epiphyte bromeliad *Catopsis berteroniana* is an economically important plant for settlers nearby Oaxaca City. In this study we examine the genetic structure of two contiguous plant populations with different extraction rates through the analysis of nine polymorphic isozyme loci at Santa Catarina Ixtepeji, Ixtlan de Juarez, Oaxaca, Mexico. Both populations showed high levels of genetic variation. On average, 90% of all loci were polymorphic, with a mean number of 3.2 alleles per locus, a mean number of 3.4 alleles per polymorphic locus, a mean value of 3.2 of allelic richness. The mean observed and expected heterozygosities were 0.402 and 0.292 respectively. F- statistical analysis showed an overall significant deficiency ( $Fit = 0.271$ ) due to consanguine mating ( $Fis = 0.256$ ). Nevertheless, there was not differentiation detected among the populations studied ( $Fst = 0.021$ ). The multiallelic and multilocus spatial autocorrelation analysis revealed isolation by distances as both genetic and geographic were significantly positive for individual less than 1 Km apart; and significantly negative for distances longer than 3 Km. The electrophoretic data did not show evidence of bottlenecks. The open breeding system of this plant may contribute to the high levels of genetic variation compared to other autogamous or mainly clonally bromeliad species. Therefore, this study did not find evidence that current levels of plant extraction of *Catopsis berteroniana* had major impact on the genetic characteristics of the populations of this species.

**Key words:** *Catopsis berteroniana*, dioicous, genetic diversity, bottleneck, global spatial autocorrelation.

## **Agradecimientos**

Dr. Rafael Felipe del Castillo Sánchez. M en C. Sonia Trujillo Argueta. Biol. Raúl Rivera García. Dra. Demetria Martha Mondragón Chaparro. M. en C. Alejandro Flores Martínez. Dr. José Antonio Vargas Mendoza. M. en C. Gladys Isabel Manzanero Medina. Dr. Aniceto Rodolfo Solano Gómez. M. en C. José Antonio Santos Moreno. Eder Gil Méndez. Comunidad de Santa Catarina Ixtepeji. Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional- Instituto Politécnico Nacional- Unidad Oaxaca (CIDIIR-IPN-Unidad Oaxaca). Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Proyecto del Laboratorio de epífitas: Plan de manejo y conservación de tres especies comerciales de bromelias epífitas en los valles centrales de Oaxaca. CIIDIR-IPN- Unidad Oaxaca, clave CGPI 20050207 y 20060111- Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), clave SEMARNAT-2004-CO1-244. Proyectos del Laboratorio de genética y ecología vegetal, CIIDIR-IPN- Unidad Oaxaca: Proyecto de la Unión Europea (UE): Restoration of forest landscapes for biodiversity conservation and rural development in the drylands of Latin America (REFORLAN)- FP6-2004-INCO-DEV-3; Aspectos ecológicos de un bosque de niebla clave CIIDIR- U. Oaxaca-IPN, clave SIP 20060549; Proyecto BIOCORES, UE, Biología, conservación y restauración de paisajes fragmentados de bosque, clave CGPI 20040040.

# **Dedicatoria**

A mi familia, mi novio, mis amigos y compañeros

# Índice

Resumen .....	2
Abstract .....	5
Agradecimientos.....	6
Dedicatoria .....	7
Introducción.....	10
Revisión de literatura.....	15
Epifitas .....	15
Familia Bromeliaceae .....	16
Género <i>Catopsis</i> .....	16
<i>Catopsis berteroniana</i> (Schult. & Schult.f.) Mez .....	17
Marcadores moleculares.....	18
Electroforesis de proteínas .....	19
Enzimas .....	19
Diversidad genética .....	20
Genética de poblaciones en Bromeliaceae.....	20
Teorema de Hardy - Weinberg .....	22
Endogamia.....	22
Estadística F de Wright.....	23
Cuello de Botella.....	23
Autocorrelación espacial global .....	24
Objetivos .....	24
Objetivo general .....	24
Objetivos particulares.....	24
Materiales y métodos .....	25
Especie de estudio .....	25
Área de estudio .....	25
Muestreo .....	26
Electroforesis de proteínas.....	29
Análisis genéticos .....	30
Cuello de botella .....	30
Distribución espacial de los genotipos .....	31
Resultados .....	31
Isoenzimas.....	31
Aspartato transaminasa (AAT, EC 2.6.1.1) .....	31
6- fosfogluconato deshidrogenasa (PGDH, EC 1.1.1.44).....	32



Glucosa - 6 - fosfato isomerasa (GPI, EC 5.3.1.9) .....	33
Peroxidasa (PER, EC 1.11.1.7).....	34
Gliceraldehido - 3 - fosfato deshidrogenasa NADP <sup>+</sup> (G3PDH <sub>NADP</sub> , EC 1.2.1.9) .....	34
Análisis genéticos .....	35
Prueba sobre desequilibrio genotípico .....	35
Polimorfismo, riqueza y diversidad alélica.....	36
Heterocigosidad .....	36
Estadística F de Wright .....	37
Cuello de botella .....	37
Autocorrelación espacial global.....	38
Discusión.....	38
Isoenzimas.....	38
Estimadores de la diversidad genética .....	39
Estadística F de Wright.....	40
Cuello de Botella.....	42
Autocorrelación espacial global .....	43
Conclusiones.....	44
Literatura Citada.....	45
Apéndices.....	48
Apéndice I. Soluciones para el teñido de enzimas .....	48
Sistema de histidina.....	48
6 - fosfogluconato deshidrogenasa (PGDH) EC 1.1.1.44 (Cheliak y Pitel, 1984).....	48
Fosfoglucomutasa (PGM) EC 5.4.2.2 (Kress, 1990) .....	48
Peroxidasa (PER) EC1.11.1.7 (Murphy <i>et al.</i> , 1996).....	48
Gliceraldehido - 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH <sub>NADP</sub> ) EC 1.2.1.9 (Wendel y Weeden, 1989).....	48
Sistema de borato de litio .....	48
Aspartato transaminasa (AAT) EC 2.6.1.1 (modificado de Shaw y Prasad, 1970).....	48
Glucosa - 6 - fosfato isomerasa (GPI) EC 5.3.1.9 (González, 2004).....	49
Preparación de cofactores (Conkle <i>et al.</i> , 1982; Cheliak y Pitel, 1984) .....	49
Solución amortiguadora para extracción (Soltis <i>et al.</i> , 1983).....	49
Apéndice II. Interpretación genética de los zimogramas en Gliceraldehido - 3 - fosfato deshidrogenasa NADP <sup>+</sup> (G3PDH <sub>NADP</sub> , EC 1.2.1.9).....	50

# Diversidad genética de una bromelia de importancia comercial

## Introducción

Los recursos bióticos son susceptibles a un mal manejo debido, en parte, a la falta de comprensión de sus propiedades biológicas y de las funciones que realizan en el ecosistema. Debido a que las actividades humanas afectan los recursos biológicos es necesario conocer mejor su biología para fundamentar científicamente su manejo y conservación (Frankham *et al.*, 2002; Schonewald *et al.*, 2003).

El impacto de las actividades humanas sobre los recursos naturales, puede tener consecuencias tan catastróficas como la extinción de especies. Esta última puede deberse a varias causas tales como: la contaminación, la introducción de nuevas especies, los procesos estocásticos ambientales y demográficos, la sobreexplotación o la pérdida de hábitats (Lowe *et al.*, 2005). A pesar de que el proceso de extinción es parte de la evolución de las especies, en la actualidad, los cambios ambientales antropogénicos son tan bruscos que algunas especies no pueden ir cambiando con su ambiente (Schonewald *et al.*, 2003; Spielman *et al.*, 2004). Así como el ser humano ha intervenido en los procesos antinaturales de la extinción también puede prevenirla, es decir, conservar (González - Elizondo *et al.*, 1993).

La conservación de la biodiversidad, como un manejo integral de la diversidad biológica, es crucial para los ecosistemas; además, la biodiversidad posee valor económico real así como potencial. Ante la presión que ejerce el ser humano en los ecosistemas naturales, la conservación de la biodiversidad es cada vez más urgente (Pickett *et al.*, 1997).

Se han definido tres niveles distintos para el estudio de la biodiversidad los cuales son: paisaje, especie y genético. El genético es quizá el menos estudiado y por ello los conocimientos sobre éste deben fortalecerse mucho más. Además, la diversidad genética es la fuente de toda la variación biológica que existe sobre la tierra, del cambio evolutivo y de la adaptación de los organismos a su entorno (Loveless y Hamrick, 1984; Quamaruz- Zaman *et al.*, 1998; Raybould *et al.*, 2002).

La diversidad genética es estudiada por la genética de poblaciones que caracteriza a las poblaciones en función de las frecuencias alélicas y la

distribución de los alelos entre los individuos de una población. La genética de poblaciones tiene numerosas aplicaciones, una de ellas es la genética de la conservación que se encarga de generar bases genéticas para ayudar a preservar especies o poblaciones como unidades dinámicas (Murawski y Hamrick, 1990; Frankham *et al.*, 2002).

La genética de la conservación tiene como meta maximizar la retención de la diversidad genética y, al mismo tiempo, reducir la endogamia (apareamientos entre individuos emparentados) en poblaciones pequeñas, que generalmente causa pérdida de viabilidad en la población. Por otra parte, con herramientas genéticas es posible dar solución a problemas taxonómicos, delimitar unidades de manejo; y, con marcadores moleculares, se puede entender aspectos de la biología de las poblaciones como el flujo génico (Frankham *et al.*, 2002).

Una de las primeras etapas para la conservación de la diversidad genética es estimarla y determinar cómo es que ésta se distribuye entre los individuos y entre las poblaciones. La genética de la conservación permite estimar la variación dentro y entre grupos de especies por medio de técnicas de análisis proteico o de ADN. La estructura genética de las plantas es un reflejo de los diversos factores (selección natural, mutación, flujo génico y deriva génica) que pueden influir en su estructura (Gottlieb, 1981; Pérez y Piñero, 1997).

La selección natural es el resultado de un diferencial reproductivo entre los individuos debido a las características propias de éstos. La mutación genera cambios genéticos repentinos, ya sea en los padres o en sus gametos. El flujo génico es el resultado de la movilidad de los genes por factores como migración, polinización, y dispersión. Finalmente, la deriva génica representa cambios aleatorios en la composición genética de una población y tiene mayor efecto en las poblaciones pequeñas porque en ellas se pierde la diversidad genética y aumenta la homocigosidad. Las poblaciones pequeñas, en general, son más susceptibles a extinguirse por la baja variabilidad genética e incremento en homocigosidad (Frankham *et al.*, 2002; Schonewald *et al.*, 2003). En particular, las poblaciones pueden sufrir reducciones aleatorias severas en su tamaño llamadas cuello de botella que aumentan los efectos de la deriva génica.

Muchas veces, la salud genética de las poblaciones depende de las tasas de dispersión que, a su vez, influyen en la probabilidad de endogamia (apareamientos entre individuos emparentados) o exogamia (apareamiento entre individuos lejanos genéticamente). Cuando las cruas resultan en una progenie con bajo desempeño de aptitud (éxito reproductivo) en relación con aquella que

resulta de fecundación cruzada, se presenta el fenómeno de depresión endogámica. La depresión endogámica reduce la aptitud de las poblaciones, porque favorece la expresión de genes deletéreos recesivos al aumentar la frecuencia de homocigotos con respecto a lo que se esperaría si los genes se distribuyeran entre los individuos totalmente al azar y como consecuencia aumentan los riesgos de la extinción (Frankham *et al.*, 2002).

Por otro lado, las poblaciones son susceptibles de sufrir depresión exogámica que es la pérdida de aptitud como resultado de la exogamia. Ésta puede provocar una incompatibilidad genética en las generaciones siguientes (Raybould *et al.*, 2002; González- Astorga *et al.*, 2004; Snäll *et al.*, 2004; Spielman *et al.*, 2004).

El estudio de la genética de la conservación puede ser particularmente útil en hábitats fragmentados donde el flujo génico normal entre poblaciones es alterado por destrucción parcial del hábitat y ésta puede producir una pérdida de la diversidad génica de las poblaciones (Kärkkäinen *et al.* 2004). En ocasiones, la migración puede aumentar en poblaciones fragmentadas y a su vez disminuir los riesgos de extinción. Pero, a veces, esta misma fragmentación genera aislamiento que puede conducir a la extinción por disminuir el flujo genético, aumentando a su vez la endogamia; de esta manera, se genera un patrón de aislamiento por distancia que se manifiesta como una correlación positiva entre la distancia geográfica y la diferenciación genética (Pickett *et al.*, 1997; Schonewald *et al.*, 2003; Snäll *et al.*, 2004).

Las epifitas (plantas que utilizan a otras plantas como soporte) muchas veces están confinadas a espacios fragmentados y aislados de los árboles que las hospedan (forofito). Por lo tanto se encuentran adaptadas a condiciones ambientales muy adversas como la limitación hídrica, lo que sugiere adaptaciones notables que por sí solas ameritan esfuerzos dirigidos a su conservación. Además, las actividades humanas tales como la tala, están favoreciendo aún más la fragmentación de su hábitat (Soltis *et al.*, 1987; Zotz y Andrade, 2002; Benzing, 2004).

Las epifitas son un componente esencial de la diversidad biológica. Más aún, cerca de un 10% de las plantas vasculares pertenece al hábito epifito. Otra importancia de las epifitas es su diversidad de especies, donde las orquídeas ocupan el primer lugar en número de especies seguido de las bromelias. Además, son organismos de interesante estudio para la genética de poblaciones, debido a factores como su hábitat variable y seco. Esto sugiere que estas plantas están

sujetas a grandes presiones de adaptación (Soltis *et al.*, 1987; Zotz y Andrade, 2002; González- Astorga *et al.*, 2004; Pulido-Esparza *et al.*, 2004; Barfuss *et al.*, 2005; Flores - Palacios y García - Franco, 2006).

La familia Bromeliaceae alberga un grupo de especies epifitas vulnerable a las actividades humanas por el hábitat frágil y condiciones adversas en el que se encuentran inmersas. El conocimiento sobre su genética es muy limitado a pesar de que su número es superior a 2,700 especies en todo el mundo. En México, existen 342 especies (Soltis *et al.*, 1987; Benzing 1990; Espejo - Serna *et al.*, 2004; Barfuss *et al.*, 2005).

Las bromelias se distribuyen casi exclusivamente en el continente americano. Además, son el componente más sobresaliente en la vegetación epifita neotropical. Varias bromelias funcionan como reservorios de agua y microhábitat para muchas otras especies (García - Franco, 1986; Beutelspacher, 1999; Ramírez *et al.*, 2004). Por si fuera poco, algunas especies de bromeliaceas tienen importancia económica (Plan de Manejo y Conservación, 2007; Villa, 2007). Particularmente, en México las bromelias son muy codiciadas por la gran belleza estructural y variedad de colores de hojas y brácteas. Por ello, son cultivadas con fines ornamentales, para su comercialización (Mc Vaugh, 1989; Duval, 1990; Pulido- Esparza, *et al.*, 2004; Barfuss *et al.*, 2005)

En algunos sitios estas plantas se explotan con fines religiosos, tal como sucede con el género *Catopsis*. En la población oaxaqueña de Santa Catarina Ixtepeji los pobladores de este municipio extraen las plantas de este género, junto con otras bromelias, de su entorno natural para las festividades de Semana Santa, Día de Muertos y Navidad, entre otras. Estas bromelias son usadas como adornos de distintos tipos o simplemente las comercializan en los mercados (Rees, 1976; Villa, 2007). La sobreexplotación puede producir una reducción en las poblaciones y, por tanto un cuello de botella, donde la variación genética se reduce drásticamente en periodos de tiempo cortos con los consecuentes problemas genéticos como pérdida de diversidad o aumento de la endogamia.

Los estudios sobre genética poblacional en bromelias son escasos y no existen para el género *Catopsis*. Algunos estudios como los de Soltis *et al.* (1987), Murawski y Hamrick (1990), Izquierdo y Piñero (2000) Sarthou, *et al.* (2001) y González- Astorga *et al.* (2004), se han realizado para otros grupos de bromelias. Se desconoce cuáles son los niveles de variación genética para especies sometidas a explotación comercial (Quamaruz- Zaman *et al.*, 1998).

La bromelia *Catopsis berteroniana* es un ejemplo importante de especies sometidas a explotación comercial. Esta especie se extrae de su hábitat natural en algunos lugares para su venta en ciertas temporadas del año (662.750 individuos/Ha). Para algunas comunidades oaxaqueñas esta bromelia tiene un gran valor cultural pues es muy utilizada en los nacimientos de Navidad y es una de las más explotadas (Villa, 2007). En Santa Catarina Ixtepeji existe una población principal para la explotación de esta especie (Reynoso) y otra población contigua que no es explotada por el reducido número de individuos (El Cerezal). Es por esto que es importante establecer la diferencia de afectación genética en estas poblaciones con distinto grado de perturbación.

Este estudio investigó la estructura genética, un posible cuello de botella, así como la distribución espacial de *C. berteroniana* utilizando electroforesis de proteínas en dos poblaciones de Santa Catarina Ixtepeji, Oaxaca. Debido a la importancia biológica, económica y cultural que tiene *Catopsis berteroniana* es imprescindible ampliar su conocimiento en materia de genética de poblaciones. En particular, la extracción a la que está sujeta sugiere que esta especie puede tener los problemas típicos de poblaciones pequeñas mencionados anteriormente (página 9). Por la aparente fragmentación entre ambas poblaciones de *C. berteroniana*, el flujo génico entre éstas probablemente esté restringido. La segregación de los individuos de *C. berteroniana* en los árboles, aunado a la deforestación sugiere que esta especie puede tener distribución fragmentada que se manifiesta en una estructura genética asociada con su distribución espacial. La extracción a la que está sujeta sugiere pérdida de diversidad genética y posiblemente un cuello de botella en el pasado.

# Revisión de literatura

## Epifitas

Las epifitas son plantas que generalmente viven en la corteza de los árboles, que únicamente utilizan como soporte. Están representadas por más de 83 familias con aproximadamente 14,000 especies. Son mucho más diversas en el neotrópico que en Asia o en África tropical (Benzing, 1990; Beutelspacher, 1999).

Las epifitas crecen aisladas en los ambientes más diversos, las sequías, fuertes vientos, alelopatía, lucha constante contra la gravedad, escasez de nutrientes, irradiación intensa, poca uniformidad espacial del sustrato es algo que estas plantas deben enfrentar; por si fuera poco, en general son de crecimiento lento. Por eso, las epifitas adquieren tan diversas adaptaciones fisiológicas, morfológicas y ecológicas. Sin duda el ambiente donde se desarrollan las epifitas constituye un reto considerable para sobrevivir (Soltis *et al.*, 1987; Beutelspacher, 1999).

Aún cuando algunas epifitas crecen en lugares con altos niveles de precipitación, el agua no está a su disposición por lo que tienen adaptaciones del tipo xerófilo. Algunas epifitas han desarrollado mecanismos como la formación de pseudobulbos en las orquídeas y la forma de roseta en las bromelias lo cual permite tener reservas de agua. Las epifitas son exitosas colonizadoras y también juegan un papel ecológico importante para otras plantas y para otros organismos porque acumulan humus, proyectan su sombra a plantas más pequeñas, facilitan el asentamiento de otras plantas, y ubicación para otros organismos (Zotz y Andrade, 2002).

En los casos extremos del epifitismo conforme aumenta la aridez, la tasa de crecimiento, la maduración y el número de flores disminuyen; por ello, es probable que las plantas produzcan grandes cantidades de semilla producto de la autogamia y la cleistogamia para asegurar la sobrevivencia de la especie. La autogamia es común en las epifitas, aunque la polinización por animales (murciélagos, aves, insectos) en Sudamérica y Centroamérica es común. Dentro de la familia Bromeliaceae, se encuentran algunos de los géneros con reproducción alógama como en *Tillandsia* y *Catopsis* (Soltis *et al.*, 1987; Benzing, 2004).

## Familia Bromeliaceae

La familia Bromeliaceae se encuentra dividida en tres subfamilias las cuales son: Pitcarnioideae, Tillandsioideae y Bromelioideae. Las bromelias contemplan hierbas, comúnmente de duración indefinida. Su aspecto general es áspero y voluminoso. La mayoría de las bromelias son de hábitos epifitos. Las bromelias presentan raíces, pero en especies epifitas su uso se confiere al soporte en el huésped. Las hojas de las bromelias se encuentran acomodadas en forma espiral, con una roseta basal pero caulina (en ciertas especies), las hojas son frecuentemente duras y xeromórficas, son hojas simples, enteras o espinosa - aserradas; al menos en las hojas, se presentan escamas peltadas que influyen en la absorción del agua (Smith y Downs, 1977; Mc Vaugh, 1989).

Las bromelias en América se encuentran distribuidas desde Estados Unidos hasta Argentina y Chile y dan características fisonómicas a muchas comunidades en el neotrópico (García- Franco, 1986; Zotz y Andrade 2002). Casi todas son de clima tropical o subtropical. Oaxaca es el estado más rico en especies de México, ya que posee 135, especialmente en los bosques de *Quercus*. Además Oaxaca posee el nivel más alto de endemismo con 30 especies (Gouda, 1987; Espejo-Serna *et al.*, 2004). Su importancia ecológica es muy alta al funcionar como microecosistemas para fauna diversa (Beutelspacher, 1999)

La familia Bromeliaceae posee un sistema reproductivo variable, ya que existen tanto especies monoicas como dioicas, con estructuras florales morfológicamente perfectas, inclusive se van a los extremos como es el caso de *T. recurvata* en donde las flores son cleistógamas y la endogamia es común hasta las de reproducción cruzada obligada como la especie dioica *Catopsis nutans* en Centroamérica (Soltis *et al.*, 1987; Benzing, 1990).

## Género *Catopsis*

El género *Catopsis* pertenece a la subfamilia Tillandsioideae que cuenta con 224 especies distribuidas en México. El género incluye especies de tamaño pequeño o mediano. Estas son hierbas epifitas acaules. Pueden ser monoicas o dioicas. Presentan hojas enteras arrosetadas y poco lepidotas, son verdes con forma de una vasija angosta, usualmente con una cubierta de apariencia harinosa. Es muy común que *Catopsis* tenga como inflorescencia un panículo el cual excede la longitud de las hojas, y éste es evidentemente escaposo, erecto o nutante. La inflorescencia puede ser simple o 1 - 2 pinado compuesta. Las flores



(probablemente polinizadas por varios insectos) son polísticas, pequeñas o diminutas, comúnmente sésiles o raramente brevipediceladas, perfectas o funcionalmente unisexuales en distintas plantas. Los sépalos son libres, glabros, usualmente muy asimétricos, por lo general son obtusos en el ápice, pero pueden ser también agudos o enmargados. Los pétalos están libres, desnudos e inconspicuos. Los estambres son inclusos con filamentos libres. Las anteras son de forma ovada o elíptica. El ovario es súpero, muy poco ovoide o elipsoide. El estilo es más corto que el ovario o similar. Presenta de unos pocos a muchos óvulos alargados caudalmente. El fruto es una cápsula septicial de forma ovoide a elíptica, el ápice es agudo o acuminado, a veces es rostrado. Las semillas tienen un apéndice plumoso apical doblado en la madurez, lo cual es muy característico del género y puede incrementar la dispersión (Smith y Downs, 1977; Gouda, 1987; Mc Vaugh, 1989; Davidse *et al.*, 1994; Hietz y Hietz - Seifert, 1994; Schonewald *et al.*, 2003; Espejo-Serna *et al.*, 2004).

El género *Catopsis* tiene cerca de 25 especies que se distribuyen en hábitats tropicales y templados de casi toda América. Más de la mitad de las especies se encuentran en México (14 especies), la mayor parte en la costa Atlántica (Mc Vaugh, 1989; Barfuss *et al.*, 2005).

### ***Catopsis berteroniana* (Schult. & Schult.f.) Mez**

Esta especie es una planta de 40 - 90 cm de alto, con inflorescencia. Posee varias hojas en forma de roseta y son blanquecinas por la presencia de ceras, especialmente en la base y su color es verde brillante. El escapo es erecto y glabro. La inflorescencia es bipinada (raro que sea simple) y con más de 30 cm de largo. La espiga es suberecta con varias flores. Las brácteas son coriáceas. Las flores son sésiles y perfectas, en México se presentan algunas dimórficas. Los sépalos son muy asimétricos y coriáceos, su tamaño es similar o más largo que los pétalos. Los pétalos son blancos de forma ovado-elíptica. Los estambres son inclusos. Se encuentra de 0-1200 m de altitud en bosques, potreros y selvas al sur de Florida, Las Antillas, sur de México hasta Venezuela y el este de Brasil. En México se localiza en Campeche, Chiapas, Guerrero, Oaxaca (El Barrio de la Soledad, Guevea de Humboldt, San Juan Bautista Cuicatlán, San Pedro Pochutla, Santa María Chimalapa, Santiago Lachuirr, Totontepec Villa de Morelos), Quintana Roo y Veracruz (Smith y Downs, 1977; Davidse *et al.*, 1994; Espejo-Serna *et al.*, 2004). Esta especie se encuentra en la Norma Oficial Mexicana 059, sujeta a protección especial y no es endémica (NOM - 059 - ECOL - 2001).

## Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares son biomoléculas como proteínas (cadenas de aminoácidos) o ADN (principal componente del material genético de la mayoría de los organismos) que se pueden relacionar con un rasgo genético. Dentro de estos últimos, los más sobresalientes son los microsatélites, SNPs, RFLPs y RAPs. Los microsatélites, muy utilizados actualmente. Estos son secuencias cortas de ADN repetidas y proporcionan altos niveles de polimorfismo debido a su alta tasa de mutación. Los microsatélites se usan en la determinación de parentesco y son codominantes (se distinguen individuos homocigotos y heterocigotos); en plantas pueden ser utilizados para estimar la dispersión de las semillas y del polen. Ésta técnica no toma mucho en cuenta que existen altas tasas de mutación, muchas de las cuales son reversibles. De esta manera el compartir microsatélites comunes entre individuos no implica necesariamente que sean idénticos por descendencia sino por homoplasia (adquirido de manera independiente) (Raybould *et al.*, 2002).

El polimorfismo en un nucleótido (SNPs por sus siglas en inglés) consiste en una secuencia de ADN con variación en un solo nucleótido. Para dos individuos o más la diferencia en los nucleótidos se toman como alelos diferentes. Es común que se presenten únicamente dos nucleótidos (dos alelos distintos) en una muestra. Actualmente son utilizados sobre todo en medicina humana para comparar la incidencia de enfermedades sobre la base de estas mínimas diferencias en los nucleótidos (Wikipedia, 2007).

En el polimorfismo de longitud de fragmentos cortados con enzimas de restricción (RFLPs por sus siglas en inglés) se obtiene el polimorfismo a partir de fragmentos de restricción con longitud definida, puede resultar por inserciones o cortes en fragmentos de ADN, se usa en genética de poblaciones si existe la suficiente variación. Es codominante, sin embargo, es una técnica muy laboriosa y cara debido al material y equipo requerido. El polimorfismo de ADN amplificado al azar (RAPDs) utiliza amplificaciones de varias regiones del genoma tomadas al azar, puede ser utilizada en análisis filogenéticos, es dominante (no hay diferencia entre individuos homocigotos y heterocigotos) y no es reproducible por lo que últimamente ha perdido popularidad. Las técnicas descritas anteriormente, utilizan compuestos altamente dañinos como los geles de poliacrilamida (Murphy *et al.*, 1996; Karp *et al.* 2001).

## **Electroforesis de proteínas**

La electroforesis de proteínas es una técnica en la cual las proteínas migran por influencia de una corriente eléctrica a lo largo de una red molecular. El peso, la carga y la configuración de las proteínas determinan su migración en un gel sometido a un campo eléctrico (Cheliak y Pitel, 1984; Trujillo y Del Castillo, 2003).

La electroforesis se aplica a varios tipos de matrices, entre los cuales se encuentran los geles de almidón, poliacrilamida, acetato de celulosa y agarosa. A excepción del gel de poliacrilamida ninguno es tóxico y su manejo es usualmente fácil. El gel de almidón es el único con el que se puede obtener más de una rebanada por gel (Murphy *et al.*, 1996).

La electroforesis de proteínas es una técnica válida para estimar las diferencias entre las poblaciones naturales en función de la composición de aminoácidos que poseen. Las formas bioquímicas múltiples de las enzimas con funciones similares en el mismo individuo (isoenzimas) han sido ampliamente utilizadas. Las isoenzimas pueden presentar varias formas alélicas (aloenzimas) que pueden dar idea de las relaciones dentro y entre las poblaciones. El diferencial de movilidad en las aloenzimas a través de un campo eléctrico resulta en un patrón de bandeo que se conoce como zimograma. Aunque, con esta técnica sólo se detectan diferencias en la composición de aminoácidos que impliquen cambio de carga. A pesar de los avances en técnicas de ADN, la electroforesis de proteínas permite responder a distintas preguntas sobre genética (Izquierdo y Piñero, 1998; Trujillo y Del Castillo, 2003).

## **Enzimas**

Las enzimas son proteínas que catalizan reacciones químicas bajo ciertas condiciones de temperatura. La Comisión de Enzimas (EC, por sus siglas en inglés) hace una clasificación de las enzimas de acuerdo con su actividad, divide las enzimas en seis grandes grupos. Las oxidoreductasas (EC 1) catalizan reacciones de transferencia de hidrógeno o electrones de un sustrato a otro. Las transferasas (EC 2) catalizan la transferencia de un grupo químico (distinto del hidrógeno) de un sustrato a otro. Las hidrolasas (EC 3) catalizan la hidrólisis de varios enlaces. Las liasas (EC 4) rompen enlaces por medios diferentes a la hidrólisis o la oxidación. Las isomerasas (EC 5) catalizan la interconversión de isómeros. Finalmente, las ligasas (EC 6) catalizan la unión de moléculas con la hidrólisis de ATP o moléculas similares. Así como esta clasificación gruesa existe

una más detallada para las particularidades de cada enzima (Enzyme Nomenclature, 2006).

Las enzimas se presentan 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. También, las enzimas poseen distinta conformación estructural, de acuerdo con el número de subunidades que presenta (estructura cuaternaria) i.e. monómero con una subunidad, dímero con dos subunidades y así sucesivamente. De lo anterior depende el patrón de bandeo en los zimogramas. Así en el monómero se esperan dos bandas en los organismos heterocigotos, en un dímero tres bandas, etcétera; dependiendo de las combinaciones de las subunidades (Gottlieb, 1981).

## **Diversidad genética**

La diversidad genética es la variación genética en una población, o entre grupos de especies y puede expresarse en varias formas. Así, puede determinarse el porcentaje de polimorfismo ( $P$ ) de una población calculando el número de loci polimórficos dentro del total de los loci muestreados. El número de alelos por locus ( $A$ ), así como, el número de alelos por locus polimórfico ( $A_p$ ). La riqueza alélica ( $R_t$ ) equivalente al número de alelos por locus utilizando técnicas de rarefacción. Todos los anteriores, estiman la diversidad genética al igual que la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) donde  $H_o$  = número de individuos heterocigotos entre el número total de individuos muestreados.

## **Genética de poblaciones en Bromeliaceae**

Los estudios sobre genética en bromelias son escasos. Murawski y Hamrick (1990) realizaron un estudio de *Aechmea magdalenae* con métodos electroforéticos, en la isla de Barro Colorado, Panamá. Esta especie es clonal, terrestre y de distribución fragmentada en el área de estudio. Los autores encontraron que la media del porcentaje de polimorfismo en las poblaciones estudiadas fue bajo ( $P = 24.0 \%$ ) comparado con otras plantas monocotiledóneas. Se observaron colibríes en las flores hermafroditas que probablemente se encarguen de la dispersión de polen. Por otro lado, algunos mamíferos tal vez se encargan de dispersar los frutos. Sin embargo, la floración es rara y se desconoce

su sistema de reproducción. Es posible que la baja variación genética en las poblaciones se deba al crecimiento clonal de la planta, así como a la baja dispersión del polen y de la semilla.

Izquierdo y Piñero (2000) estudiaron una población de *Aechmea tuitensis* con métodos electroforéticos. *A. tuitensis* es endémica de Jalisco, México, de hábito saxícola. Los autores consideran que la media del porcentaje de polimorfismo ( $P = 78.0 \%$ ), el número de alelos por locus ( $A = 2.2$ ), así como, el número de alelos por locus polimórfico ( $A_p = 2.4$ ) proporcionan altos niveles de variación genética al compararlo con otras plantas endémicas y moderada comparado con otras monocotiledóneas. Aunque su sistema de cruzamiento no se conoce, la reproducción clonal es común. La población estudiada es un mosaico de clones, es posible que los diferentes genotipos sean un reflejo de su origen o causa de varias mutaciones en la especie.

Sarthou, *et al.* (2001) analizaron poblaciones de *Pitcairnia geyskesii* por medios electroforéticos en Surinam y de Guayana Francesa de donde es endémica. La bromelia es saxícola y presenta una distribución muy fragmentada. Estos autores encontraron una variabilidad genética muy alta comparado con otras bromelias ( $P = 63.0 \%$ ,  $A_p = 2.2$ ). Al parecer las flores son polinizadas por colibríes y algunas de las poblaciones no presentaron autogamia. Es muy probable que la distribución sea esencialmente de origen clonal y que este origen clonal haya sido, desde sus inicios, genéticamente diverso, aunque no se descarta el reclutamiento de semilla.

Entre los estudios relacionados con la genética de poblaciones en la subfamilia Tillandsioideae, por métodos de electroforesis de proteínas, se puede mencionar los de Soltis *et al.* (1987) realizaron un estudio comparativo en dos especies principalmente epifitas, *Tillandsia ionantha* y *T. recurvata*, en México. *T. ionantha* es una especie, al parecer, de reproducción cruzada. Por su parte, *T. recurvata* es una epifita con flores cleistógamas, es probable que sea autógena. *T. ionantha* fue más variable ( $P = 16.7 \%$ ) que *T. recurvata* ( $P = 3.8 \%$ ). Posiblemente esta diferencia en la estructura genética entre las poblaciones se deba a sus hábitos reproductivos.

González-Astorga *et al.* (2004) analizaron en *Tillandsia achyrostachys*, var. *achyrostachys*, en Morelos, México la variabilidad genética por métodos electroforéticos. Esta especie, es endémica de la selva baja caducifolia en México, muestra una marcada preferencia por *Bursera copallifera*, pero las poblaciones de este hospedero han disminuido y por consiguiente, el hábitat está

fragmentado. Se encontró variabilidad genética similar a otras bromelias, otras plantas con el mismo grado de distribución geográfica, así como plantas con sistema de reproducción por animales ( $P = 59.0\%$ ,  $A = 1.9$ ). Aunque el sistema de cruzamiento es desconocido, las flores sugieren polinización por colibríes, lo que a su vez sugiere exogamia. Además, se presenta crecimiento clonal que probablemente ayude a mantener la variabilidad genética encontrada.

## Teorema de Hardy - Weinberg

El teorema de Hardy-Weinberg establece una relación entre las frecuencias alélicas y genotípicas de una población dada bajo los supuestos de ausencia de selección natural, mutación, flujo génico, deriva génica en poblaciones diploides, infinitas y panmícticas. Para el caso más simple de un locus y dos alelos ( $A_1$ ,  $A_2$ ), dicha relación se expresa como  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ ; donde  $p$  y  $q$  ( $p + q = 1$ ) son las frecuencias alélicas ( $A_1$  y  $A_2$ , respectivamente) y  $p^2$ ,  $q^2$  y  $2pq$  son las frecuencias genotípicas en equilibrio de  $A_1A_1$ ,  $A_2A_2$  y  $A_1A_2$ , respectivamente,  $2pq$  representa la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) (Goudet, 2001; Frankham *et al.*, 2002).

## Endogamia

La endogamia es resultado de apareamientos entre individuos emparentados. Matemáticamente se define como la probabilidad de que dos alelos en un locus sean idénticos por descendencia y se cuantifica con el coeficiente de endogamia ( $F$ ). Éste último varía de 0 (no hay endogamia) a 1 (endogamia perfecta) y se calcula mediante  $F = 1 - (H_i / H_o)$  donde  $H_i$  representa el grado de heterocigosidad en una población con endogamia y  $H_o$  representa el grado de heterocigosidad que se presenta con cruzamientos al azar en una población infinita. La endogamia puede tener mayor efecto en poblaciones pequeñas porque aumentan las probabilidades de cruza entre individuos emparentados, esto a su vez disminuye la heterocigosidad y aumenta la homocigosidad. Al aumentar ésta última, la probabilidad de fijación de alelos deletereos se incrementa, consecuentemente las poblaciones se encuentran más expuestas a la extinción por las razones explicadas en la página 9 (Frankham *et al.*, 2002)

## Estadística F de Wright

La endogamia total en poblaciones subdivididas (*Fit*) tiene un componente que se atribuye a la endogamia dentro de subpoblaciones (*Fis*) y el otro debido a la diferenciación entre las subpoblaciones (*Fst*). De tal modo que  $Fit = Fis + Fst - (Fis)(Fst)$ . Así, en poblaciones subdivididas se presenta disminución en la heterocigosidad debido a que la endogamia probablemente producida por barreras geográficas que impiden el flujo génico de las subpoblaciones, esto se conoce como efecto Wahlund; la reducción de esta heterocigosidad puede medirse con *Fst* (Frankham *et al.*, 2002).

## Cuello de Botella

El cuello de botella representa pérdida aleatoria de variación genética en periodos de tiempo cortos debido a la reducción drástica en el tamaño poblacional. Al reducirse la variación genética, las poblaciones se encuentran más expuestas a la extinción por problemas como la endogamia (Quamaruz-Zaman *et al.*, 1998; Frankham *et al.*, 2002;).

El cuello de botella es difícil detectarse, ya que es necesario el uso de datos históricos sobre demografía de las poblaciones. Sin embargo, Cornuet y Luikart (1996) han propuesto un método para evaluar el cuello de botella en poblaciones que previamente lo han experimentado y que se encuentran bajo un equilibrio entre mutación y deriva génica.

Bajo estas condiciones de equilibrio, una población que experimenta un cuello de botella presenta una disminución en el número de alelos y en la heterocigosidad, pero esta última disminuye más lentamente que la primera. De tal manera que la deficiencia de alelos en relación con la heterocigosidad (exceso de heterocigotos, Cornuet y Luikart, 1996) puede evidenciar un cuello de botella. Para detectar lo anterior, el método utiliza una prueba de signo, una prueba de diferencias estandarizadas y una prueba Wilcoxon (Cornuet y Luikart, 1996). Los mismos autores recomiendan, para estudios de aloenzimas, el modelo de alelos infinito (MAI) donde se supone que cada mutación produce un alelo nuevo y las probabilidades de que esta mutación se de en reversa son prácticamente nulas.

## **Autocorrelación espacial global**

Ésta es una técnica multivariada desarrollada por Smouse y Peakall (1999) que emplea loci y alelos de forma combinada. Se utilizan matrices de distancia genética y distancia geográfica para generar un coeficiente de autocorrelación ( $r$ ) que provee una medida de la relación entre pares de individuos y su separación geográfica agrupada en categorías de distancia. Los resultados se observan en un correlograma y como pruebas estadísticas se utilizan métodos de permutaciones y bootstrapping para probar la hipótesis nula de que  $r = 0$ ; es decir, ausencia de estructura genética y por lo tanto distribución al azar (Peakall y Smouse, 2006).

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Determinar la variación genética en dos poblaciones de *Catopsis berteroniana* (Bromeliaceae); una población sin aparente perturbación y otra sujeta a explotación, en la localidad de Santa Catarina Ixtepeji, Oaxaca, México utilizando el método de electroforesis de proteínas en almidón.

### **Objetivos particulares**

- a) Estimar la diversidad genética y la estructura genética de *C. berteroniana* en dos poblaciones. Una sin explotación (El Cerezal) y otra sujeta a explotación (Reynoso).
- b) Indagar si existe evidencia de un cuello de botella en las poblaciones
- c) Conocer la relación entre la estructura genética poblacional de *C. berteroniana* y su distribución espacial.



# **Materiales y métodos**

## **Especie de estudio**

La especie *Catopsis berteroniana* (Schult. & Schult. f.) Mez. Pertenece a la familia Bromeliaceae y tiene hábitos epifitos. Se distribuye ampliamente en el continente americano desde el sureste de Estados Unidos, México, Antillas, Centroamérica, Venezuela y el este de Brasil. Se ha observado como una especie clonal (de uno a dos hijuelos en la parte más basal de la planta, observación personal).

Probablemente también presente reproducción cruzada por la estructura floral (observación personal). El dimorfismo sexual es claro en la inflorescencia escamosa. Las plantas femeninas presentan, generalmente, menor número de flores así como un mayor tamaño en relación con las masculinas; además los órganos masculinos parecen vestigiales. Las plantas masculinas presentan, normalmente, mayor número de flores de menor tamaño respecto a las femeninas y los órganos femeninos son vestigiales. En las poblaciones de estudio las plantas adultas varían en tamaño de 25-60 cm de largo. La floración se presentó durante los meses de noviembre 2005 a enero 2006, se registró liberación de semilla durante marzo del mismo año así como producción de fruto de agosto a diciembre.

## **Área de estudio**

El trabajo se realizó en el municipio de Santa Catarina Ixtepeji, distrito de Ixtlán de Juárez. Este municipio se localiza en la porción nordeste del estado de Oaxaca, México (Instituto nacional para el federalismo y el desarrollo municipal, 2002).

Presenta una precipitación anual de 600 a 800 mm con lluvias en verano. En épocas muy lluviosas la precipitación alcanza 1200 mm (Vidal-Zepeda, 1990). La temperatura media anual es 18 °C (Servicio Meteorológico Nacional, 1971-2000).

El tipo de vegetación se compone por bosque de pino, bosque de encino, bosque de pino - encino, selva baja caducifolia, pastizal inducido, y agricultura de temporal (INEGI, modificado por CONABIO 1999). El Clima es C (w1) templado subhúmedo (CONABIO, 1998).

El tipo de suelo es leptosol y regosol

(Subsecretaría de Recursos Naturales, 1998). Los ríos Quilotepec, Grande y

Cebollal atraviesan este municipio (Maderey-R. y Torres-Ruata 1990). Santa

Catarina Ixtepeji colinda al norte con San Miguel del Río, Santa María Jaltianguis

e Ixtlán de Juárez; al sur con Tlalixtac de Cabrera; al este con Santa Catarina

Lachatao y San Juan Chicomezuchil; al oeste con Nuevo Zoquiapan y San Pablo Etla (INEGI, 2005).

## Muestreo

Se ubicaron dos zonas de muestreo, El Cerezal y Reynoso (Figura 1). El muestreo en El Cerezal ( $17^{\circ} 14' N$  y  $96^{\circ} 34' O$ , altitud 2200 m) abarcó una superficie aproximada de  $0.556 \text{ Km}^2$  con vegetación de encino y encino-pino. La población de Reynoso ( $17^{\circ} 15' N$  y  $96^{\circ} 32' O$ , altitud 2100 m) abarcó una superficie aproximada de  $0.245 \text{ Km}^2$ , con vegetación de encinar. Las especies vegetales observadas se muestran en la Tabla 1.

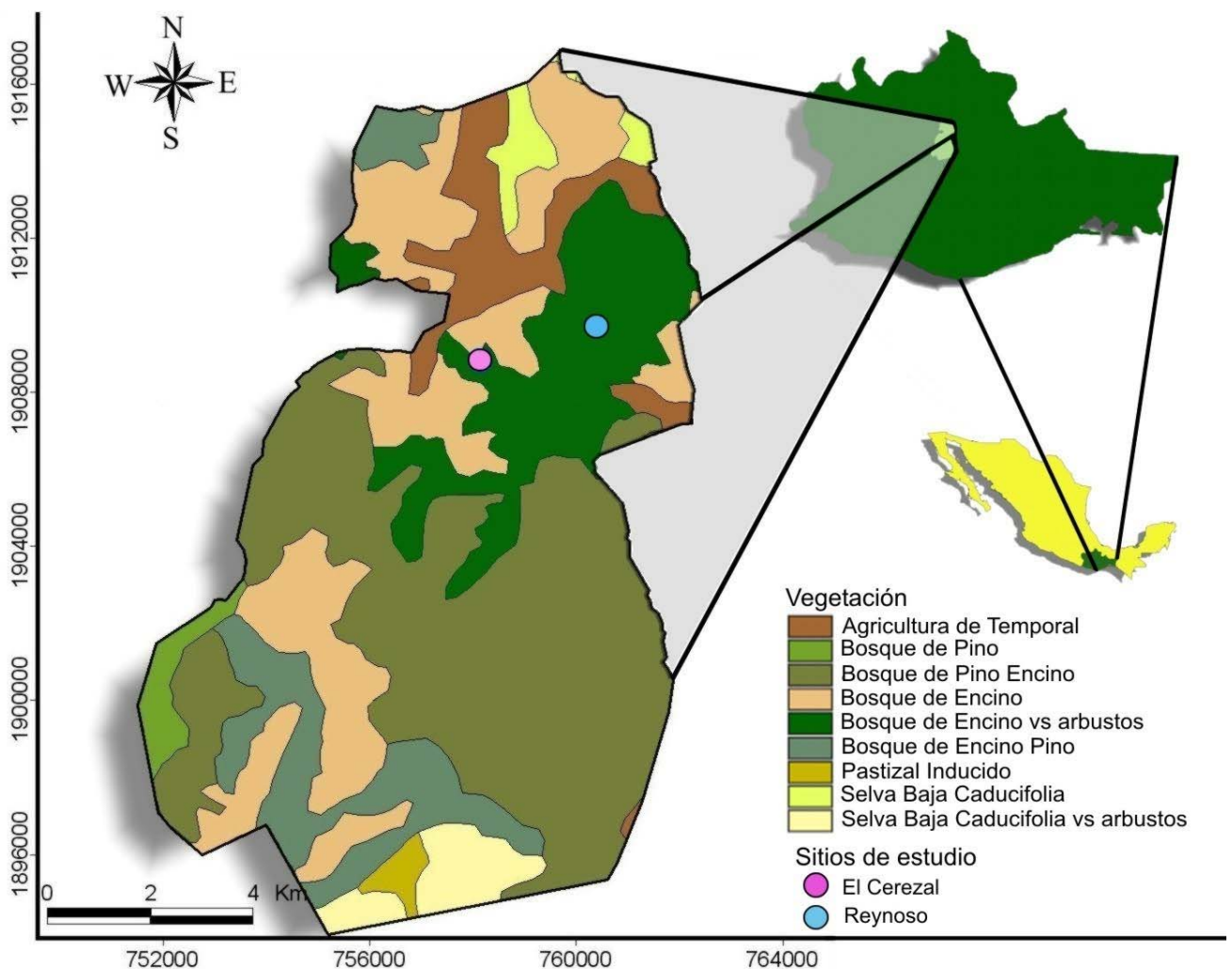


Figura 1. Mapa de Santa Catarina Ixtepeji, Oaxaca. Las dos localidades de colecta para *Catopsis berteroniana*: "El Cerezal" y "Reynoso".

Tabla 1. Especies vegetales observadas en las poblaciones de estudio en Santa Catarina Ixtepeji, Ixtlán, Oaxaca, México. “ \* ”=presencia y “ - ”=ausencia.

Espece vegetal	Cerezal	Reynoso
<b>Terrestres</b>		
<i>Agave</i> aff. <i>marmorata</i> Roezl	-	*
<i>Arctostaphylos pungens</i> Kunth	*	*
<i>Dodonaea viscosa</i> Jacq.	-	*
<i>Ferocactus macrodiscus</i> (Mart.) Britton & Rose	-	*
<i>Opuntia lasiacantha</i> Pfeitt.	*	-
<i>Opuntia</i> spp.	-	*
<i>Pinus pseudostrobus</i> var. <i>apulcensis</i> (Lindl.) Shaw	*	-
<i>P. teocote</i> Schltld. & Cham.	*	-
<i>Quercus</i> spp.	*	*
<i>Vachellia (Acacia) pennatula</i> (Schuldtl. & Cham.) Seigler & Ebinger	-	*
<b>Epifitas</b>		
<i>Catopsis berteroniana</i> (Schult. & Schult. f.) Mez	*	*
<i>T. carlos- hankii</i> Matuda	*	-
<i>Tillandsia prodigiosa</i> (Lem.) Baker	*	-
<i>T. recurvata</i> (L.) L.	*	*
<i>Tillandsia usneoides</i> (L.) L.	-	*
<b>Parásita</b>		
Loranthaceae sp.	*	*

La distancia entre una población y otra es de 3 Km, aproximadamente. Se realizaron colectas de hojas de individuos separados por un mínimo de 0.007 Km entre sí y un máximo de 0.560 Km de distancia entre las muestras en cada población. Se colectaron muestras de 71 individuos en El Cerezal y 63 en Reynoso. Los individuos muestreado fueron ubicados con un geoposicionador (GPS) 12XL 12 channel Garmin (Figuras 2 y 3).

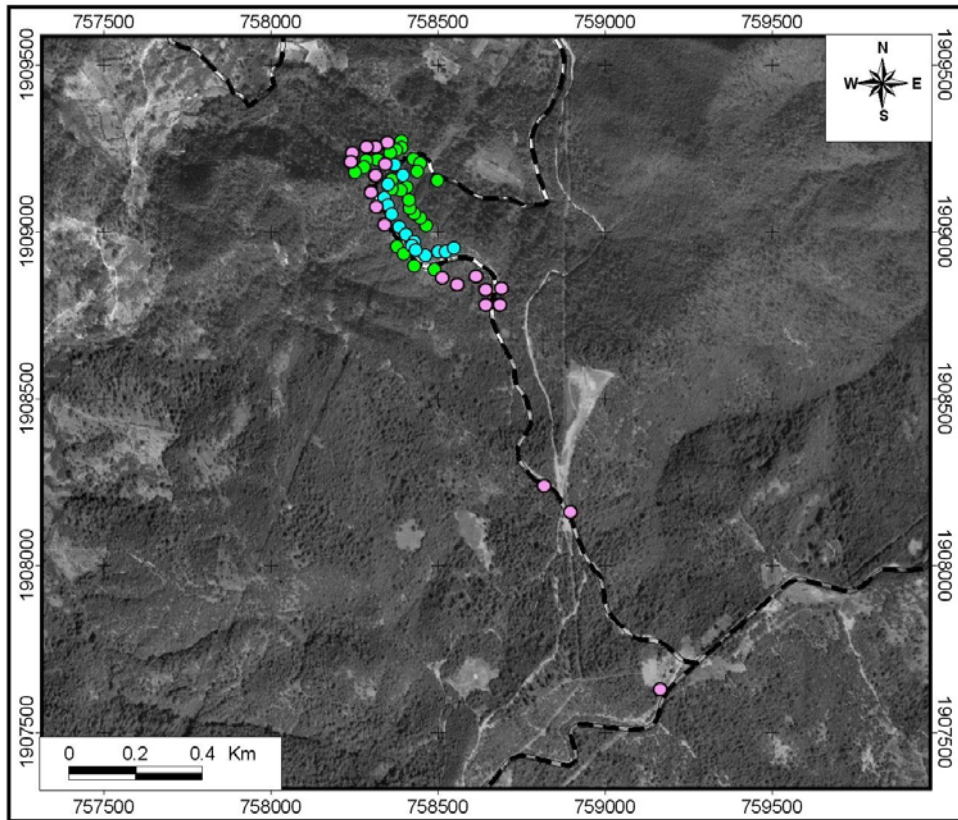


Figura 2. Mapa de “El Cerezal”, Santa Catarina Ixtepeji, Oaxaca. Puntos de colecta para *Catopsis berteroniana*. En azul, colecta de marzo; en verde, colecta de octubre; en lila, colecta de diciembre, 2006.

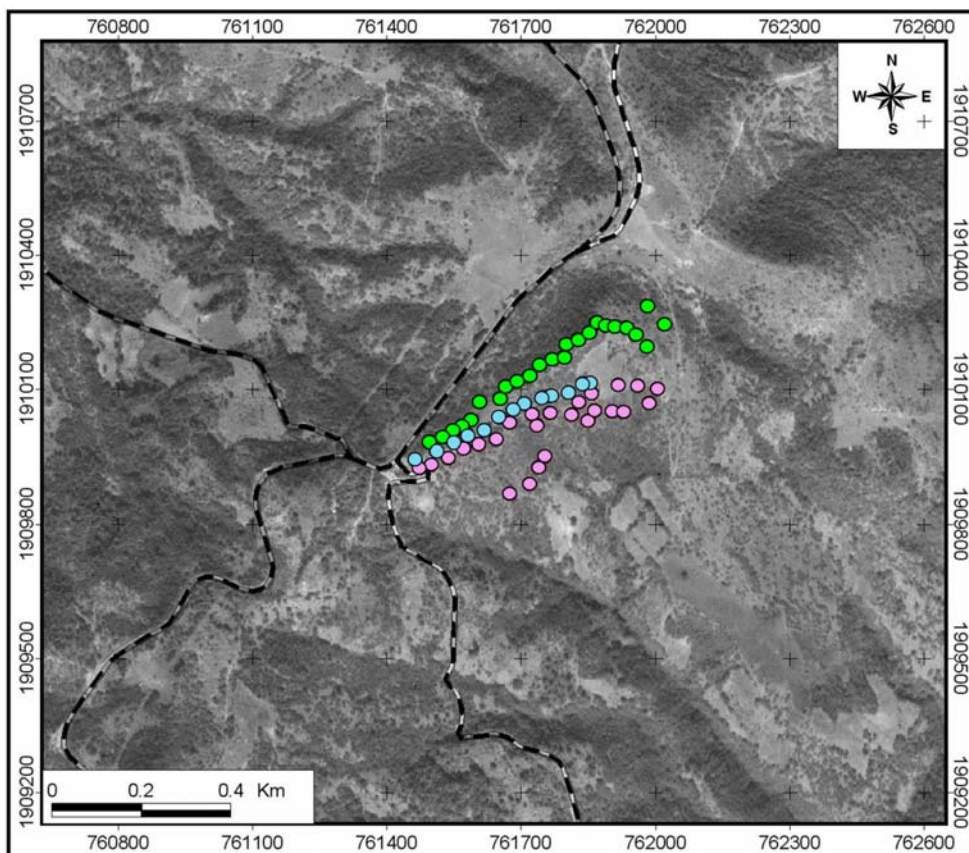


Figura 3. Mapa de “Reynoso”, Santa Catarina Ixtepeji, Oaxaca. Puntos de colecta para *Catopsis berteroniana*. En azul, colecta de marzo; en verde, colecta de octubre; en lila, colecta de diciembre, 2006.

## Electroforesis de proteínas

Las muestras colectadas se mantuvieron refrigeradas a 4 °C hasta la extracción de proteínas. Se utilizó N<sub>2</sub> líquido y la solución amortiguadora de Soltis *et al.* (1983) para extraer las proteínas. Las extracciones se congelaron a - 60 °C. Para el análisis electroforético se utilizaron los protocolos de Shaw y Prasad (1970), Conkle *et al.* (1982), Soltis *et al.* (1983), Cheliak y Pitel (1984), Wendel y Weeden (1989), Kress (1990), Murphy *et al.* (1996) y González (2004). Se probaron tres sistemas de corrimiento: citrato de morfolina (pH 7.5, Conkle *et al.*, 1982), histidina-citrato (pH 5.7, Cheliak y Pitel, 1984), y tris citrato-borato de litio (pH 8.3, Conkle *et al.*, 1982) y en geles horizontales de almidón (12.6 %). El tiempo de corrimiento fue de 3 a 5 horas a 50 mA. Se probaron 17 enzimas (Tabla 2).

Tabla 2. Enzimas probadas para el estudio de electroforesis de proteínas en *Catopsis berteroniana* en las poblaciones de estudio (El Cerezal y Reynoso), Santa Catarina Ixtepeji, Ixtlán, Oaxaca, México. EC= Comisión de Enzimas

No.	Nombre de la enzima recomendado por EC	EC*	Abreviatura
1	Alcohol deshidrogenasa	1.1.1.1	ADH
2	Aspartato transaminasa	2.6.1.1	AAT
3	Carboxilesterasa	3.1.1.1	EST
4	Dihidrolipoil deshidrogenasa	1.8.1.4	DIA
5	Fosfatasa ácida	3.1.3.2	ACP
6	Fosfatasa alcalina	3.1.3.1	ALP
7	6-Fosfogluconato-deshidrogenasa	1.1.1.44	PGDH
8	Fosfoglucomutasa	5.4.2.2	PGM
9	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	1.2.1.12	G3PDH <sub>NAD</sub>
10	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa	1.2.1.9	G3PDH <sub>NADP</sub>
11	Glucosa- 6- fosfato isomerasa	5.3.1.9	GPI
12	Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa	1.1.1.49	G6PDH
13	Glutamato deshidrogenasa	1.4.1.2	GDH
14	Isocitrato deshidrogenasa	1.1.1.42	IDH
15	Leucil aminopeptidasa	3.4.11.1	LAP
16	Malato deshidrogenasa	1.1.1.37	MDH
17	Peroxidasa	1.11.1.7	PER

La interpretación genética de los zimogramas se realizó con ayuda de los programas Corel Photo-Paint versión 11.633 para Windows y Kodak 1D image analysis 3.6. Los detalles de las soluciones para el teñido de enzimas estandarizadas se encuentran en el Anexo I. Para varios loci presentes se numeraron en orden según el decremento en movilidad, igualmente para los alelos.

## **Análisis genéticos**

Los datos de genotipos en los individuos se analizaron con el programa FSTAT versión 2.9.3 (Goudet, 2001). Se realizó una prueba de desequilibrio genotípico, la cual permite evaluar la significancia de asociación entre pares de loci por remuestreo al azar y así determinar si existe evidencia de asociación entre loci. En caso de que existan asociaciones será necesario eliminar aquellos loci que resulten redundantes en los análisis genéticos. La probabilidad de rechazar la hipótesis nula (no existe asociación entre los pares de loci) se ajustó con el método de Bonferroni al 0.05 usando una probabilidad de 0.001389 en 720 permutaciones para 36 pares de loci. Se analizó el porcentaje de polimorfismo ( $P$ ) como número de loci polimórficos entre el número total de loci, el número de alelos por locus ( $A$ ), el número de alelos por locus polimórfico ( $A_p$ ), la riqueza alélica ( $R_t$ ) que es equivalente al número de alelos por locus por métodos de rarefacción, la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) que equivale al número de individuos heterocigotos entre el número total de individuos muestreados y la heterocigosidad esperada ( $H_e$ ) bajo un equilibrio de Hardy - Weinberg.

Para determinar hasta qué grado la endogamia observada se debe a cruzamientos consanguíneos o a diferenciación genética entre poblaciones (efecto Wahlund) se calculó la estadística  $F$  de Wright con el programa FSTAT versión 2.9.3 (Goudet, 2001) utilizando las técnicas de análisis de varianza propuestas por Weir y Cockerham (1984); donde  $F_{it}$  estima el grado de endogamia total,  $F_{is}$  estima el grado de endogamia dentro de las poblaciones y  $F_{st}$  es el índice de fijación que mide los efectos de subdivisión poblacional. Como prueba estadística se utilizaron intervalos de confianza calculados por el método de bootstrapping al 95%.

## **Cuello de botella**

Para detectar cuellos de botella se estudiaron las frecuencias alélicas usando el software Bottleneck versión 1.2.02 de Cornuet y Luicart (1996). Se usó el modelo de alelos infinitos (MAI) por ser más apropiado para datos enzimáticos, con 1000 iteraciones. Para probar la probabilidad de rechazo de la hipótesis nula (no existe exceso de heterocigosidad, Cornuet y Luicart, 1996) se usó con una prueba Wilcoxon de signo-rango con dos colas, la cual provee de una potencia estadística relativamente alta.

## **Distribución espacial de los genotipos**

Para investigar el tipo de estructura genética espacial en las poblaciones de estudio se utilizó una prueba de autocorrelación espacial multialélica y multivariada desarrollada por Smouse y Peakall (1999) con el programa GenAlEx6 (Peakall y Smouse, 2006). Este análisis genera un coeficiente de autocorrelación ( $r$ ). El coeficiente  $r$  varía de - 1 a + 1. Cuando  $r$  presenta valores de cero o cercanos a éste, no existe evidencia de autocorrelación espacial en la población y por lo tanto se infiere distribución al azar. Para probar la hipótesis nula de que dicho coeficiente es igual a 0 se utiliza bootstrapping y permutaciones con 1000 iteraciones a un 95% de intervalo de confianza. Si  $r \neq 0$ , se encuentra fuera del intervalo de confianza en permutaciones y el intervalo de confianza de bootstrapping no atraviesa  $r = 0$ , entonces se infiere una estructura genética espacial significativa.

## **Resultados**

### **Isoenzimas**

De las 17 enzimas probadas, cinco mostraron polimorfismo genético (Figuras 4-9): PGDH, PGM, PER, GPI y AAT. La interpretación de G3PDH<sub>NADP</sub> fue dudosa, ya que posiblemente exista duplicación (Anexo II). Se contabilizaron nueve loci polimórficos y uno monomórfico. De lo anterior no existe diferencia entre las dos poblaciones, no obstante para El Cerezal se encontraron 31 alelos mientras que para Reynoso fueron 33. Todas las bandas de las isoenzimas, excepto PER-3, migraron anodalmente.

### **Aspartato transaminasa (AAT, EC 2.6.1.1)**

La enzima AAT presentó tres loci polimórficos y diméricos con tres alelos cada uno (Figura 4). El genotipo 22 fue el más común para los tres loci. AAT-3 presentó tres alelos en El Cerezal y dos en Reynoso. El alelo 3 se observó como exclusivo y único en el genotipo 23 en El Cerezal.

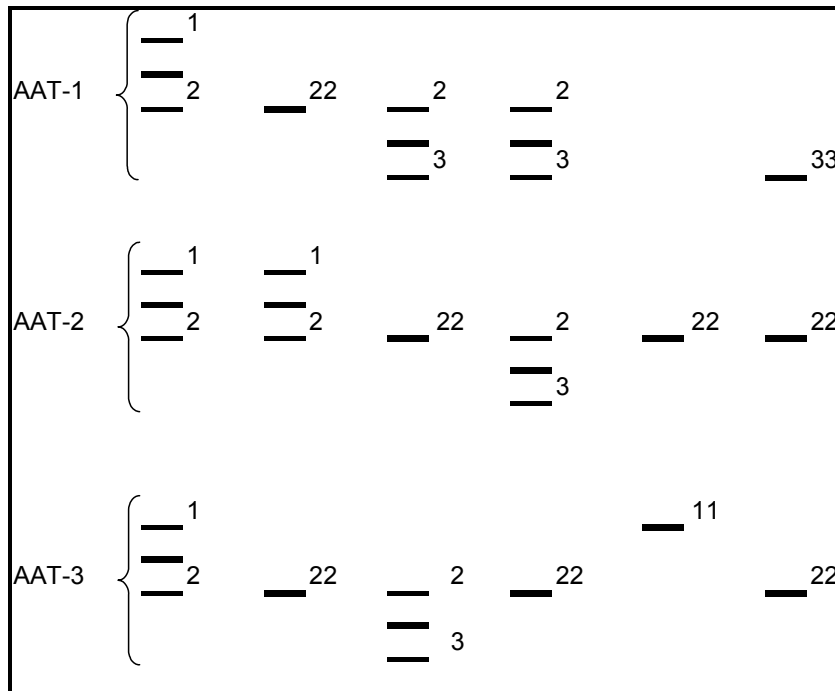


Figura 4. Zimograma correspondiente a la enzima AAT. Tres loci encontrados (AAT - 1, AAT - 2 y AAT - 3) con algunas combinaciones alélicas observadas (11, 12, 22, 23 y 33) para *Catopsis berteroniana* en las poblaciones de estudio (El Cerezal y Reynoso) de Santa Catarina Ixtepeji, Ixtlán, Oaxaca.

## 6 - fosfogluconato deshidrogenasa (PGDH, EC 1.1.1.44)

La enzima PGDH se observó con dos loci polimórficos y diméricos (PGDH-1 y PGDH-2), cada uno con tres alelos, además de un loci monomórfico (PGDH-3) (Figura 5). Los genotipos más comunes en PGDH-1 fueron 11 y 22, en PGDH-2 el genotipo más común fue el 11. No se detectaron alelos exclusivos ni únicos.

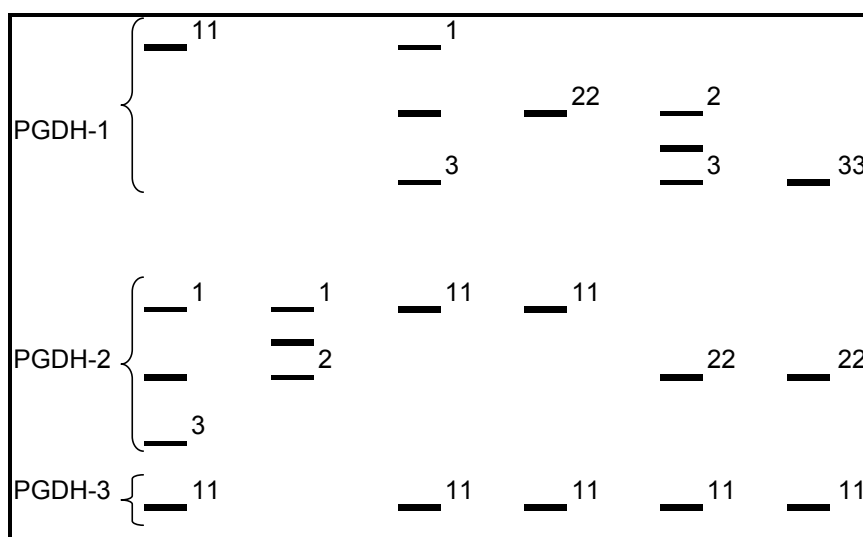


Figura 5 Zimograma correspondiente a la enzima PGDH. Tres loci encontrados (PGDH - 1, PGDH - 2 y PGDH - 3) con algunas combinaciones alélicas observadas (11, 12, 13, 22, 23 y 33) para *Catopsis berteroniana* en las poblaciones de estudio (El Cerezal y Reynoso) de Santa Catarina Ixtepeji, Ixtlán, Oaxaca.



## Fosfoglucomutasa (PGM, EC 5.4.2.2)

La enzima PGM resultó monomérica con cinco alelos en el único locus observado (Figura 6). El genotipo 24 fue el más común. Se observaron dos alelos en El Cerezal y cinco en Reynoso. El alelo 3 fue exclusivo de Reynoso. Además, los siguientes alelos fueron exclusivos y únicos en Reynoso: alelo 1 se presentó con el genotipo 13 al igual que el alelo 5 para el genotipo 25.

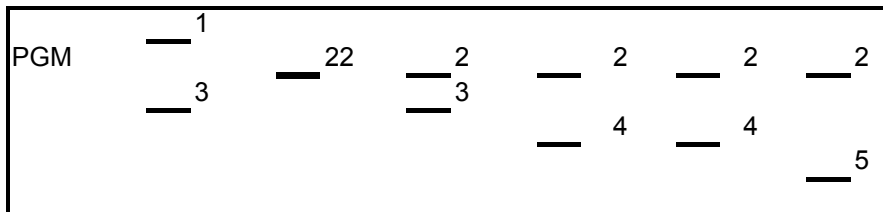


Figura 6. Zimograma correspondiente a la enzima PGM y el único loci con algunas de las combinaciones alélicas observadas (13, 22, 23, 24, 25) para *Catopsis berteroniana* en las poblaciones de estudio (El Cerezal y Reynoso) de Santa Catarina Ixtepeji, Ixtlán, Oaxaca.

## Glucosa - 6 - fosfato isomerasa (GPI, EC 5.3.1.9)

La enzima GPI se detectó como una enzima dimérica, GPI-1 y GPI-2 fueron polimórficos (Figura 7). Sin embargo, la definición de bandas en GPI-1 no fue lo suficientemente nítida por lo tanto este locus no se incluyó en los análisis. El genotipo más común fue 13. Se observaron seis alelos para GPI-2 en El Cerezal y siete en Reynoso. El alelo 6 fue exclusivo de Reynoso.

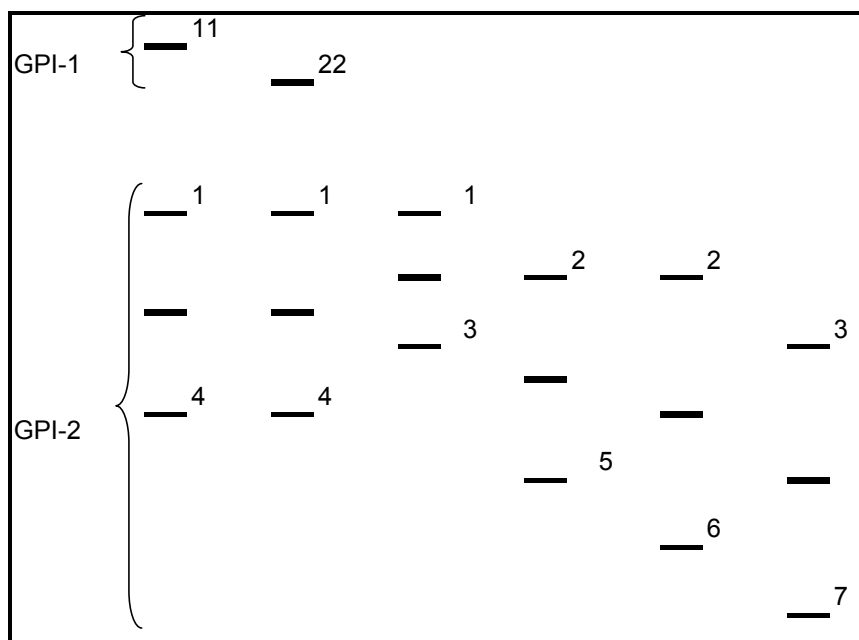


Figura 7. Zimograma correspondiente a la enzima GPI. Dos sistemas (GPI - 1 y GPI - 2). GPI - 1 muestra los únicos genotipos legibles (11 y 22). GPI - 2 muestra algunas de las combinaciones alélicas observadas (13, 14, 25, 26, 37) para *Catopsis berteroniana* en las poblaciones de estudio (El Cerezal y Reynoso) de Santa Catarina Ixtepeji, Ixtlán, Oaxaca.

## Peroxidasa (PER, EC 1.11.1.7)

En la enzima PER se detectaron tres loci polimórficos y monoméricos (Figura 8). PER-1 fue anodal, sin embargo la definición de bandas no fue clara y no se incluyó en los análisis. PER-2, también anodal, el genotipo más común fue 33, mostró cuatro alelos. PER-3 fue catodal, el genotipo más común fue el 22, presentó tres alelos en El Cerezal y dos en Reynoso. El alelo 3 fue exclusivo de El Cerezal en el genotipo 33.

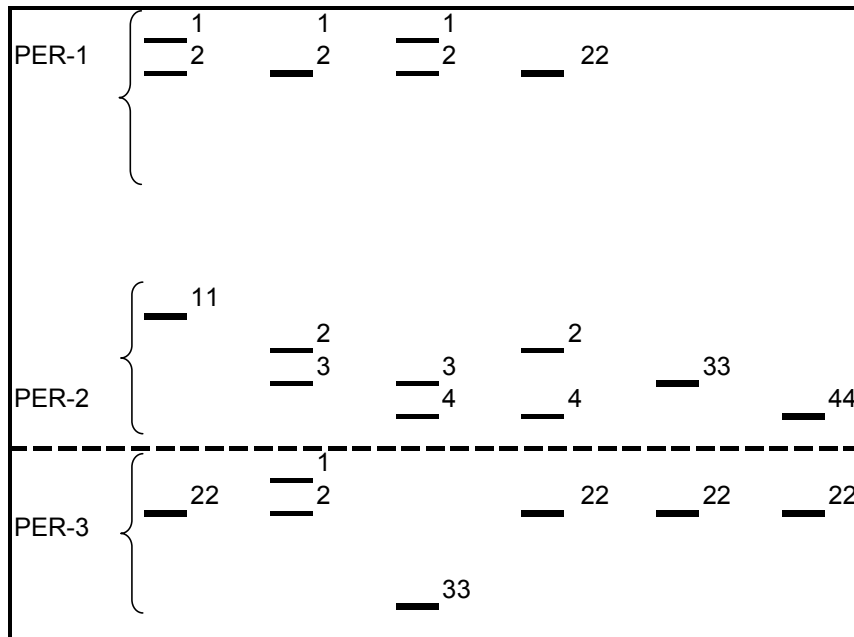


Figura 8. Zimograma correspondiente a la enzima PER, la línea discontinua indica origen del gel. PER - 1 y PER - 2 fueron anodales y PER - 3 fue catodal. PER - 3 muestra los únicos genotipos legibles (12 y 22). PER - 1 y PER - 2 muestran algunas otras de las combinaciones alélicas observadas (11, 12, 22, 23, 24, 33, 34, 44) para *Catopsis berteroniana* en las poblaciones de estudio (El Cerezal y Reynoso) de Santa Catarina Ixtepeji, Ixtlán, Oaxaca.

## Gliceraldehido - 3 - fosfato deshidrogenasa NADP+

### (G3PDH<sub>NADP</sub>, EC 1.2.1.9)

Las bandas observadas en G3PDH<sub>NADP</sub> fueron claras y sugieren existencia de duplicación génica debido al patrón de bandeo que presentó (Figura 9). Se trató de interpretar como una enzima monomórfica tetraploide y hexaploide sin llegar a una propuesta factible que pudiera explicar el patrón de bandas observado (Apéndice II). Se requieren estudios posteriores que ayuden a aclarar la interpretación. Por la dificultad que se tuvo para la correcta interpretación de esta enzima no fue tomada en cuenta para los análisis genéticos.

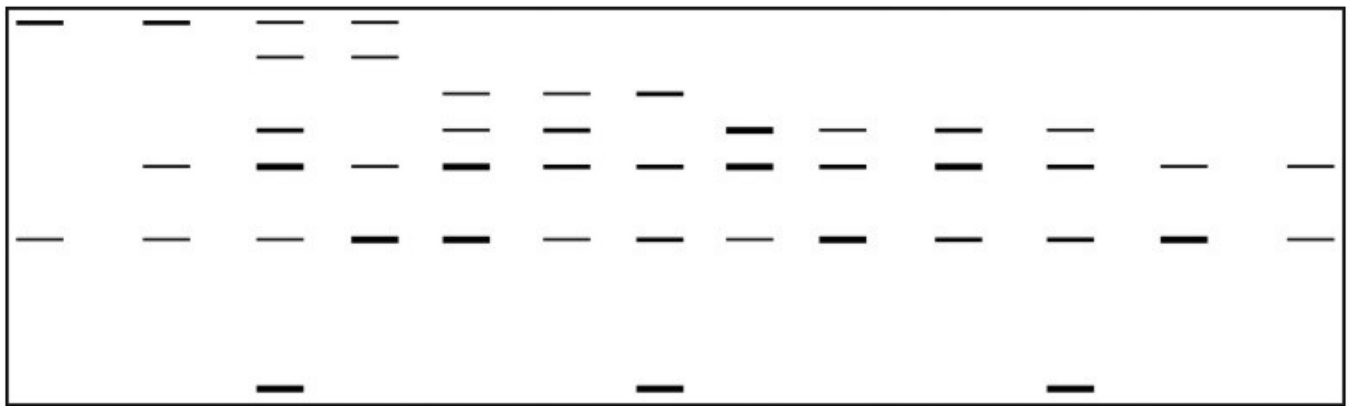


Figura 9. Zimograma correspondiente a la enzima G3PDH<sub>NADP</sub> para *Catopsis berteroniana* en las poblaciones de estudio (El Cerezal y Reynoso) de Santa Catarina Ixtepeji, Ixtlán, Oaxaca. No hay una interpretación genética plausible para el zimograma (Apéndice II).

## Análisis genéticos

### Prueba sobre desequilibrio genotípico

No se detentó evidencia significativa de asociaciones dependientes entre los pares de loci analizados. Sin embargo, PGDH-1 X PGDH-2 tuvo una probabilidad cercana a la significancia (Tabla 3). Los resultados anteriores sugieren que los loci se distribuyeron de manera independiente, de tal modo que, es posible incluirlos en los análisis genéticos.

Tabla 3. Valores de desequilibrio genotípico para los distintos loci encontrados en *Catopsis berteroniana* en las poblaciones de estudio (El Cerezal y Reynoso) en Santa Catarina Ixtepeji, Ixtlán, Oaxaca, México. Con base en 720 permutaciones. Correcciones Bonferroni, Probabilidad = 0.05; ajuste = 0.001389.

Pares de loci	Probabilidad	Pares de loci	Probabilidad
PGDH-1 X PGDH-2	0.001390	PER-2 X AAT-3	0.309720
PGDH-1 X PER-2	0.080560	PER-2 X GPI-2	0.202780
PGDH-1 X PER-3	0.720830	PER-2 X PGM	0.020830
PGDH-1 X AAT-1	0.181940	PER-3 X AAT-1	0.183330
PGDH-1 X AAT-2	0.840280	PER-3 X AAT-2	0.226390
PGDH-1 X AAT-3	0.737500	PER-3 X AAT-3	0.733330
PGDH-1 X GPI-2	0.944440	PER-3 X GPI-2	0.715280
PGDH-1 X PGM	0.058330	PER-3 X PGM	0.163890
PGDH-2 X PER-2	0.476390	AAT-1 X AAT-2	0.004170
PGDH-2 X PER-3	0.686110	AAT-1 X AAT-3	0.397220
PGDH-2 X AAT-1	0.163890	AAT-1 X GPI-2	0.498610
PGDH-2 X AAT-2	0.595830	AAT-1 X PGM	0.629170
PGDH-2 X AAT-3	0.122220	AAT-2 X AAT-3	0.619440
PGDH-2 X GPI-2	0.938890	AAT-2 X GPI-2	0.395830
PGDH-2 X PGM	0.073610	AAT-2 X PGM	0.693060
PER-2 X PER-3	0.300000	AAT-3 X GPI-2	0.011110
PER-2 X AAT-1	0.223610	AAT-3 X PGM	0.356940
PER-2 X AAT-2	0.162500	GPI-2 X PGM	0.501390

## Polimorfismo, riqueza y diversidad alélica

De los 10 loci examinados, nueve fueron polimórficos, es decir, existe un 90% en porcentaje de polimorfismo. Los nueve loci polimórficos fueron PGDH-1, PGDH-2, PER-2, PER-3, AAT-1, AAT-2, AAT-3, GPI-2 y PGM. El locus PGDH-3 se observó monomórfico. Todo lo anterior es aplicable tanto en la población El Cerezal como en la de Reynoso. El número de alelos por locus ( $A$ ), el número de alelos por locus polimórfico ( $A_p$ ) y la riqueza alélica ( $R_t$ ), fueron altas para ambas poblaciones; sin embargo, la población de Reynoso presentó valores ligeramente mayores que los de El Cerezal (Tabla 4).

Tabla 4. Número de alelos por locus ( $A$ ), número de alelos por locus polimórfico ( $A_p$ ) y riqueza alélica ( $R_t$ ) para *Catopsis berteroniana* en las poblaciones de estudio, Santa Catarina Ixtepeji, Ixtlán, Oaxaca, México.

Población	$A$	$A_p$	$R_t$
El Cerezal	3.100	3.333	3.079
Reynoso	3.333	3.560	3.267

## Heterocigosidad

El promedio de la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) así como la esperada bajo un equilibrio Hardy - Weinberg ( $H_e$ ) para ambas poblaciones de estudio (El Cerezal y Reynosos) sugieren una elevada variabilidad genética en las poblaciones respecto a otras bromelias (Soltis *et al.* 1987, Murawski y Hamrick 2001). Sin embargo, de los nueve loci polimórficos siete presentaron evidencia de endogamia; es decir, déficit de heterocigosidad (Tabla 5).

Tabla 5. Heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y heterocigosidad esperada bajo equilibrio Hardy - Weinberg ( $H_e$ ) en *Catopsis berteroniana* en las poblaciones de estudio de Santa Catarina Ixtepeji, Ixtlán, Oaxaca, México. Entre paréntesis desviación estándar.

Loci	$H_e$		$H_o$		Probabilidad	
	El Cerezal	Reynoso	El Cerezal	Reynoso	Cerezal	Reynoso
PGDH-1	0.667 (0.040)	0.614 (0.028)	0.267 (0.002)	0.083 (0.032)	0.014	0.012
PGDH-2	0.411 (0.003)	0.435 (0.003)	0.260 (0.003)	0.250 (0.008)	0.974	0.818
PER-2	0.501 (0.016)	0.466 (0.007)	0.286 (0.001)	0.278 (0.004)	0.582	0.305
PER-3	0.212 (0.025)	0.121 (0.042)	0.111 (0.024)	0.125 (0.025)	0.999	0.624
AAT-1	0.249 (0.020)	0.397 (0.003)	0.176 (0.015)	0.250 (0.008)	0.313	0.094
AAT-2	0.168 (0.031)	0.311 (0.015)	0.182 (0.014)	0.188 (0.017)	0.291	0.077
AAT-3	0.133 (0.036)	0.080 (0.048)	0.100 (0.026)	0.027 (0.040)	0.460	0.135
GPI-2	0.778 (0.056)	0.817 (0.057)	0.655 (0.054)	0.840 (0.076)	0.265	0.230
PGM	0.366 (0.003)	0.503 (0.012)	0.476 (0.028)	0.705 (0.057)	0.030	0.007
Promedio	0.387	0.416	0.279	0.305	0.026	0.024

## Estadística F de Wright

Los análisis en la estadística F de Wright mostraron una baja endogamia total (*Fit*) así como una ligera endogamia dentro de las poblaciones (*Fis*). Además, esta técnica no detectó evidencia de que las poblaciones estuvieran subdivididas (*Fst*) (Tabla 6).

Tabla 6. Estadística F de Wright de *Catopsis berteroniana* para nueve loci polimórficos de las poblaciones (El Cerezal y Reynoso), Santa Catarina Ixtepeji, Ixtlán, Oaxaca, México. *Fit*= coeficiente de endogamia total de las poblaciones, *Fis*= coeficiente de endogamia dentro de las poblaciones, *Fst*= coeficiente de endogamia entre poblaciones. Entre paréntesis el intervalo de confianza al 0.95 obtenido por medio de la técnica de bootstrapping.

Loci	<i>Fit</i>	<i>Fis</i>	<i>Fst</i>
PGDH-1	0.631	0.596	0.087
PGDH-1	0.393	0.397	-0.006
PER-2	0.465	0.471	-0.011
PER-3	0.290	0.306	-0.023
AAT-1	0.342	0.335	0.011
AAT-2	0.225	0.214	0.014
AAT-3	0.369	0.375	-0.010
GPI-2	0.089	0.070	0.020
PGM	-0.377	-0.360	0.017
Total	0.271(0.045-0.480)	0.256(0.035-0.462)	0.021 (-0.003-0.048)

## Cuello de botella

Los valores de heterocigosidad (esperada en equilibrio Hardy-Weinberg y esperada para un equilibrio mutación- deriva bajo el modelo de alelos infinito, en general, fueron elevados (entre 0.3 y 0.8) (Tabla 7). Así, cinco de nueve valores de heterocigosidad resultaron elevados en El Cerezal, siete en Reynoso y seis para el análisis que incluye ambas poblaciones (Tabla 7).

Tabla 7. Heterocigosidades esperadas en Hardy-Weinberg y el modelo de alelos infinitos (MAI) en las poblaciones de estudio para *Catopsis berteroniana*, Santa Catarina Ixtepeji, Ixtlán, Oaxaca, México. Prueba de dos colas de Wilcoxon= 0.734.

Isoenzima	El Cerezal			Reynoso			Ambas poblaciones		
	Hardy-Weinberg	MAI	Probabilidad	Hardy-Weinberg	MAI	Probabilidad	Hardy-Weinberg	MAI	Probabilidad
PGDH-1	0.653	0.416	0.050	0.606	0.376	0.080	0.658	0.344	0.012
PGDH-2	0.410	0.330	0.379	0.433	0.340	0.400	0.421	0.297	0.319
PER-2	0.496	0.499	0.423	0.459	0.503	0.346	0.479	0.439	0.490
PER-3	0.210	0.399	0.208	0.121	0.247	0.387	0.167	0.343	0.246
AAT-1	0.248	0.324	0.390	0.395	0.337	0.432	0.315	0.289	0.457
AAT-2	0.168	0.309	0.308	0.310	0.332	0.453	0.236	0.289	0.439
AAT-3	0.133	0.323	0.207	0.079	0.198	0.397	0.110	0.297	0.253
GPI	0.777	0.561	0.014	0.817	0.623	0.009	0.804	0.573	0.006
PGM	0.367	0.193	0.216	0.505	0.520	0.389	0.441	0.473	0.361

## Autocorrelación espacial global

La autocorrelación espacial global de *C. berteroniana* se realizó agrupando las distancias en cada kilómetro (Figura 13). Se detectó un valor de correlación ( $r$ ) entre pares de individuos separados a menos de 1 Km de distancia, con un punto de intercepción ( $r = 0$ ) a los 2.283 Km y también valores negativos para individuos separados a más de 3 Km entre sí. por lo tanto la distribución, en general, no es al azar como se esperaría con un  $r = 0$ . Debido a que la autocorrelación de las plantas muestreadas disminuye conforme aumenta la distancia, existe un aislamiento por distancia.

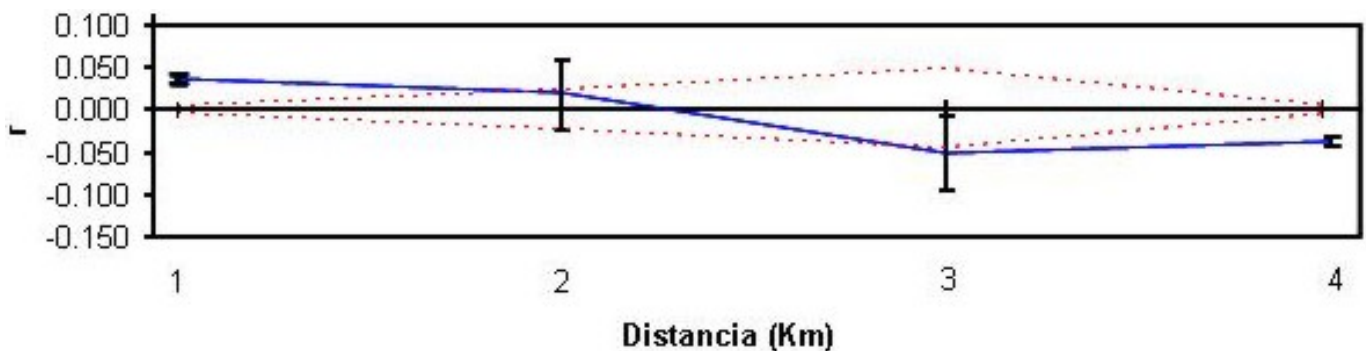


Figura 13. Correlograma que muestra la autocorrelación espacial ( $r$ ) en función de la distancia cada Km para *Catopsis berteroniana* en las poblaciones de estudio (El Cerezal y Reynoso) de Santa Catarina Ixtepeji, Ixtlán, Oaxaca, México. Intervalos de confianza al 95% por permutaciones al azar y barras de intervalo de confianza al 95% por bootstrapping, siguiendo la hipótesis nula de una distribución al azar ( $r = 0$ ).

## Discusión

### Isoenzimas

Sarthou *et al.* (2001) encontraron en *Pitcairnia geyskesii* tres isoenzimas para AAT, igual que lo observado en *C. berteroniana*, pero en *P. geyskesii* AAT-3 fue monomórfica a diferencia del polimorfismo encontrado en *C. berteroniana*. En *P. geyskesii* se encontró que PGM-1 tuvo cuatro aloenzimas, mientras que en *C. berteroniana* se observaron cinco.

El número de isoenzimas de PGDH y GPI encontrado en *C. berteroniana* concuerda con lo reportado en las bromelias *Tillandsia ionantha* y *T. recurvata* por Soltis *et al.* (1987). En PGDH-1, los patrones de bandeado fueron ilegibles en dichas *Tillandsias* y ambas presentaron dos alelos en PGDH-2 comparado con los tres alelos por cada sistema polimórfico encontrado en *C. berteroniana*. Por otro lado, en GPI-2 el número de aloenzimas para *T. ionantha* (cuatro) es menor al de *C.*

*berteroniana* (siete), mientras que para PGM-1 se encontró el mismo número de alelos (cinco) tanto en *C. berteroniana* como en *T. ionantha*. Soltis *et al.* (1987) no reportan duplicación en G3PDH<sub>NADP</sub>. Estos autores encontraron dos sistemas (uno polimórfico) en *T. ionantha* y tres sistemas monomórficos en *T. recurvata*.

González-Astorga *et al.* (2004) observaron en *T. achyrostachys*, un alelo en PER-1 así como dos alelos en PGM y GPI. El número de alelos presentes en *Catopsis berteroniana* es mayor: hasta cuatro alelos en PER, cinco en PGM y siete en GPI. El número de sistemas en PGM (uno) de ambas bromelias coincide a pesar de que en otras bromelias se han reportado dos y tres sistemas (Soltis *et al.*, 1987; Murawski y Hamrick, 1990; Sarthou *et al.*, 2001).

La bromelia *Aechmea magdalenae* (Murawski y Hamrick, 1990) y *Tillandsia achyrostachys* (González-Astorga *et al.*, 2004) mostraron menor número de alelos (un máximo de dos alelos en cada locus de las enzimas AAT, PGM, PGDH y PGI en *A. magdalenae* y PGM, PGI y PER en *T. achyrostachys*). Según González-Astorga *et al.* (2004), la variación se debe a la pérdida de hábitat de *T. achyrostachys*, mientras que Murawski y Hamrick (1990) explican la variación electroforética de *Aechmea magdalenae* por el hábitat fragmentado donde ésta se localiza. La pérdida y fragmentación del hábitat son factores que, de manera general, contribuyen a la disminución de la variación genética. *Catopsis berteroniana* también se localiza en un hábitat fragmentado y perturbado, además está sometida a extracción por lo menos en una de las poblaciones estudiadas, sin embargo la variabilidad genética fue alta probablemente debido al tipo de reproducción que al parecer es cruzada. Incluso, la variabilidad de aloenzimas en *Catopsis* es comparable con la orquídea alotetraploide *Spiranthes diluvialis* (Artf y Ranker, 1998).

## **Estimadores de la diversidad genética**

Los valores promedio en el porcentaje de polimorfismo, riqueza alélica, número de alelos en el total de loci y loci polimórficos, así como la heterocigocidad observados en *Catopsis berteroniana* revelan una gran variabilidad genética. No se encontraron estudios en genética de poblaciones con electroforesis de proteínas que reporten tan altos niveles de variación genética (Tabla 8). En general las plantas de la Tabla 8 son de hábitats fragmentados o con algún tipo de perturbación y los valores de variación genética se consideraron altos a pesar de las condiciones adversas; en el caso de las orquídeas el tipo de reproducción predominante es cruzada y las semillas son, principalmente, anemócoras lo cual

puede influir en la variación genética encontrada al incrementar el flujo genético. Cabe hacer mención que varios de los estudios reportan que el tamaño de muestra supera al del presente estudio, no obstante la variación encontrada en ésta última especie es la más sobresaliente (Tabla 8).

Pocos estudios muestran estos niveles de variación usando isoenzimas (Borba *et al.* 2001; González-Astorga *et al.* 2005).

## **Estadística F de Wright**

La estadística F de Wright muestra un valor de *F<sub>is</sub>* relativamente bajo (0.256) lo que sugiere una ligera endogamia dentro de las poblaciones. Esto puede deberse a que la reproducción no es netamente al azar porque muchas de las semillas germinan cerca de la planta materna incrementando así las posibilidades de cruza entre hermanos. En cambio el valor de *F<sub>st</sub>* (0.021) no muestra evidencia de diferenciación genética entre las poblaciones estudiadas. La dispersión anemocórica de las semillas en *C. berteroniana* que posiblemente aumenta las probabilidades de flujo génico pudiera explicar la baja diferenciación entre ambas poblaciones. Por otro lado, las poblaciones se encuentran relativamente cercanas y es posible que esto permita un mayor movimiento genético (Schonewald *et al.*, 2003; Kärkkäinen *et al.*, 2004; Flores-Palacios y García-Franco, 2006). Esta estructura genética puede deberse también al posible tipo de reproducción cruzada obligada que presenta, *C. berteroniana*, ya que se ha observado que los sistemas de cruzamiento son parte importante en la definición de dicha estructura (Loveless y Hamrick, 1984; Del Castillo, 1994).

En general, las bromelias son autoincompatibles, los sistemas de cruzamiento más extremos se encuentran en el género *Catopsis* pues son plantas dioicas, monoicas y a veces ginodioicas (Benzing, 1990). Otros mecanismos que evitan la reproducción entre organismos emparentados es la incompatibilidad, tal como ocurre en el género *Pleurothallis* de las orquídeas que pudiera explicar la alta variabilidad genética encontrada en este género (Borba *et al.*, 2001) (Tabla 8).



Tabla 8. Tamaño de muestra aproximado (N), media del porcentaje de polimorfismo (P), media de alelos por total de locus (A), media de alelos por locus polimórfico (Ap), riqueza alélica (Rt) y heterocigosidad esperada (He) en bromelias, orquídeas y otras plantas, se incluye la especie de estudio. “+” = por población

Especie/ Fuente bibliográfica	N	Media de P (%)	Media de A	Media de Ap	Media de Rt	Media de He
<b>Bromelias</b>						
<b><i>Catopsis berteroniana</i></b>	<b>134</b>	<b>80</b>	<b>3.200</b>	<b>3.440</b>	<b>3.173</b>	<b>0.399</b>
<i>Aechmea. magdalenae</i> (Murawski y Hamrick, 1990)	47-50 <sup>+</sup>	24	1.797	2.096	-	0.121
<i>A. tuitensis</i> (Izquierdo y Piñero, 2000)	109	78	1.600	2.400	-	0.140
<i>Pitcairnia geyskesii</i> (Sarhou <i>et al.</i> , 2001)	162	63	1.910	2.210	-	0.183
<i>T. achyrostachys</i> var. <i>achyrostachys</i> (González-Astorga <i>et al.</i> , 2004)	-	59	1.860	2.277	-	0.211
<i>Tillandsia ionantha</i> (Soltis <i>et al.</i> , 1987)	243	17	1.380	2.855	-	0.070
<i>T. recurvata</i> (Soltis <i>et al.</i> , 1987)	-	4	1.040	2.000	-	0.010
<b>Orquídeas</b>						
<i>Caladenia tentaculata</i> (Peakall y Beattie, 1996)	-	24	1.600	-	-	0.091
<i>Eulophia sinensis</i> (Sun, 1997)	57	1	1.006	-	-	-
<i>Myrmecophila christinae</i> var. <i>christinae</i> (Vargas <i>et al.</i> , 2006)	20-40 <sup>+</sup>	77	2.110	-	1.350	0.345
<i>Oncidium hookeri</i> (Alcantara <i>et al.</i> , 2006)	17-26 <sup>+</sup>	55	1.750	-	1.750	0.099
<i>Orchis laxiflora</i> (Arduino <i>et al.</i> , 1996)	-	28	1.300	2.051	-	0.050
<i>Orchis morio</i> (Rossi <i>et al.</i> , 1992)	346	54	1.700	2.502	-	0.120
<i>Orchis palustris</i> (Arduino <i>et al.</i> , 1996)	-	56	1.100	2.233	-	0.020
<i>Orchis papilionacea</i> (Arduino <i>et al.</i> , 1995)	3000	89	2.300	2.700	-	0.170
<i>Pleurothallis adamantinensis</i> (Borba <i>et al.</i> (2001)	-	63	2.100	-	2.100	0.272
<i>P. fabiobarrosii</i> (Borba <i>et al.</i> , 2001)	-	79	3.400	-	-	0.395
<i>P. johannensis</i> (Borba <i>et al.</i> , 2001)	-	74	3.070	-	-	0.346
<i>P. ochreatea</i> (Borba <i>et al.</i> , 2001)	-	58	2.425	-	-	0.265
<i>P. teres</i> (Borba <i>et al.</i> , 2001)	-	68	2.910	-	-	0.324
<i>Spiranthes diluvialis</i> (Artf y Ranker, 1998)	651	63	1.800	2.900	-	-
<i>Spiranthes hongkongensis</i> (Sun, 1997)	243	0	1.005	-	-	-
<i>Zeuxine strateumatica</i> (Sun, 1997)	128	0	1.000	-	-	-
<b>Otras plantas</b>						
<i>Dioon angustifolium</i> (González-Astorga, 2005)	200	52	1.600	2.300	-	-
Musgos (Stoneburner <i>et al.</i> , 1991)	18spp	36	-	1.510	-	-
Hepáticas (Stoneburner <i>et al.</i> , 1991)	8spp	15	-	1.280	-	-
Traqueofitas (Stoneburner <i>et al.</i> , 1991)	13spp	34	-	1.530	-	-

- = sin dato

## Cuello de Botella

González-Astorga *et al.* (2005) estudiaron posibilidades de cuello de botella en la cícada *Dioon angustifolium*. Los autores encontraron una diversidad genética en *D. angustifolium* comparable con la encontrada en *C. berteroniana*, ambas fueron elevadas. Sin embargo, en *D. angustifolium* sí existió diferencia significativa entre los valores esperados de heterocigosidad (los valores de heterocigosidad esperada bajo un equilibrio Hady- Weinberg resultaron mayores a los de heterocigosidad esperada bajo un equilibrio en el modelo de alelos infinito) y por lo tanto resultó en un cuello de botella, posiblemente debido a la fragmentación que ha sufrido la especie en un pasado reciente (González-Astorga *et al.*, 2005).

La detección de un cuello de botella por el método utilizado falla cuando éste no ha sido severo, cuando es reciente o muy lejano en el tiempo, cuando los marcadores no son lo suficientemente variables (se descarta para *C. berteroniana* por el párrafo anterior).

La prueba de cuello de botella incrementa su sensibilidad al utilizar marcadores con elevada heterocigosidad (entre 0.3-0.8; Cornuet y Luikart, 1996). En el presente estudio, varios loci estudiados presentaron alta heterocigosidad esperada bajo un equilibrio Hady- Weinberg tanto por población individual como para ambas poblaciones. Es poco probable que no se detectara cuello de botella en *C. berteroniana* por falta de marcadores genéticos sensibles.

Puede ser que los niveles de explotación de *C. berteroniana* no sean lo suficientemente severos como para ocasionar un cuello de botella. Por otro lado, para averiguar si el cuello de botella fue reciente o lejano debe conocerse el tamaño de la población después de ocurrido el cuello de botella por lo que en este caso, si es que existió cuello de botella, no es posible determinar el lapso de tiempo (reciente o lejano). No obstante, aparentemente, la explotación de las bromelias en Santa Catarina Ixtepeji empezó hace 60 años, *Catopsis berteroniana* fue una de las primeras en ser explotadas (Mujeres encargadas de las bromelias en Santa Catarina Ixtepeji, comunicación personal). Las mismas mujeres comentan que la población denominada “El Cerezal” no está sujeta a explotación debido a que el número de individuos no es grande en comparación con la población de “Reynoso” que se explota año con año. Por lo anterior, lo más probable es que no se haya detectado cuello de botella porque simplemente no hubo.

Por otro lado, se ha encontrado que esta bromelia se distribuye principalmente en los bordes del bosque. Al aumentar la fragmentación aumentan

los bordes y por lo tanto, aparentemente, aumentan los sitios donde esta especie se desarrolla. Estudios sobre deforestación demuestran que ha habido pérdida de bosque durante los años de 1999 al 2000 (17.5 % en Cerezal y 53.9 % en Reynoso, Raúl Rivera García, comunicación personal). De este modo, es posible que la deforestación esté favoreciendo hasta cierto punto a *Catopsis berteroniana* al aumentar los bordes del bosque.

## **Autocorrelación espacial global**

En la bromelia *C. berteroniana* se encontró un patrón de aislamiento por distancia al igual que lo observado en las orquídeas *Caladenia tentaculata* (Peakall y Beattie, 1996) y *Orchis cyclochyla* (Chung *et al.*, 2005). Sin embargo, en las orquídeas la autocorrelación fue significativamente positiva entre los 0.500 y 7.000 m de distancia mientras que para *C. berteroniana* a 1.000 Km de distancia. Para las orquídeas se esperaba que los valores de dispersión fueran más lejanos por el tipo de dispersión anemocórica y por el diminuto tamaño de la semilla que normalmente es altamente versátil.

En general existe una estructura genética espacial en la población de *C. berteroniana* que se manifiesta como un aislamiento por distancia (Figura 13). Es común que las poblaciones cercanas geográficamente tengan una similitud mayor porque no existen barreras físicas que interrumpan el flujo génico y esta similitud se reduce entre más se alejan las poblaciones. La autocorrelación, al integrar un componente geográfico con uno genético, da un resultado mucho más exacto en la diferenciación poblacional, es por eso que se observa un aislamiento por distancia entre las poblaciones de estudio. De alguna forma el flujo génico se interrumpe con la distancia, esto puede deberse al tipo de dispersión de las semillas o a la polinización por insectos, los cuales seguramente polinizan las flores más cercanas con mayor frecuencia que las alejadas.

A pesar de la explotación que ha sufrido la bromelia *C. berteroniana*, desde hace 60 años aproximadamente (Mujeres encargadas de las bromelias en Santa Catarina Ixtepeji, comunicación personal), la población estudiada de esta especie, parece encontrarse estable genéticamente de acuerdo con los análisis efectuados. Es probable que la elevada variación genética observada en la población permita esta aparente estabilidad. Además, los estudios genéticos son congruente con análisis demográficos (Plan de manejo y conservación, 2007) donde por lo menos tampoco existe evidencia de algún decremento en la población de *Catopsis berteroniana*. Las mismas mujeres de la comunidad

comentan que las poblaciones de estudio son geográficamente cercanas por lo que es posible que entre ambas exista un continuo flujo genético y explique la poca diferenciación entre ambas poblaciones.

## Conclusiones

La diversidad genética estimada en *Catopsis berteroniana* 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 en relación con los valores obtenidos para otras bromelias y otras plantas.

Los valores genéticos obtenidos en *Catopsis berteroniana* aunado a su morfología floral (observación personal) sugieren que es una especie de cruzamiento alógamo obligado con cierto grado de endogamia posiblemente por cruces entre individuos emparentados.

No se encontró evidencia de un cuello de botella.

Se observó una ligera endogamia en las poblaciones estudiadas atribuible principalmente a cruces consanguíneas con respecto al estadístico  $F$  de Wrigth.

No existe suficiente evidencia genética de una separación entre las poblaciones propuestas como El Cerezal y Reynoso respecto al estadístico  $F$  de Wrigth. Por otro lado, con la prueba de autocorrelación espacial global se observó un aislamiento por distancia.

No hay evidencia de disminución de la diversidad genética en la población estudiada debido a la explotación sobre la planta por los pobladores.

## Literatura Citada

- Alcantara S, Semir J, Solferini VN (2006) Low genetic structure in an epiphytic Orchidaceae (*Oncidium hookeri*) in the Atlantic rainforest of South-eastern Brazil. *Ann Bot* 98: 1207-1213.
- Arduino P, Cianchi R, Rossi W, Corrias B, Bullini L (1995) Genetic variation in *Orchis papilionaceae* (Orchidaceae) from the Central Mediterranean region: taxonomic inferences at the intraspecific level. *Pl Syst Evol* 194: 9-23.
- Arduino P, Verra F, Cianchi R, Rossi W, Corrias B, Bullini L (1996) Genetic variation and natural hybridization between *Orchis laxiflora* and *Orchis palustris* (Orchidaceae). *Pl Syst Evol* 202: 87-109.
- Artf AM, Ranker TA (1998) Allopolyploid origin and population genetics of the rare orchid *Spiranthes diluvialis*. *Am J Bot* 85: 110-122.
- Barfuss MHJ, Samuel R, Till W, Stuessy TF (2005) Phylogenetic relationships in subfamily Tillandsioideae (Bromeliaceae) based on DNA sequences data from seven plastid regions. *Am J Bot* 92: 337-351.
- Benzing DH (1990) *Vascular epiphytes. General biology and related biota*. Cambridge University press: Estados Unidos, 354pp.
- Benzing DH (2004) Vascular epiphytes. In: Lowman MD, Rinker HB. (eds) *Forest canopies*. Elsevier: Reino Unido pp 175-211.
- Beutelspacher BCR (1999) *Bromeliáceas como ecosistemas*. Plaza y Valdes editores: México, 123pp.
- Borba EL, Felix JM, Solferini VN, Semir J (2001) Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species have high genetic variability: evidence from isozyme markers. *Am J Bot* 88: 419-428.
- Cheliak WM, Pitel JA (1984) *Techniques for starch gel electrophoresis of enzymes from forest tree species*. Information report PI-X-42. Petawa National Forestry Institute: Estados Unidos.
- Chung MY, Nason JD, Chung MG (2005) Spatial structure in populations of the terrestrial orchid *Orchis cyclochila* (Orchidaceae). *Pl Syst Evol* 254: 209-219.
- (CONABIO) Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, (1998) Climas Clasificación de Koppen, modificado por García Escala 1:1 000 000. México.
- Conkle MT, Hoopkiss PD, Nunnally LB, Hunter SC (1982) *Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual*. Pacific southwest forest and range experiment station: Estados Unidos.
- Cornuet JM, Luikart G (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014.
- Davidse G, Sousa M, Charter AO (1994) *Flora mesoamericana* Vol. 6. UNAM: México, 543pp.
- Del Castillo RF (1994) Factors influencing the genetic structure of *Phacelia dubia*, a species with a seed bank and large fluctuations in population size. *Heredity* 72: 446- 458.
- Duval I (1990) *The bromeliads*. Big Bridge Press: Estados Unidos, 154 pp.
- Enzyme Nomenclature (2006) RU <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/>
- Espejo-Serna A, López-Ferrari AR, Ramírez-Morillo I, Holst BK, Luther HE, Hill W (2004) Checklist of Mexican Bromeliaceae with notes on species distribution and levels of endemism. *Selbyana* 25: 33-86.
- Flores- Palacios A, García- Franco JG (2006) The relationship between tree size and epiphyte species richness: testing four different hypotheses. *J Biogeography* 33: 323-330.
- Frankham JD, Ballou JD, Briscoe DA (2002) *Introduction to conservation genetics*. University Press Cambridge: Reino Unido, 617 pp.
- García- Franco J (1986) *Las bromelias de México*. Revisión bibliográfica y de herbario. Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos (INIREB): México, 94 pp.
- González-Astorga J, Cruz-Angón A, Flores-Palacios A, Vovides AP (2004) Diversity and genetic structure of the Mexican endemic epiphyte *Tillandsia achyrostachys* E. Morr. ex Baker var. *achyrostachys* (Bromeliaceae). *Ann Bot* 94: 545-551.
- González-Astorga J, Vovides AP, Cruz-Angón A, Flores-Palacios A, Octavio-Aguilar P, Iglesias C (2005) Allozyme variation in the three extant population of the narrowly endemic cycad *Dioon angustifolium* Miq. (Zamiaceae) from north-eastern Mexico. *Ann Bot* 95: 999-1007.
- González CJU (2004) Biología de la reproducción y variación isoenzimática en *Tillandsia elongata* Kunth var. *subimbricata* (Baker) L. B. Sm. y *Tillandsia brachycaulos* Schtdl., en el Parque Nacional de Dzibilchaltún, Yucatán, México. Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Mérida, Yucatán, México.
- González- Elizondo S, González- Elizondo M, Cortés- Ortiz A (1993) Vegetación de la reserva de la biósfera "La Michilfa", Durango, México. *Act Bot Mex*. Num. 22. Instituto de Ecología- CONACYT: México, 104pp.
- Gottlieb LD (1981) Electrophoretic evidence and plant populations. *Prog phytochem* 7: 1-46.
- Gouda EJ (1987) *Bromeliaceae subfamily Tillandsioideae*. 112 pp.

- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Hietz P, Hietz-Seifert U (1994) *Epífitas de Veracruz. Guía ilustrada para las regiones de Xalapa y Los Tuxtlas, Veracruz*. Instituto de Ecología. A.C. México, 236pp
- INEGI Mapa de uso de suelo y vegetación, modificado por CONABIO (1999) En: Uso de suelo y vegetación. Escala 1:250 000. México.
- INEGI (2005) Límite Nacional obtenido del Modelo Digital del terreno. Escala 1:250 000. México. Instituto nacional para el federalismo y el desarrollo municipal, gobierno del estado de Oaxaca. H. Ayuntamiento de Santa Catarina Ixtepeji (2002) *Enciclopedia de los municipios de México*. Estado de Oaxaca. Santa Catarina Ixtepeji. <http://www.elocal.gob.mx/work/templates/enciclo/oaxaca/municipios/20363a.htm>.
- Izquierdo LY, Piñero D (1998) Allozyme divergence among four species of *Podaechmeas* and the status of *Ursulaea* (Bromeliaceae, Bromelioideae) *Plant Systematics and Evolution* 213: 207-215.
- Izquierdo LY, Piñero D (2000) High genetic diversity in the only known population of *Aechmea tuitensis* (Bromeliaceae). *Aust J Bot* 48: 645–650.
- Kärkkäinen K, Loe G, Agren J (2004) Populations structure in *Arabidopsis lyrata*: evidence for divergent selection on trichome production. *Evolution* 58: 2831-2836.
- Karp A, Isaac PG, Ingram DS (2001) *Molecular tools for screening biodiversity*. Kluwer Academic Publishers. Países Bajos. 498pp.
- Kress WJ, Luther HE, Roesel CS (1990) Genetic variation in three species of Florida *Tillandsia*. *J. Brom. Soc. Bull* 40: 109-111.
- Loveless MD, Hamrick JL (1984) Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annu. Rev. Ecol Syst.* 15: 65-95.
- Lowe AJ, Boshier D, Ward M, Bacles CFE, Navarro C (2005) Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity* 95: 255-273.
- NOM-059-ECOL-2001. Norma Oficial Mexicana. Protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo.
- Maderey-R LE, Torres-Ruata C (1990) Hidrografía e hidrometría, IV.6.1 (A). Atlas Nacional de México. Vol. II. Escala 1: 4 000 000. Instituto de Geografía, UNAM. México.
- Mc Vaughn R (1989) *Flora Novo-Galiciana Vol. 15 Bromeliaceae to Dioscoreaceae*. University of Michigan: Estados Unidos, 398pp.
- Murawski DA, Hamrick JL (1990) Local genetic and clonal structure in the tropical terrestrial bromeliad, *Aechmea magdalenae*. *Am J Bot* 77: 1201-1208.
- 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.
- Peakall R, Beattie A (1996) Ecological and genetic consequences of pollination by sexual deception in the orchid *Caladenia tentaculata*. *Evolution* 50: 2207-2220.
- Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Mol Ecol Notes* 6: 288-295.
- Pérez N, Piñero D (1997) Isoenzimas. *Bol Soc Bot Mex* 60: 77-84
- Pickett STA, Ostfeld RS, Shackak M, Likens GE (1997) *The ecological basis of conservation: heterogeneity, ecosystems and biodiversity*. Chapman and Hall: Estados Unidos, 466pp.
- Plan de manejo y conservación de tres especies comerciales de bromelias epífitas en los valles centrales de Oaxaca (2007) SIP111. México, 35pp.
- Pulido- Esparza VA, López- Ferrari AR, Espejo- Serna A (2004) Flora bromeliológica del estado de Guerrero, México: riqueza y distribución. *Bol Soc Bot Mex* 75: 55-104.
- Quamaruz- Zaman F, Fay F, Parker JS, Chase MW (1998) Molecular techniques employed in the assessment of genetic diversity: a review focusing on orchid conservation. *Lindleyana* 13: 259- 283.
- Ramírez MI, Carnevali F-C, Chi MF (2004) *Guía ilustrada de las Bromeliaceae de la porción mexicana de la península de Yucatán*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. (CICY): México, 124 pp.
- Raybould AF, Clarke RT, Bond JM, Welters RE, Gliddon CJ (2002) Inferring patterns of dispersal from allele frequency data. En: Bullock J.M., Kenward R. and Hails R. (eds), *Dispersal Ecology*. Blackwell Science, Oxford: Reino Unido.
- Rees JD (1976) The Oaxaca Christmas plant market. *J Brom Soc* 6: 223-232.
- Rossi W, Corrias B, Arduino P, Cianchi R, Bullini L (1992) Gene variation and gene flow in *Orchis morio* (Orchidaceae) from Italy. *Pl Syst Evol* 179: 43-58.
- Sarthou UC, Samadi S, Boisselier-Dubayle M-C (2001) Genetic structure of the saxicole *Pitcairnia geyskesii* (Bromeliaceae) on inselbergs in French Guiana. *Am J Bot* 88: 861–868.

- Shaw CR, Prasad R (1970) Starch gel electrophoresis of enzymes: a compilation of recipes. *Biochem genetics* 4: 297-320.
- Schonewald C, Chambers SM, MacBryde B, Thomas L (2003) *Genetics and conservation: a reference for managing wild animal and plant populations*. The Blackburn press: Estados Unidos, 722 pp.
- Servicio meteorológico nacional (1971-2000) Normales climatológicas en Santa Catarina Ixtepeji, Oaxaca. <http://smn.cna.gob.mx/productos/normales/estacion/oax/NORMAL20040.TXT>
- Smith LB, Downs RJ (1977) *Flora neotropica, Tillandsioideae (Bromeliaceae)*. Hafner Press: Inglaterra, 1492 pp.
- Smouse PE, Peakall R (1999) Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. *Heredity* 82: 561-573.
- Snäll T, Fogelqvist J, Ribeiro PJ, Lascoux M (2004) Spatial genetic structure in two congeneric epiphytes with different dispersal strategies analysed by three different methods. *Mol Ecol* 13: 2109–2119.
- 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.
- Soltis DE, Gilmartin AJ, Rieseberg L, Gardner S (1987) Genetic variation in the epiphytes *Tillandsia ionantha* and *T. recurvata* (Bromeliaceae). *Am J Bot* 74: 531- 537.
- Spielman D, Brook BW, Frankham R (2004) Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *PNAS.*; 101:15261-15264.
- Stoneburner A, Wyatt R, Orzykosky (1991) Application of enzymes electrophoresis to bryophyte systematics and population biology. *Adv. in Bryology* 4: 1-27. En: Lowe A, Harris S, Ashton P (2005) *Ecological genetics: Design, analysis, and application*. Blackwell publishing: Reino Unido 326 pp.
- Subsecretaría de Recursos Naturales (1998) Mapa de suelos dominantes de la República Mexicana. Escala 1:4 000 000. México.
- Sun M (1997) Genetic diversity in three colonizing orchids with contrasting mating systems. *Am J Bot* 84: 224-232.
- Trujillo AS, Del Castillo RF (2003) Electroforesis de proteínas. El rastreo genético de poblaciones y especies. *Conversus* 17: 16-22.
- Vargas CF, Parra-Tabla V, Feinsinger P, Leirana-Alcocer J (2006) Genetic diversity and structure in fragmented population of the tropical orchid *Myrmecophila christinae* var *christinae*. *Biotropica* 38: 754-763.
- Vidal-Zepeda R (1990) Precipitación media anual en Precipitación, IV.4.6. Atlas Nacional de México. Vol II. Escala 1:4 00 000. Instituto de Geografía, UNAM. México.
- Villa GDM (2007) Estudio etnobotánico de las bromelias epífitas en el municipio de Santa Catarina Ixtepeji en la Sierra Norte de Oaxaca. Tesis de Maestría. CIIDIR-IPN- Unidad Oaxaca. Mexico. 119 pp.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.
- Wendel JF, Weeden NF (1989) Visualization and interpretation of plant isozymes. En: Soltis P, Soltis D (eds) *Isozymes in plant biology*. Chapman and Hall: Londres, pp 5-45
- Wikipedia (2007) The free encyclopedia. Wikimedia foundation, Inc. US [http://en.wikipedia.org/wiki/Single\\_nucleotide\\_polymorphism](http://en.wikipedia.org/wiki/Single_nucleotide_polymorphism)
- Zotz G, Andrade JL (2002) La ecología y la fisiología de las epífitas y las hemiepífitas. En: Guariguata MR, Catan GH (eds) *Ecología y conservación de bosques neotropicales*. Libro Universitario Regional: Costa Rica

# Apéndices

## Apéndice I. Soluciones para el teñido de enzimas

### Sistema de histidina

#### 6 - fosfogluconato deshidrogenasa (PGDH) EC 1.1.1.44 (Cheliak y Pitel, 1984)

Ácido 6 fosfogluconico (sal trisódica)	0.01g
NADP	1mL
MTT	1mL
PMS	500µL
Tris HCL 0.2M pH 8.0	5mL
1% MgCl <sub>2</sub>	1mL

Añádase gota por gota al gel.

Incubar en la oscuridad a 37 °C hasta que las bandas azul oscuro aparezcan (aproximadamente 45 min.)

#### Fosfoglucomutasa (PGM) EC 5.4.2.2 (Kress, 1990)

0.1 M Tris-HCl pH 8.0	50mL
α-d-glucosa 1 fosfato (sal disódica)	
SIGMA G-7000	0.05 g
1M MgCl <sub>2</sub>	1mL
NADP	0.005g
MTT	0.01g
PMS	0.005g
Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa	0.1mL

Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente 30-40min.

#### Peroxidasa (PER) EC1.11.1.7 (Murphy *et al.*, 1996)

Diluir 3 amino 9 etil carbazole	0.04g
En N-N-dimetilformamida	2.5mL
Después añadir:	
0.05M acetato de sodio pH 6.5	45mL
Peroxido de hidrógeno al 30%	200µL
Cloruro de calcio 0.1M	1mL

Refrigerar de 30-60min. Utilizar cátodo.

#### Gliceraldehido - 3 fosfato deshidrogenasa (G3PDH<sub>NADP</sub>) EC 1.2.1.9 (Wendel y Weeden, 1989)

0.05M Tris-HCl pH 8.0	50mL
D-fructosa 1-6 difosfato (sal trisódica)	0.1g
Ácido arsénico (sal de sodio)	0.075g
Aldolasa	50 unidades
NBT o MTT 0.01g/mL	1mL
PMS 0.002g/0.4mL	400µL
NADP 0.005g/mL	1mL

Incubar en la oscuridad a 37C.

Nota. Algunos tejidos vegetales son dependientes del NAD y otros del NADP para esta enzima.

### Sistema de borato de litio

#### Aspartato transaminasa (AAT) EC 2.6.1.1 (modificado de Shaw y Prasad, 1970)

Ácido α ketoglutarico	0.035g
Ácido L-aspartico	0.13g
PVP 40T	0.5g
Piridoxal 5 fosfato	0.005g
EDTA tetrasódico	0.05g
Fosfato de sodio monobásico	1.42g



Agua destilada 100mL  
A última hora añadir 0.1g fast blue BB, disolver completamente el pigmento cuidando de no exponerlo a la luz.  
Incubar en la oscuridad a temperatura ambiente 30-40min.

### **Glucosa - 6 - fosfato isomerasa (GPI) EC 5.3.1.9 (González, 2004)**

0.05M Tris-HCl pH 9.0	50mL
Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa de 1000 unidades	15µL diluirlos en 3ml de agua destilada
1 M MgCl <sub>2</sub> ó 10% (0.1M) MgCl <sub>2</sub>	1mL
NADP	1mL
MTT	1mL
PMS	0.5mL

Justo antes de teñir, agregar D fructosa 6 fosfato sal disódica 0.025g.

Incubar en la oscuridad a 37 °C.

Nota: Si el buffer cambia de color de azul a negro al añadir D fructosa 6 fosfato, este último está en mal estado.

### **Preparación de cofactores (Conkle *et al.*, 1982; Cheliak y Pitel, 1984)**

En 1ml de agua destilada agregar:

β-NAD	0.01g
β-NADP	0.01g
NBT	0.01g
MTT	0.01g
PMS	0.005g

### **Solución amortiguadora para extracción (Soltis *et al.*, 1983)**

Tris HCl 0.1M pH7.5	25mL
0.01M EDTA (sal tetrasódica)	0.1g
Cloruro de potasio	0.019g
PVP 40,000	2.5g
Cloruro de magnesio hexahidratado 0.010M	0.05g
*Mercaptoetanol	25µL

\*Se agrega poco antes de macerar.

## Apéndice II. Interpretación genética de los zimogramas en Gliceraldehido - 3 - fosfato deshidrogenasa NADP+ (G3PDH<sub>NADP</sub>, EC 1.2.1.9)

Se exploraron tres distintas interpretaciones genéticas de los zimogramas para *Catopsis berteroniana* basados en la intensidad (aumenta si hay más alelos implicados) y ubicación de la banda así como la presencia de otros alelos (Figura 10- 12). Por ejemplo, para dos alelos, A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub> las variantes genóticas para un heterocigoto tetraploide fueron interpretadas como A<sub>1</sub>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub>, A<sub>1</sub>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub>A<sub>2</sub> o A<sub>1</sub>A<sub>2</sub>A<sub>2</sub>A<sub>2</sub>, así mismo para un individuo heterocigoto hexaploide se interpretó como A<sub>1</sub>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub>, A<sub>1</sub>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub>A<sub>2</sub>, A<sub>1</sub>A<sub>1</sub>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub>A<sub>2</sub>A<sub>2</sub>, A<sub>1</sub>A<sub>1</sub>A<sub>2</sub>A<sub>2</sub>A<sub>2</sub>A<sub>2</sub> o A<sub>1</sub>A<sub>2</sub>A<sub>2</sub>A<sub>2</sub>A<sub>2</sub>A<sub>2</sub> (hexaploides). Lo anterior se hace más complejo entre más alelos se presenten.

Interpretación 1 (Figura 10): G3PDH<sub>NADP</sub> con un locus polimórfico, monomérico, tetraploide y cinco alelos presentes (G3PDH<sub>NADP</sub>-1). Además de dos loci monomórficos (G3PDH<sub>NADP</sub>-2 y G3PDH<sub>NADP</sub>-3). En el locus G3PDH<sub>NADP</sub>-1, por ejemplo, el individuo 1 presentó una única banda que se interpretó como 1111. En el individuo 2 una banda es más intensa que la otra por lo que el genotipo 1115 parecería adecuado. El individuo 3 presentó el genotipo 1245 no obstante, las bandas para el alelo 4 y 5 presentaron una mayor intensidad y por lo tanto la descripción del genotipo no corresponde del todo. En los individuos 4 y 6 no fue posible determinar el cuarto alelo faltante debido a la intensidad de las bandas: el individuo 4 (125?) presentó la misma intensidad en las tres bandas y el individuo 6 presentó una banda poco intensa (3) y dos igualmente intensas (4?, 5?).

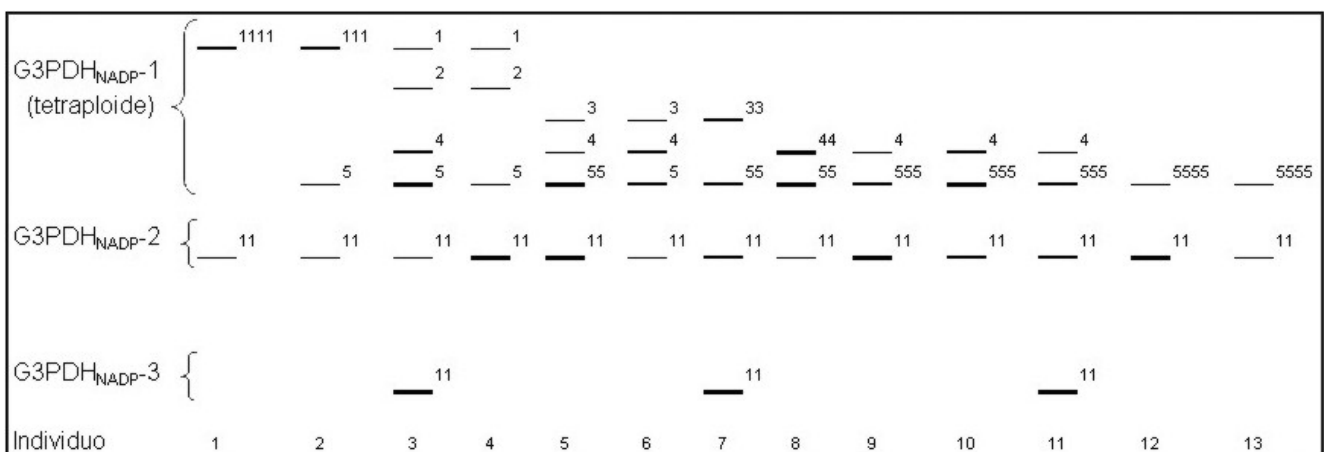


Figura 10. Zimograma correspondiente a la enzima G3PDH<sub>NADP</sub>. Se muestran la interpretación genética de tres loci: G3PDH<sub>NADP</sub>-1 polimórfico tetraploide (cinco alelos) y G3PDH<sub>NADP</sub>-2 y 3 monomórficos para *Catopsis berteroniana* en las poblaciones de estudio (El Cerezal y Reynoso) de Santa Catarina Ixtepeji, Ixtlán, Oaxaca.

Interpretación 2 (Figura 11):  $G3PDH_{NADP}$  con un locus polimórfico, monomérico, hexaploide y cinco alelos presentes ( $G3PDH_{NADP-1}$ ). Además de dos loci monomórficos ( $G3PDH_{NADP-2}$  y  $G3PDH_{NADP-3}$ ). En el locus  $G3PDH_{NADP-1}$ , por ejemplo, el individuo 1 presenta una única banda que se interpreta como 111111. En el individuo 2 una banda es más intensa que la otra por lo que el genotipo 111115 parecería adecuado. El individuo 3 presenta el genotipo 124555 que parecería el más adecuado, no obstante el alelo 4 presenta una banda más intensa que los alelos 1 y 2, por consiguiente no corresponde a la numeración "4". En el individuo 6 no fue posible determinar el cuarto alelo faltante debido a la misma intensidad de las bandas presente en los alelos 44? y 55?

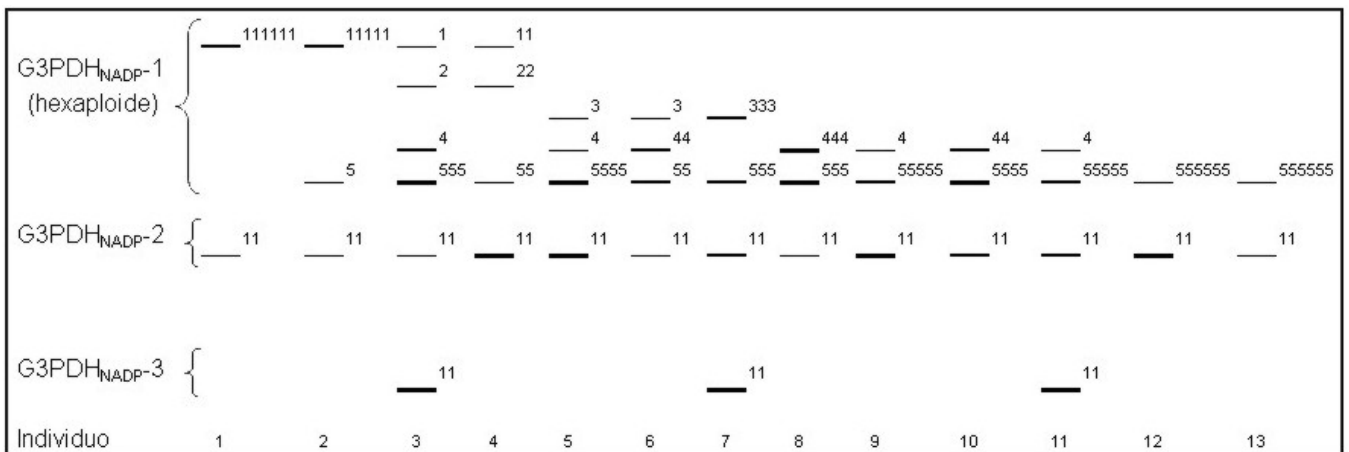


Figura 11. Zimograma correspondiente a la enzima  $G3PDH_{NADP}$ . Se muestran la interpretación genética de tres loci:  $G3PDH_{NADP-1}$  polimórfico hexaploide (cinco alelos) y  $G3PDH_{NADP-2}$  y 3 monomórficos para *Catopsis berteroniana* en las poblaciones de estudio (El Cerezal y Reynoso) de Santa Catarina Ixtepeji, Ixtlán, Oaxaca.

Interpretación 3 (Figura 12):  $G3PDH_{NADP}$  con un locus polimórfico, monomérico, tetraploide y seis alelos presentes ( $G3PDH_{NADP-1}$ ). Además de un locus monomórfico ( $G3PDH_{NADP-2}$ ). En el locus  $G3PDH_{NADP-1}$ , por ejemplo, el individuo 1 presentó dos bandas que se interpretan como 111166. En el individuo 2 una banda es más intensa que las otras dos por lo que el genotipo 111156 parecería adecuado. El individuo 3 presenta el genotipo 124556 que parecería el más adecuado, no obstante el alelo 4 presentó una banda más intensa que los alelos 1, 2 y 6 por consiguiente no corresponde a la numeración “4”. En el individuo 8 y 11, no fue posible determinar el sexto alelo faltante debido a la intensidad de las bandas: el individuo 8 presenta una banda poco intensa (alelo 6) y dos bandas igualmente intensas en los alelos 44? y 55?, no es posible determinar cuál de estos últimos llevaría el alelo faltante; el individuo 11 es un caso parecido, una banda poco intensa alelo 4 y dos bandas igualmente intensas 55? Y 66?

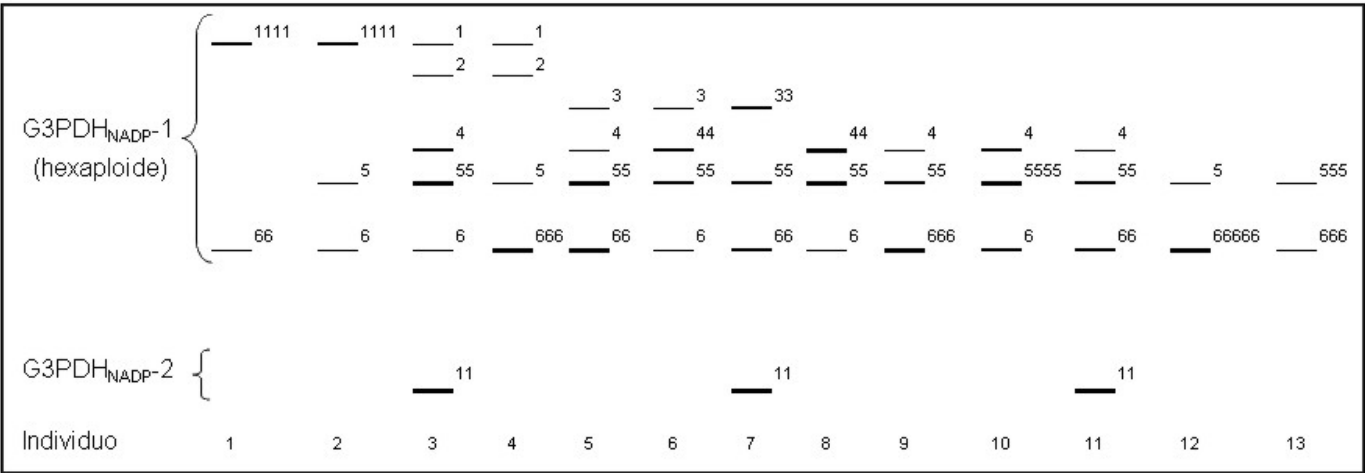


Figura 12. Zimograma correspondiente a la enzima  $G3PDH_{NADP}$ . Se muestra la interpretación genética de dos loci:  $G3PDH_{NADP-1}$  polimórfico hexaploide (seis alelos) y  $G3PDH_{NADP-2}$  monomórfico para *Catopsis berteroniana* en las poblaciones de estudio (El Cerezal y Reynoso) de Santa Catarina Ixtepeji, Ixtlán, Oaxaca.