



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

**COEVOLUCIÓN ENTRE GÉNERO *AGAVE SENSU
LATO* Y SUS MURCIÉLAGOS POLINIZADORES
(PHYLLOSTOMIDAE)**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA AMBIENTAL)**

P R E S E N T A:

BIOL. ILEANA NURI FLORES ABREU

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS

MÉXICO, D.F.

SEPTIEMBRE 2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RECONOCIMIENTOS

Al Posgrado de Ciencias Biológicas de la UNAM.

Al programa de becas nacionales para estudios de posgrado CONACYT

Al programa de becas complementarias de DEGEP, UNAM

Al Proyecto Conacyt SEP-2004-CO1-46475-Q (Conacyt – Fondo sectorial de investigación para la educación) “Diversificación de angiospermas de México: relojes moleculares, tasas de especiación, biomecánica y espacios ecológicos”

A mi comité tutorial:

Dr. Luis E. Eguiarte Fruns, Instituto de Ecología, UNAM.

Dra. Susana Magallón Puebla, Instituto de Biología, UNAM

Dr. Daniel Piñero Dalmau, Instituto de Ecología, UNAM

A los demás miembros del jurado:

Dra. Sara Good-Ávila, K.C. Irving Environmental Center, Acadia University

Dr. Abisaí García Mendoza, Jardín Botánico, UNAM

A los miembros del Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Instituto de Ecología, UNAM, donde se realizó el proyecto.

Especialmente a los técnicos Aldo Valera por enseñarme las técnicas de laboratorio y compartir su experiencia, a Laura Espinosa y Erika Aguirre por su asesoría y ayuda en el trabajo de laboratorio, así como a los Drs. Valeria Souza y Luis Eguiarte por el apoyo que me brindaron en todos los aspectos y por hacer del trabajo algo tan agradable.

Al Dr. Gerardo Salazar, curador del Herbario Nacional, Instituto de Biología, UNAM

Al Dr. Javier Caballero Nieto, director del Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM

Al Dr. Abisaí García Mendoza, por su trabajo en la colección de Agavaceae tanto del herbario como del Jardín Botánico.

Al Dr. Miguel Morales por proporcionarnos el ADN de *L.nivalis*. Laboratorio de Ecología, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UBIPRO

A las doctoras Miriam Ferrer y a Elena Zamlynny por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio de la Dra. Sara Good en el Irving Center, Acadia University.

AGRADECIMIENTOS

A **Ileana**, mi mamá, por su apoyo, confianza e interés. Por compartir conmigo este proyecto, así como todo lo demás, de manera profunda y divertida. Porque los mejores momentos de mi vida los he pasado contigo. Porque tu me enseñaste que lo más importante en la vida es ser feliz y que para eso hay que ser valiente y honesto con uno mismo, que la realidad no existe por si misma sino que es una creación de cada individuo.

A mis **abuelos**, Esperanza Labastida y Rodrigo Abreu por todo el cariño y tiempo que me han dado, por todos los momentos que compartimos y por la comunicación tan cercana que logramos. Porque siempre formarán parte de mí.

A mis tíos **Claudia, Norma, Paty y Rodrigo** Abreu por su apoyo, su cariño y la amistad tan distinta que tengo con cada uno de ustedes.

A mis primos **Macarena, Alejandra y Rodrigo** porque ha sido maravilloso verlos crecer. Ser y hacer lo que les interesa y los haces felices. Porque quiero compartir sus mundos.

A **Yuriria** ... por estar tan lejos y tan cerca. Por los infinitos invisibles, las imágenes, los sonidos, las palabras, las risas, los sueños y los miedos compartidos.

A **Francisco**, por compartir este proyecto como parte del todo. Porque compartimos la vida, por todos los momentos, por la realidad que creamos juntos. Por todas nuestras historias, por **NIA**, por la peli que tenemos pendiente y por tus futuros proyectos. Porque te quiero y confío en que encontraremos la manera de seguir siendo amigos.

A **Daniel** y **Elisa** por todos los momentos acompañados de bebidas, juegos y pláticas que compartimos. A **Rodrigo** por tu energía, alegría y creatividad. Porque me encantaría seguir cerca de ustedes tres.

A **Martha**, por todas las canciones, bailes, confesiones y conversaciones. Por todos los planes que tenemos juntas. Porque siempre me acompañas sin perder la paciencia ni la confianza.

A **Hugo**, porque contigo disfruto más la vida y porque mientras más te conozco más te quiero y admiro. A **Agustina**, por la empatía y la magia que nos une. A **Violeta** por tu cariño, confianza y apoyo. Por el ánimo para que terminara la tesis. A **Marina**, porque disfrutas la vida tanto como yo. Porque seguirás cantando y bailando. Por los viajes en velero que haremos juntas.

A **Patrice**, porque el tiempo y la distancia sólo nos acercan. Porque entre nosotros lo abstracto y lo concreto no son opuestos. A **Montreal**, mi segunda ciudad.

Del Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental:

A **Enrique**, porque compartimos toda la maestría y laboratorio. Porque las clases y salidas de campo fueron más divertidas e interesantes por nuestras discusiones y tu buen humor. A **René** por nuestras pláticas siempre acompañadas de música y películas. Por Bernardo y su papá. A **Germán** por ser de esas casualidades tan improbables, una sorpresa. Por su ironía, sus ideas, su sensibilidad y su manera de comunicarlas. A **Lau** porque esa combinación de brillantez y buen humor que hacen que seas capaz de hacer todo lo que quieres y ser feliz al mismo tiempo. A **Rodrigo** por las salidas al campo y por el viaje a las ballenas. A **Esmeralda, Andrea, Sandra, Eri** y **Jaime** porque sin ustedes mi estancia en el lab no hubiera sido lo mismo.

A **Luis**, por su motivación y dirección del proyecto. Porque siempre tuviste tiempo e interés. Por tu buen humor tu manera de ser.

A **Susana** por su asesoría tan comprometida. Por el tiempo dedicado a discutir sobre las preguntas, los métodos y la interpretación de los resultados que le dan solidez a este trabajo.

A **Sara** por las discusiones científicas, artísticas y personales. Por los momentos que compartimos y que hicieron de mi estancia en Wolfville, Nova Scotia algo inolvidable.

A **CU** por ser el mejor lugar para trabajar, hacer amigos y pasar el tiempo.

A **México**, por su diversidad biológica (sin la cual no existiría este estudio) y cultural que hace de él un país sumamente interesante. Porque aquí está lo que más quiero: mi familia, mi ciudad, mis amigos, la unam, los sabores y las playas de toda mi vida.

A nuestros **antepasados**, que incorporaron a los agaves en su cosmogonía y nos legaron todo su conocimiento e interés por ellos. A **Cornelio**, por darle más sabor al estudio de los agaves.

A los que formaron parte de mi vida y que ahora están lejos física o emocionalmente, porque no los olvido. Si su recuerdo es tan complicado para mí, es porque su existencia marcó la mía, por esto su ausencia es tan dolorosa e incomprensible. Me encantaría re-encontrarme con ustedes si es posible y con quien no lo es, tan sólo quisiera poder recordar lo que fue y todo lo que compartimos sin que me hiciera daño, sin desear que estuvieras aquí y sin preguntarme nada.

Y finalmente, al **AZAR** que siempre está presente.

ÍNDICE

Resumen	1
I. Introducción	3
1. Diversidad de Agaváceas en México	3
2. Potencial radiación adaptativa del género <i>Agave sensu lato</i>	4
2.1 Radiación adaptativa	5
2.1.1 Aproximación filogenética	6
2.1.2. Métodos probabilísticos con modelos de sustitución	6
2.1.3 Estimación de las edades del origen y divergencias de los clados	8
2.1.4 Tasas de especiación en el Tiempo	10
2.2 Antecedentes en <i>Agave sensu lato</i>	13
2.2.1 Distribución de <i>Agave sensu lato</i>	15
2.3 Polinización	19
2.3.1 Polinización en <i>Agave sensu lato</i>	20
2.3.2 Murciélagos Polinizadores: Glossophaginae (Phyllostomidae)	22
II. Justificación	25
III. Hipótesis	26
IV. Objetivos	26
V. Material y Métodos	27
1. Muestreo y materiales utilizados	27
2. Extracción de ADN genómico	28
3. Amplificación los genes de cloroplasto y citocromo <i>b</i>	28
4. Secuenciación de los espaciadores de cloroplasto y citocromo <i>b</i>	32
5. Edición y alineación de las secuencias de ADN	33
6. Selección del modelo de sustitución molecular	34
7. Estimación de las filogenias	34
8. Prueba de la hipótesis del reloj molecular	35
9. Estimación del origen de los clados y sus tiempos de divergencia	36
10. Análisis de la tendencia de las tasas evolutivas en <i>Agave sensu lato</i>	37

VI. Resultados	38
1. Amplificación y secuenciación de los genes de cloroplasto	38
2. Selección del modelo de sustitución molecular	38
3. Estimación de las Filogenias de Agavaceae y Phyllostomidae	40
4. Prueba de la hipótesis del reloj molecular	46
5. Estimación del origen de los clados y sus tiempos de divergencia	46
6. Tendencia de las tasas evolutivas en <i>Agave sensu lato</i>	48
VII. Discusión y Conclusiones	50
1. Filogenia	50
1.1 Muestreo Taxonómico en Agavaceae	50
1.2 Reconstrucción Filogenéticos	51
1.3 Interpretación de la filogenia de Agavaceae	52
1.4 Interpretación de la Filogenia de Phyllostomidae	53
2. Estimación de las Edades en las Filogenias	54
2.1 Comparación de las fechas estimadas entre árboles	55
3. Análisis de las tasas de diversificación	56
4. Correlación con murciélagos polinizadores	58
4.1 Correlaciones temporales	58
4.2 Tipos de polinización en cactáceas columnares y agaves	59
VIII. Conclusiones	62
IX. Apendices	65
X. Bibliografía	69

I. INTRODUCCIÓN

1. Diversidad de Agaváceas en México

México es considerado como un país con una biodiversidad muy alta, que resulta en parte de su gran diversidad de ecosistemas, ya que no sólo cuenta con un gran número de especies distintas a lo largo de todo su territorio, sino que el recambio de estas en poca distancia suele ser muy grande. Por la gran variación en la identidad de las especies que integran cada uno de los distintos tipos de ambientes, las interacciones entre éstas suelen ser muy variables. En particular los ambientes áridos y semiáridos de México poseen una biodiversidad muy alta, la cual en lo que respecta a vegetación tiene un componente importante causado por las familias Cactaceae y Agavaceae. Las plantas pertenecientes a éstas familias son consideradas especies clave de montañas y desiertos mexicanos, tanto por su abundancia como por la cantidad de recursos que producen.

La Familia Agavaceae *sensu stricto* está constituida por 9 géneros (293 spp.) de los cuáles México cuenta con más del 50% de las especies de cada uno de ellos como se muestra en la Tabla 1, modificada de García-Mendoza (1998). Lo que actualmente se maneja como *sensu stricto* hace referencia a conceptos (taxonómicos) clásicos tanto de familias como de géneros, sin embargo hoy sabemos que la familia Agavaceae incluye algunos géneros asiáticos y norteamericanos que no se encuentran en México (ej: *Chlorogalum*, *Hesperocallis*, *Camassia* y *Hosta*, Bogler et al. 2006).

Tabla 1. Distribución de los Miembros de la Familia Agavaceae sensu stricto		
GENEROS	TOTAL SPP.	SPP. EN MÉXICO
<i>Manfreda</i>	28	27 (96%)
<i>Polygonum</i>	13	13 (100%)
<i>Prochlyanthus</i>	1	1 (100%)
<i>Agave</i>	166	125 (75%)
<i>Furcraea</i>	20	11 (55%)
<i>Beschorneria</i>	7	7 (100%)
<i>Yucca</i>	50	30 (60%)
<i>Hesperoyucca</i>	1	1 (100%)
<i>Hesperaloe</i>	3	3 (100%)
Total	289	218 (75%)

2. Potencial Radiación Adaptativa en *Agave sensu lato*

El 74% de la diversidad de Agavaceae se encuentra concentrada en dos géneros: *Yucca* (50 spp) y *Agave sensu stricto* (116 spp), lo cual podría tratarse en ambos casos de radiaciones adaptativas. Ambos géneros presentan un diseño similar (rosetas suculentas de vida larga) pero una estrategia reproductiva contrastante. Las yucas son plantas iteróparas de vida larga con polinización especializada y constituyen uno de los ejemplos clásicos de coevolución estricta con sus polinizadores: diversas especies de polillas del género *Tegeticula* (Pellmyr, 2003). Los agaves son monocápicos y generalistas con un síndrome quiropterofílico (Johnson y Steiner, 2000; Molina-Freaner y Eguiarte, 2003; Rocha et al., 2006). A pesar de solo tener un evento reproductivo por rameto, el geneto de los agaves tiene la oportunidad de reproducirse más de una vez ya que muchos tienen la capacidad de diversas formas de clonación (Gentry, 1982; Eguiarte et al., 2000).

2.1 Radiación Adaptativa

El concepto de radiación adaptativa proviene del campo de la paleontología, propuesto por Fairfield Osborne en 1902 como opuesto a la convergencia evolutiva. Poco después es George Gaylord Simpson (1953) quien propone el término de “innovaciones clave” para las características biológicas capaces de acelerar la diversificación. Estos términos han cambiado muy poco conceptualmente, sin embargo las aproximaciones de estudios se han modificado drásticamente. David Lack (1947) fue quien le dio sentido ecológico al concepto de radiación adaptativa, con su estudio del desplazamiento de caracteres en los pinzones de Darwin. Al comienzo de la discusión contemporánea había al menos dos posturas al respecto: una enfatiza el rápido surgimiento de muchas especies en relación a su grupo hermano (Slowinski y Gruyer, 1994; Sanderson y Donoghue, 1994, 1996; Barraclough et al., 1996; Rhode et al., 1996; Sanderson y Wojciechowski, 1996) y para la otra lo más relevante es la conquista de nuevos nichos enfatizando las adaptaciones (Givinish, 1997). De forma que un rápido incremento en el número de especies sin invasión de nuevos nichos es una radiación no adaptativa.

Recientemente, Schluter (2000) considera que una radiación adaptativa implica la rápida proliferación de especies, mediante la diferenciación de un ancestro en un conjunto de especies que habiten una variedad de ambientes y que difieran en los caracteres (morfo-fisiológicos) utilizados para explotar esos ambientes. De acuerdo con esta definición una radiación adaptativa puede detectarse mediante 4 criterios: ancestría común, correlación fenotipo-ambiente, utilidad del carácter y especiación rápida. Tanto para valorar la ancestría común como la especiación rápida se requiere de un análisis filogenético calculando las tasas de diversificación. Respecto a la correlación fenotipo-ambiente, por lo general la evidencia proviene de observaciones de campo que indiquen que las diferencias fenotípicas de las especies están asociadas con el uso diferencial de recursos u otras características del ambiente. Para probarlo de manera estadística y controlar la no independencia de los atributos que la filogenia puede introducir, se utiliza el método comparativo (Harvey y

Pagel, 1991). Por su parte, la valoración de la utilidad del carácter requiere una aproximación experimental (Givinish, 1997).

2.1.1 Aproximación Filogenética Molecular

Esta es una manera de considerar la historia evolutiva en los estudios adaptativos, que generalmente se quedaban a nivel ecológico, permitiendo el análisis del carácter de interés en un mayor número de especies y en el contexto de su filogenia. Esta aproximación permite detectar especies capaces de proporcionar información relevante para responder nuestras preguntas de manera más profunda. Esto hace posible que el estudio se complemente con trabajos ecológicos de campo y de genética de poblaciones mucho más específicos.

Las filogenias moleculares a nivel de especies proveen de un registro indirecto de los eventos de especiación que han originado las especies actuales, así como del "tempo" (ritmo) de la evolución del grupo (Hillis et al., 1996; Avise, 2000). La información geográfica y los atributos ecológicos de las especies junto con filogenias moleculares ofrecen un enorme potencial para investigar las causas generales de las tasas de especiación dentro de los clados (Brooks y McLennan, 1991; Barraclough et al., 1998; Berlocher, 1998), así como explorar preguntas evolutivas centrales como la variación de las tasas de especiación entre diferentes linajes, tiempo y regiones geográficas (Barraclough y Nee, 2001).

2.1.2. Métodos probabilísticos con Modelos de Substitución

Los métodos para inferir una filogenia se dividen en los de distancia, que la construyen mediante una matriz de distancia generada a partir de los datos empíricos, y los que utilizan directamente la matriz de datos discretos. Una ventaja que proporciona utilizar los caracteres discretos directamente es la posibilidad de estimar los estados de carácter ancestrales. Tanto la Máxima Parsimonia como la

Máxima Verosimilitud y la Inferencia Bayesiana, utilizan la matriz de caracteres discretos. La máxima parsimonia se distingue de todos los demás métodos (incluyendo los de distancia) por no utilizar un modelo de sustitución de nucleótidos explícito. Cuando se pretende reconstruir una filogenia con base en nucleótidos, se utiliza la evidencia actual para llegar a una inferencia acerca de la historia evolutiva de un grupo de organismos o genes (Felsenstein, 1973).

Uno de los argumentos para el uso de modelos es que nos permiten incorporar lo que sabemos, tanto de la filogenia como de los procesos de sustitución (Lewis, 1998). Aunado a esto tienen la ventaja de que los modelos utilizados en la inferencia filogenética se pueden poner a prueba (Goldman, 1993; Penny et al., 1994; Yang et al., 1994) y que son capaces de estimar otros parámetros (como las longitudes de rama) que pueden llegar a ser tan relevantes o aún más que la propia topología del árbol.

Contrariamente a lo que muchas veces se piensa, el uso de modelos nos permite controlar y por lo tanto analizar mejor las variables involucradas. Respecto a la inferencia bayesiana, su adaptación al ámbito de la reconstrucción filogenética consiste en la exploración del universo de árboles mediante cadenas de Markov, en lugar de resolver el algoritmo bayesiano. Esta modificación optimiza el tiempo computacional, al punto de hacerlo sumamente accesible aún para análisis que involucren varios genes con modelos independientes y un gran número de terminales. Posteriormente se calcula la verosimilitud de las filogenias obtenidas incluyendo topología, longitudes de rama y demás parámetros del modelo elegido y los va acumulando en un archivo, por un lado las filogenias estimadas y por otro los valores de los parámetros con su verosimilitud asociada a cada una de ellas. El número de puntos de inicio de búsqueda depende del número de generaciones que se soliciten, mientras que el número de árboles incluidos en el archivo de salida (output) de la frecuencia de muestreo.

2.1.3 Estimación de las edades del origen y divergencias de los clados

Los métodos moleculares de estimación de edades se basan en el hecho de que al paso del tiempo se acumulan diferencias moleculares en las secuencias. La hipótesis del reloj molecular se basa en la Teoría Neutral de la evolución molecular propuesta por Motoo Kimura en 1969, la cual supone que las sustituciones nucleotídicas ocurren de manera constante, de manera que el grado de cambios acumulados entre dos secuencias es directamente proporcional al tiempo desde que se separaron de su ancestro común.

Las mutaciones son modificaciones en el ADN que ocurren al azar, dentro de éstos cambios están las sustituciones de nucleótidos que es precisamente lo que buscan modelar la mayoría de los modelos de reconstrucción filogenética. A pesar de ser un proceso estocástico se sabe que existen sesgos ocasionados principalmente debido a que hay regiones más susceptibles de mutar (hotspots) así como al cociente entre transiciones/transversiones, que por lo general es mayor a uno. Debido a lo anterior se opta por un modelo de sustitución distinto al de Poisson como lo es la distribución gamma. Por esto la selección del modelo de sustitución correcto es crucial para la estimación de tasas y tiempos de divergencia. El modelo debe tomar en cuenta las características relevantes de los datos sin incluir parámetros superfluos, ya que esto reduciría su poder de predicción y generaría excesiva varianza en los parámetros estimados (Zharkikh, 1994; Lewis, 1998; Sanderson, 1998).

La naturaleza de periodicidad estocástica de la sustitución molecular introduce un error inherente (Hillis et al., 1996) que se incrementa cuando las tasas son altas, pero decrece con el aumento de los datos: longitud y número de secuencias (Sanderson, 1998). Uno de los problemas más serios en lo que respecta a la fechación radica en asumir constancia en las tasas de sustitución en ausencia de ésta (Sanderson, 1998), de ahí que la prueba de la hipótesis del reloj molecular resulta crucial para la estimación de edades y tasas.

Mientras la estimación de las longitudes de ramas en una filogenia como el producto de la tasa de sustitución y el tiempo transcurrido no representa un

problema, su estimación independiente si lo es. La separación de la tasa y duración de una rama sólo puede lograrse mediante la incorporación independiente de uno o ambos parámetros. En este estudio, las edades fósiles con las que se calibró la filogenia constituyen esa información independiente del parámetro tiempo. La calibración consiste en asignar una edad absoluta a un nodo para convertir los tiempos de divergencia relativos en unidades absolutas de tiempo (millones de años). La adecuada selección del nodo de calibración es otro punto crítico en la fechación, de ahí que este nodo debe representar una relación filogenética con un buen soporte, es decir presumiblemente correcta. Asimismo la edad asignada al nodo debe tener una alta probabilidad de estar cercana al tiempo real de la separación del linaje. Es posible asignar límites temporales a los nodos, imponiendo límites mínimos y máximos a las posibles edades; esto también sirve para desacoplar el binomio tiempo-tasa, sobretudo en ausencia de reloj molecular. Frecuentemente los límites se asignan como edades mínimas, indicando que la divergencia ocurrió al menos en ese tiempo (Magallón, 2004). Sin embargo también se puede asignar como límite máximo (Sanderson y Doyle, 2001) cuando la edad tiene una alta probabilidad de estar cerca de la edad real del linaje.

El ejemplar fósil a utilizarse puede formar parte del grupo corona o del troncal. El grupo corona consiste en el clado monofilético menos inclusivo que incluya a todos los representantes actuales del clado, más todas las especies extintas que divergieron posteriormente a la divergencia más antigua que origino 2 especies actuales. Por su parte el grupo troncal contiene al grupo corona más todas las especies extintas que se encuentran entre la divergencia del grupo corona y su clado hermano, lo cual se muestra gráficamente en la Figura 1.

Para estimar tiempos de divergencia existen métodos que suponen constancia en las tasas y que consisten en hacer una regresión lineal de distancias moleculares del tiempo transcurrido junto con una optimización de máxima verosimilitud de las edades de los nodos y más recientemente, otros métodos que permiten heterogeneidad entre las tasas (Magallón, 2004), un ejemplo de éstos son los métodos NPRS Non-Parametric Rate Smoothing (Sanderson, 1997) y PL Penalized Likelihood (Sanderson 2002). Sin embargo estimaciones empíricas indican que no se

debe suponer constancia en las tasas sin poner a prueba esta hipótesis. Una vez determinado si los datos se ajustan a un reloj molecular o no, se procede al fechado de la filogenia. Inferir las edades de los clados es complicado, debido a la naturaleza del proceso de sustitución y a las incertidumbres del registro paleontológico.

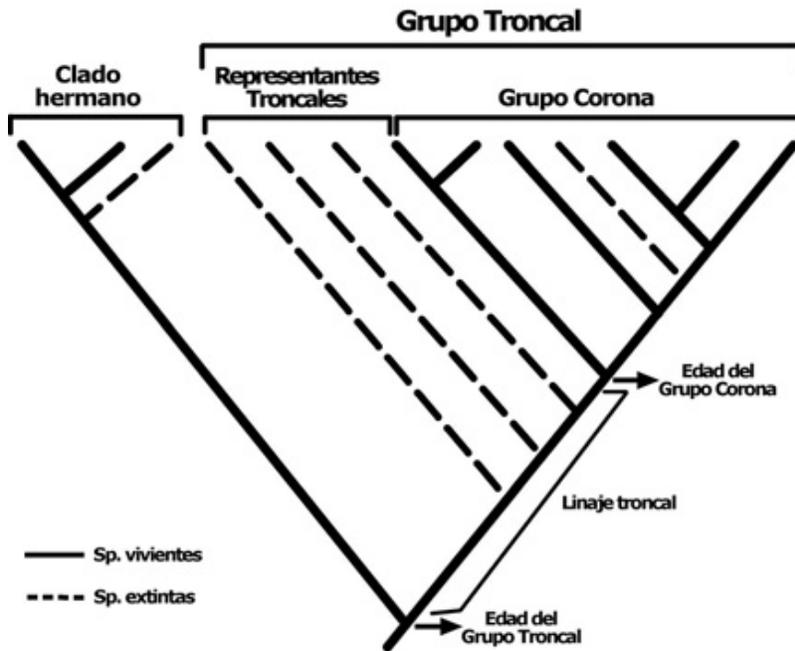


Figura 1. Grupos Troncal y Corona. En esta filogenia hipotética demuestra gráficamente la definición de los grupos troncal y corona. La línea continua representa especies vivientes mientras que la punteada a especies extintas. Figura tomada de Magallón y Sanderson (2001).

2.1.4 Tasas de especiación en el Tiempo

Para el estudio de la variación temporal en las tasas de diversificación se requiere de la estimación de las longitudes de las ramas que se utilizan para estimar el tiempo de los eventos de especiación. Los tiempos de espera entre los eventos de especiación sucesivos se comparan con la distribución esperada bajo un proceso de

ramificación estocástico con tasas constantes en el tiempo (Wollenberg et al., 1996).

El modelo nulo más ampliamente utilizado para el análisis de las tasas de diversificación es el modelo de nacimiento-muerte de Kendall (1948), donde el número de clados crece bajo una tasa constante de especiación y extinción para cada linaje. Se han desarrollado una gran cantidad de estadísticos paramétricos y no paramétricos para evaluar que tanto se aleja la distribución de los nodos internos de una filogenia de un proceso de nacimiento puro, que es un caso especial del modelo de Kendall donde la extinción $\mu = 0$. A pesar de que los métodos de nacimiento puro (γ es el más utilizado) pueden detectar decrementos temporales en las tasas de diversificación, son incapaces de detectar aceleramientos en las tasas (Pybus y Harvey, 2000; Nee, 2001) que es precisamente lo que se espera en una radiación. Otra alternativa es una aproximación mediante pruebas de verosimilitud, que permite preguntar si es más probable que los datos observados se generaran mediante un modelo con una tasa constante o variable temporalmente, sin asumir ninguna parametrización en el modelo mediante la implementación del modelo de nacimiento-muerte (Rabosky, 2006). Esta aproximación tiene la ventaja de que nos proporciona estimados de tiempos y magnitud de los incrementos o decrementos en las tasas, sin embargo para detectar estos cambios se requiere de un tamaño de muestra más o menos grande ($N =$ de 60 a 100 especies) y que la magnitud del cambio sea grande.

Rabosky (2006) propone utilizar los puntos de ramificación de un árbol ultramétrico y probar el ajuste de varios modelos macroevolutivos (e.g., nacimiento-muerte) y estima la tasa de diversificación. Asimismo con LASER (Rabosky 2006) es posible de detectar donde hubo un cambio en la tasa de diversificación en el tiempo. Esto lo hace tomando el vector de los tiempos de ramificación de cada nodo en un árbol ultramétrico y calcula su verosimilitud bajo diferentes modelos de evolución: nacimiento puro y nacimiento muerte bajo una tasa constante RC así como nacimiento puro con 1 o 2 tasas de diversificación (modelos yule 2 o 3), denso-dependientes (nacimiento puro hasta la capacidad de carga K) y nacimiento-muerte con tasas variables RV. Posteriormente compara la verosimilitud de éstos modelos utilizando el criterio de información AIC de Akaike (1973) en lugar de la tradicional

prueba de cociente de verosimilitud (LRT).

El AIC es una función del logaritmo de la verosimilitud y del número de parámetros libres en el modelo:

$$AIC = -2 \log L + 2p$$

donde p es el número de parámetros que son estimados de los datos. Mientras el aumento en el número de parámetros mejora el ajuste del modelo a los datos, también incrementan el término de penalización ($2p$). De ésta manera no sólo es posible evaluar si la tasa de diversificación se ha mantenido constante sino identificar el modelo macroevolutivo que mejor se ajustaba y conocer la magnitud y fecha de los incrementos. Rabosky (2006), basado en análisis de simulaciones, considera que elegir el AIC más pequeño no es suficiente, sino que hay que calcular la diferencia entre los AICs menores estimados para cada uno de los modelos de tasas variables AIC_{RV} y el mejor de tasa constante AIC_{RC}

$$\Delta AIC_{RV} = AIC_{RC} - AIC_{RV}$$

ΔAIC_{RV} es positivo si el modelo que mejor se ajusta implica variación en las tasas, mientras que es negativo cuando lo es uno de tasa constante. El sentido de analizarlo de esta manera es que posibilita identificar una diferencia en los valores de AIC que sea estadísticamente significativa $\alpha \leq 0.05$. El valor de ΔAIC_{RV} que produce una tasa de $\alpha \leq 0.05$ de error tipo 1 corresponde al 95% de la distribución de los valores de ΔAIC_{RV} derivados de las simulaciones de árboles para la estimación del valor crítico específico tomando en cuenta el muestreo para la construcción de la filogenia. Finalmente se estima el valor de $\Delta AIC = AIC$ (menor) – AIC (del modelo en cuestión) para cada modelo evaluado de manera que el modelo con el mejor ajuste (menor valor de AIC) tendrá un $\Delta AIC = 0$ y si la diferencia en la magnitud de ΔAIC del siguiente modelo con mejor ajuste sobrepasa el valor crítico se rechaza.

2.2 Antecedentes en *Agave sensu lato*

Tradicionalmente se distingue el género *Agave* de la tribu *Poliantheae*, que comprende los géneros herbáceos (*Manfreda*, *Polianthes* y *Prochnyanthes*) por tener hojas fibrosas suculentas de vida larga mientras que los otros tienen hojas de cartáceas (delgadas como papel) a poco suculentas y son estacionales. En la Tabla 2, construida a partir de la clave de Verhoek (1975), se muestran las características diagnósticas de estos dos grupos.

Tabla 2. Caracteres diagnósticos de <i>Agave</i>		
Estado de Caracter	<i>Agave sensu stricto</i>	Agaves Herbáceos
Tipo de hojas	Gruesas - Fibrosas	Cartáceas
Duración de las hojas	Vida larga	Estacionales
Capas de endotecio	3 – 6	2 – 3
Tubérculo	Ausente	Presente

Cabe destacar que el género *Agave sensu stricto* es de suma importancia nacional, tanto cultural como económicamente. Las plantas pertenecientes a este género se han utilizado por parte de las diversas culturas mesoamericanas. El maguey constituyó una deidad conocida como Mayahuel, diosa madre de muchos dioses de la embriaguez, representada en múltiples códices. El uso del maguey y aguamiel, a los cuales se les atribuye un origen divino, estaba ligado a eventos rituales. Actualmente sus bebidas alimenticias son una importante fuente nutricional para muchas etnias. Asimismo se utiliza para la elaboración de diversos platillos tradicionales. Su importancia económica para el país radica en el tequila y mezcal a partir de un gran número de especies, así como por la extracción de fibras de henequén a partir de *A. fourcroydes* y otras especies.

Por su parte *Agave sensu stricto* se divide en dos subgéneros de acuerdo al tipo de su inflorescencia: *Littaea* (espigada) y *Agave* (paniculada). A su vez cada uno de estos subgéneros tiene varios grupos morfológicos. A pesar de lo mencionado anteriormente, estudios tanto morfológicos (Hernández, 1995) como moleculares (Eguiarte et al., 2000; Bogler y Simpson, 1996; Good-Avila et al., 2006) recientes

muestran que los géneros *Agave sensu stricto*, *Manfreda*, *Polianthes* y *Prochnyanthes* constituyen un grupo monofilético de 208 spp conocido como *Agave sensu lato*, del cual México cuenta con un 80% de las especies. Las relaciones al interior de cada uno de estos grupos no han podido resolverse, debido a que existe muy poca variación entre especies, sugiriendo una posible diversificación reciente.

Análisis moleculares de las tasas de diversificación de *Agave sensu lato* sugieren dos momentos de especiación acelerada (Good-Avila et al., 2006), uno entre 8-6 MA y el más reciente 3-2.5 MA. El primero podría estar asociado a la desertificación de Norteamérica que comenzó alrededor de hace 8-15 MA (Axelrod, 1979) acoplado a innovaciones clave (e.g., rosetas con hojas fibrosas y suculentas), intensificado por deriva génica, como en el caso de la radiación de las Aizoaceae en Sudáfrica (Klark, 2004). El surgimiento de innovaciones clave en ese contexto específico, es decir en ese nuevo ambiente y en combinación con otros caracteres ya presentes en este grupo (De Queiroz, 2002) pudo conferirles ventajas adaptativas muy grandes. Los caracteres clave podrían ser adaptaciones morfofisiológicas como hojas en roseta, así como raíces muy extendidas y superficiales que permiten una captura muy eficiente de agua (Gentry, 1982), de ahí que *Agave sensu stricto* sea considerado el género más tolerante a condiciones áridas dentro de la familia (Nobel, 1988). Por su parte, todas los integrantes de *Manfreda*, *Polianthes* y *Prochnyanthes* podrían constituir otra radiación que les permitió invadir ambientes más húmedos; sin embargo debido a que Good-Avila et al. (2006) no incluyó suficientes representantes herbáceos no fue posible detectar su diversificación.

De Queiroz (2002) propone que los factores que pueden influenciar la manera en que un carácter clave afecta la diversidad pueden categorizarse en tres clases: A) por su interacción con otros taxa, B) por la interacción con otros caracteres del mismo organismo y C) por el ambiente físico. Respecto a la primera clase, la estrategia monocárpica pudo permitirles la entrada a una nueva zona adaptativa inaccesible a los otros miembros de su comunidad. Este tipo de reproducción pudo ser seleccionada por sus murciélagos polinizadores, debido a que el esfuerzo

requerido para satisfacer las necesidades nutricionales de estos animales es muy alto. Con base al elevado requerimiento nutricional de estos polinizadores, se ha propuesto la existencia de una correlación positiva entre la producción de néctar y la altura de la inflorescencia con la polinización por murciélagos (Howell y Roth, 1981). Estudios teóricos y empíricos coinciden en que esta estrategia reproductiva tiende a surgir en ambientes con una alta heterogeneidad donde el éxito reproductivo es poco frecuente y está correlacionado positivamente con el esfuerzo reproductivo (Young y Augspurger, 1991). Se sabe que el surgimiento de la estrategia monocárpica esta relacionado con radiaciones impresionantes en plantas de climas áridos y relativamente aislados como es el caso de las espeletias andinas (Rauscher 2002), las silversword en Hawaii (Baldwin y Sanderson, 1998), las lobelias gigantes y los dendrosenecios de África (Knox y Palmer 1995).

La polinización por murciélagos para especies del género *Agave sensu lato* no está sugerida únicamente por su fenotipo floral, cantidad de néctar y concentración de azúcar en éste (quiropterofilia), sino que en muchos casos está documentada por observaciones y experimentos de campo (Arizaga et al., 2000; Eguiarte, 2000; Molina-Freaner y Eguiarte, 2003; Rocha et al., 2006 y Trejo, 2007). De los murciélagos, las tres especies del género *Leptonycteris* se alimentan básicamente del néctar y polen de cactáceas columnares y agaves (Arita y Humphrey, 1988; Rojas-Martínez et al., 1999; Cole y Wilson, 2006).

2.2.1 Distribución de *Agave sensu lato*

Del 75% de las especies que se encuentran en México de *Agave sensu stricto*, 68% es microendémico lo que implica que se encuentra en menos del 3% de su área de distribución que es menor a 30,000 km² (García-Mendoza, 2002). Un aspecto muy interesante de su distribución es que la mayoría de las especies tienen áreas de distribución restringidas y se encuentran únicamente en unos pocos hábitats y rangos montañosos. Las especies se encuentran en ambientes muy diversos. Son

abundantes en bosque tropical deciduo, matorral xerófito, pastizal, desierto y chaparral. La mayor diversidad y densidad poblacional (68% de las especies mexicanas) se encuentra en comunidades que se destacan por ser calidas y secas. El 30 % restante se encuentra en bosques de pino-encino. Por su parte son escasos (4 spp.) en selvas así como en bosque tropical en el sur del país, que se caracteriza por alta humedad y neblina todo el año. Se encuentran desde el nivel del mar hasta 3400 m, más comúnmente entre 1000-2000 m. Crecen preferentemente en suelo de roca ígnea ácida, volcánica y caliza (García-Mendoza, 2002).

La mayor diversidad de *Agave* ocurre en el centro de México. En primer lugar destaca el Valle de Tehuacan-Cuicatlan en el límite entre Puebla y Oaxaca con un mosaico de ambientes (bosque tropical deciduo, matorral xerófito y chaparral) de clima semiárido (precipitación anual de 400 mm), todos ellos constituidos por comunidades ricas en plantas suculentas, espinosas y en forma de roseta. En segundo lugar se encuentra el Noroeste de la Sierra Madre Occidental entre Sonora, Chihuahua y Sinaloa, área caracterizada por bosque de coníferas. El tercer lugar en diversidad lo ocupa el Desierto Chihuahuense en el Noreste de México. Éste se localiza entre San Luis Potosí, Nuevo León y Tamaulipas, constituida por desierto y chaparral caracterizados por un clima sumamente árido (<400 mm precipitación anual) con altas temperaturas en verano.

Otras áreas con diversidad considerable se encuentran en la Barraca de Meztitlán; Hidalgo, Baja California Sur, Coahuila, Michoacán, Chiapas y el Estado de México (García-Mendoza, 2002).

Si en lugar de considerar los límites políticos, analizamos su distribución de acuerdo a provincias biogeográficas resulta que Mega México 3 (Rzedowski, 1993) que va de EUA hasta Nicaragua, cuenta con el 78% de las especies, casi todas endémicas. Asimismo se encuentran especies de *Agave* s.s en todas las islas del Caribe (Las Antillas, Bahamas, Aruba, Curaçao, Trinidad y Tobago) al igual que en centro América y el Norte de Sudamérica: Colombia, Perú y Venezuela (García-Mendoza, 2002). Respecto a la distribución de los agaves herbáceos, estos son en su mayoría mexicanos, exceptuando unas pocas Manfredas que se encuentran en el

sureste de EUA y las de Centroamérica. El resto de las especies de *Manfreda* están distribuidas en toda la república mexicana excepto en las penínsulas de Baja California y de Yucatán. Por su parte *Polianthes* (principalmente en Jalisco) y *Prochnyanthes mexicana* (que va de Durango y Nayarit a Michoacán) son géneros endémicos de México (Rocha et al., 2006).

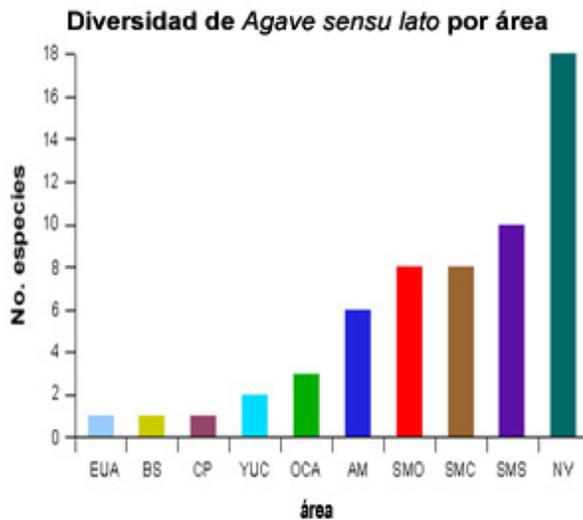
En el estudio de una radiación adaptativa el espacio físico donde se han venido dando los eventos de especiación y extinción es un factor de suma importancia, de ahí el interés en el análisis de su historia biogeográfica. Las propiedades actuales de las comunidades reflejan los orígenes filogenéticos de los taxa que contienen, así como los eventos únicos y circunstancias geográficas que ocurrieron durante su formación. Recientemente se han desarrollado métodos que al igual que DIVA (Ronquist 1996; 1997) buscan inferir la historia geográfica de los linajes, pero que a diferencia de éste incorporan información independiente a la filogenia como puede ser, fechas y tiempos de conexiones entre áreas, así como otras oportunidades de dispersión entre éstas junto con los tiempos de divergencia de los linajes (Donoghue y Moore, 2003; Weins y Donoghue, 2004; Ree et al., 2005).

El siguiente paso del proyecto será precisamente analizar su historia biogeográfica con uno de éstos métodos para lo cual se requiere asignar una área de distribución actual a cada una de las especies utilizadas para construir la filogenia fechada. Para esto utilizamos las áreas fisiográficas de la República Mexicana que se observan en la Figura 2 A y asignamos a cada una de las especies de *Agave sensu lato* todas las áreas en que se encontraran presentes actualmente. Cómo se puede observar en 2 B el Eje Neovolcánico contiene la mayor diversidad seguido por las Sierras Madre del Sur, Occidental y Oriental. En 2 C se muestra lo mismo desde el punto de vista de las especies, la mayoría de ellas se encuentra en menos de 6 áreas. A pesar de que no incluimos a todas las especies de *Agave sensu stricto*, sino que fue un muestreo, de éste junto con la misma proporción de los géneros herbáceos pertenecientes a *Agave sensu lato*, los resultados concuerdan en que la mayoría de las especies son endémicas y que la mayor diversidad de especies se encuentra concentrada en el centro de la República Mexicana.

A



B



C

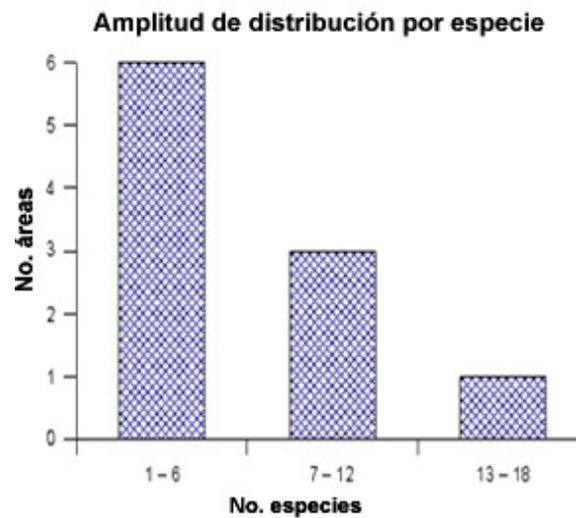


Figura 2. A. Áreas Fisiográficas de México. Las iniciales significan: EUA Estados Unidos de América, BS Península de Baja California y Sonora, CP costa del Pacífico, SMC Sierra Madre Occidental, SMS Sierra Madre del Sur, SMO Sierra Madre Oriental, YUC península de Yucatán, AM Altiplano Mexicano, NV Eje Neovolcánico, OCA occidente de Centroamérica. En **B** se muestra que la el Eje Neovolcánico cuenta con la mayor diversidad seguido de la SMS y en **C** se muestra que la mayoría de las especies se encuentran en una sola área (dist. Restringida), mientras que únicamente una especie se encuentra en 8 áreas. En las Tablas 1 y 2 del apéndice de distribución se encuentra toda esta información detallada.

2.3 Polinización

La polinización mediada por animales constituye una de las interacciones mutualistas dominantes en hábitats terrestres, posiblemente tan ubicua como las micorrizas (Waser, 2006). A pesar de que los términos especialista y generalista sugieren una dicotomía, en realidad son dos extremos de un continuo en el uso de un recurso o amplitud del nicho. El concepto de síndrome de polinización lo debemos a los antiguos naturalistas, sin embargo éste se ha ido modificando (evitando interpretaciones teleológicas) y enriqueciendo. Faegri y Van der Pijl (1979), con base en otros estudios (principalmente el de Vogel 1954) proponen diversos tipos florales de acuerdo a su recompensa, forma, color, olor y otras características fenotípicas. Actualmente sabemos que los síndromes de polinización representan convergencias adaptativas entre especies no emparentadas para polinizadores particulares.

Actualmente se ha visto que en la gran mayoría de estudios de campo detallados se encuentran más de un tipo de polinizadores. Por un lado la visión del ecólogo (postura empírica, ya que propone conceptos de acuerdo a sus observaciones de campo) sugiere generalización, sin embargo quienes intentan buscar patrones (visión sistemática que busca que los conceptos construidos a priori concuerden con la naturaleza) e imponer orden a toda la diversidad proponen que la especialización es la norma (Waser, 2006). Los que buscan patrones consideran que a pesar de que observemos varios tipos de visitantes en las flores, el único polinizador importante es el más efectivo y que de hecho la mayoría de los demás visitantes ni siquiera polinizan. Muchas veces los resultados que encontramos dependen de la pregunta que nos hagamos y de cómo la abordamos. Anteriormente la mayoría de los estudios ecológicos se concentraban en una pareja mutualista, mientras que a la fecha se ha intentado hacerlo a nivel comunidad, utilizando teoría de redes tróficas. Las redes de polinización estudiadas muestran asimetría, es decir que polinizadores especialistas visitan plantas generalistas y que las plantas especialistas son visitadas muchas veces por animales generalistas, lo cual muestra una realidad muy distinta a la concepción tradicional de especialistas coevolucionados.

2.3.1 Polinización en *Agave sensu lato*

Agave sensu lato presenta un síndrome de polinización considerado como quiropterofílico (Slauson, 2001) el cual se caracteriza por flores que van de blanco a amarillo o verde pálido, dehiscencia de anteras y producción nocturna de un néctar diluido. Se ha propuesto que este síndrome constituye un sistema abierto de polinización, es decir que permite la visita efectiva (para ambos interactuantes) de otro tipo de polinizadores como son aves (principalmente colibríes) e insectos nocturnos (principalmente, esfíngidos). Gentry (1982) propuso que el subgénero *Littaea* es polinizado por insectos principalmente, con base en el pequeño tamaño de las flores, menor volumen de néctar y bajo contenido proteico en el polen (Howell, 1972).

Considerando el número total de especies o simplemente el número de grupos morfológicos de *Agave*, existen pocos estudios de polinización, sin embargo las especies en que se han realizado se observaron varios tipos de polinizadores. Los primeros estudios fueron realizados en especies que se presentan en el límite norte de la distribución del género *Agave*, la cual muchas veces para sus murciélagos polinizadores implica que están fuera de su rango. Dentro de las especies estudiadas con distribución más nórdica destacan: *A. mackelveyana* (Sutherland, 1987), *A. chrysantha* (Slauson, 2000), *A. parviflora* (Slauson, 2001), *A. schottii*, *A. shawii* (Slauson, 2000), *A. deserti* (Fulton, 1983) y *A. havardiana* (Kuban, 1989), la mayoría presenta un síndrome quiropterofílico pero su éxito reproductivo no depende exclusivamente de los murciélagos.

Agave angustifolia junto con *A. cerulata*, *A. lechuguilla* y *A. scabra* resaltan por tener una distribución amplia, así como poblaciones con un gran número de individuos. Por otro lado *A. subsimplex*, como la mayoría de los agaves, presenta una distribución muy localizada, en las regiones costeras del centro de Sonora e Isla Tiburón (Molina-Freaner y Eguiarte, 2003). Mientras *A. angustifolia* es polinizado principalmente por *Leptonycteris yerbabuena*, *A. subsimplex* (igualmente especie auto-incompatible y con concentración de néctar similar) lo es tanto por *L. yerbabuena* y varias polillas como por *Apis mellifera*.

En estudios poblacionales intensivos de *A. lechuguilla* (Silva-Montellano, 2001; Silva-Montellano y Eguiarte, 2003; Cadaval-Narezo, 1999) encontraron que el volumen del néctar decrece latitudinalmente, la coloración y la forma de las flores son polimórficas, en el norte la corola es roja, más corta y abierta mientras que hacia el sur es verde pálido. Esta adaptación local a distintos tipos de polinizadores correlaciona con una tasa de entrecruzamiento mayor en el sur, intermedia en poblaciones centrales y baja en el norte. Por su parte *A. marmorata* es visitado preferencialmente por aves percheras y colibríes, así como por *Choeronycteris mexicana* y *L. nivalis* (Ornelas et al., 2002) sin embargo siempre se detectaron otros visitantes.

Un estudio detallado de 6 especies simpátricas del cañón de Meztitlán, que es una de las regiones con mayor riqueza en México, sugiere que *L. yerbabuena*, *Glossophaga* y *Ch. mexicana* son importantes polinizadores (González, 2004; Rocha et al., 2006; Trejo, 2007). Estas especies, a pesar de ser simpátricas a nivel regional, se encuentran en distintos micro-hábitats y presentan distintas fenologías. Otras especies de *Agave* que además de su síndrome quiropterofílico se tienen reportes de visitas de murciélagos son *A. angustifolia* (Van der Pijl, 1936) con una distribución muy amplia básicamente en la república mexicana y suroeste de EUA, *A. macroacantha* (Arizaga, 2000) en el centro sur de México y *A. palmeri* en el sur de EUA (Howell, 1972; Howell y Roth, 1981) en los cuales *Choeronycteris mexicana* y *L. yerbabuena* respectivamente son sus polinizadores principales. Asimismo en *Manfreda brachystachya* los principales polinizadores son dos especies de murciélagos nectarívoros: *L. yerbabuena* y *Anoura geoffroyi* (Eguiarte y Búrquez, 1987,1988). Este esquema implicaría adaptación mutua entre pocas especies de murciélagos a un gran número de especies de *Agave*, así como su interacción con otros polinizadores.

2.3.2 Murciélagos polinizadores: Glossophaginae (Phyllostomidae)

Los murciélagos (orden Chiroptera) son el grupo dominante de mamíferos en la mayoría de las tierras bajas de bosques neotropicales, tanto por su abundancia como por diversidad de especies (Emmons, 1997). En el Viejo Mundo una docena de especies pertenecientes a Macroglossinae presentan diversos grados de adaptación a una dieta basada en productos florales. En América existen 30 especies con adaptaciones similares, todas ellas pertenecientes a la familia Phyllostomidae, una familia muy diversa (49 géneros y >140spp.) y endémica del Nuevo Mundo (Koopman, 1993; Wetterer et al., 2000). Además del gran número de especies, esta familia neotropical presenta una gran diversidad de hábitos alimenticios: insectos, peces y otros pequeños vertebrados, néctar, polen, frutas y sangre. Estudios filogenéticos encuentran que se forman clados independientes para cada tipo de dieta; es decir que las especializaciones correspondientes han evolucionado una única vez, sin embargo si han ocurrido reversiones (pérdida del hábito nectarívoro y polínívoro en muchos *Phyllostominae* y *Stenodermatinae*) y algunas especializaciones (e.j., carnivoría) han evolucionado más de una vez (Wetterer et al., 2000). El mapeo y optimización de su dieta sobre un árbol filogenético indica que el ancestro de la familia era predominantemente insectívoro y de ahí los clados tempranamente divergentes pasaron a ser por un lado hematófagos o carnívoros, mientras que los más derivados constituyen dos clados, uno insectívoro y otro predominantemente vegetariano con 2 subclados, uno nectarívoro y el otro frugívoro (Wetterer et al., 2000).

México cuenta con 12 especies nectarívoras: *Anoura geoffroyi*, *Choeroniscus godmani*, *Choeronycteris mexicana*, *Glossophaga soricina*, *G.morenoi*, *G.comissarisi*, *G.leachii*, *Hyalonycteris underwoodi*, *Leptonycteris nivalis*, *L.yerbabuena*, *Linchonycteris obscura* y *Musonycteris harrisoni*, la mayoría de los cuales está asociado a zonas áridas tropicales y subtropicales (Santos y Arita, 2002). Asimismo las plantas de las que se alimentan también presentan adaptaciones a ser polinizadas por murciélagos, lo que se conoce como flores con síndrome quiropterofílico. La mayoría de éstas presentan antésis nocturna, olor almizclero y

producen grandes cantidades de néctar (Faegri y van der Pijl, 1979), y muchas veces su polen contiene una concentración proteica mucho mayor así como aminoácidos esenciales para los murciélagos (Howell, 1974; Arita y Martínez del Río, 1990). Como sucede con los síndromes de polinización de las flores, la dieta en los murciélagos no es absoluta-restrictiva, es decir que el que predomine un tipo de alimentación no implica que el animal no se alimente de otras cosas. Su dieta muchas veces es complementaria y predomina una sobre otra dependiendo el grupo, época del año y lugar donde se encuentre dentro de su área de distribución.

El origen de la dieta predominantemente frugívora o nectarívora se ha explicado mediante la hipótesis de la "fuente alimenticia dual" (Gillette, 1975), la cual considera que de una condición insectívora generalista, evolucionaron a una condición especialista insectívora, buscando insectos en frutas o flores. En algún momento cambiaron a usar el substrato (material vegetal) como fuente de alimento junto con los insectos de los que se alimentaban originalmente, pasando a depender en un fuente alimenticia dual. La culminación de esta tendencia evolutiva involucró la explotación única de la fuente alternativa de alimento, la planta en este caso. Específicamente el hábito nectarívoro predominante se asocia al grupo *Hirustaglossa* que agrupa a dos subfamilias: *Phyllonycterinae* y *Glossophaginae*, esta última constituida por dos tribus (polinívora y nectarívoras igualmente: *Lonchophyllini* y *Glossophagini*. Las especies que se alimentan de *Agave sensu lato* y cactáceas columnares durante su paso por desiertos y montañas mexicanas pertenecen a la tribu *Glossophagini* formado por 10 géneros: *Glossophaga*, *Monophyllus*, *Leptonycteris*, *Anoura*, *Hyalonycteris*, *Linchonycteris*, *Scleronycteris*, *Choeronyctus*, *Choeronycteris* y *Musonycteris*. Estos géneros en su mayoría tienen representantes en México, a excepción de dos géneros con dos y una especie respectivamente, *Monophyllus* de las Antillas y *Scleronycteris ega* presente únicamente en el noreste de Brasil y sur de Venezuela. En un análisis tipo "agrupamiento jerárquico" de las dietas de 16 spp de murciélagos nectarívoros de las zonas áridas neotropicales donde se evaluó la importancia relativa de cactáceas y agaves respecto a otras plantas encontraron que las especies *L. curasoae*, *L. yerbabuena*, *L. nivalis* y *Choeronycteris mexicana* son las más especializadas en alimentarse de néctar y

polen de agaves y cactus columnares en las zonas áridas de Norteamérica (Arizmendi, 2002). Mientras *L. yerbabuena* se distribuye desde Arizona y Nuevo México (en la Figura 3 se muestran sus sitios de apareamiento y maternidad) hasta el noreste de Guatemala y *L. curasoae* en Colombia, Venezuela y las islas del Caribe, ambas abundantes en zonas áridas. *L. nivalis* es una especie rara desde Texas hasta Guatemala y se encuentra sobretodo en bosque de pino-encino.



Figura 3. Refugios de apareamiento y de maternidad de *Leptonycteris yerbabuena*.
Figura modificada de Fleming y Nassar 2002

Por su parte *Choeronycteris mexicana* es poco abundante desde el suroeste de EUA hasta Guatemala. Respecto a las dos especies de *Glossophaga* presentes en México (*G. soricina* desde el Norte de México hasta el norte de Argentina y *G. leachii* únicamente en Centroamérica) se alimentan de árboles tropicales básicamente, sin embargo *G. longirostris* (ausente en México) se alimenta de cactus, agaves y ceibas en Colombia y Venezuela (Arizmendi, 2002). *Anoura geoffroyi* es abundante en bosque húmedo de altura y a pesar de ser predominantemente insectívoro, complementa su dieta con polen y néctar tanto de árboles como de las especies de agaves ahí presentes (Arizmendi, 2002).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestreo y materiales utilizados

El objetivo del muestreo en Agavaceae fue representar la diversidad morfológica, ecológica y taxonómica de *Agave sensu lato* así como incluir miembros de *Furcraea-Beschorneria*, su grupo hermano y demás géneros de la familia Agavaceae. Asimismo se incluyó a un representante de la familia Anthericaceae (*Chlorophytum comosum*) que se ha propuesto como grupo hermano de la familia Agavaceae. En la Tabla 1 se muestran todos los representantes utilizados de los diversos grupos morfológicos propuestos por Gentry (1982) para *Agave sensu stricto*, en la Tabla 2 los representantes herbáceos de *Agave sensu lato* (*Manfreda*, *Polianthes* y *Prochnyanthes*) y en la Tabla 3 se encuentran las especies que conformaron el grupo externo. Por su parte respecto a los murciélagos se buscó incluir el mayor número posible de especies pertenecientes a Glossophaginae, así como especies representativas de los diversos géneros de Phyllostomidae incluyendo a *Pteronotus*, *Furipterus*, *Myotis*, *Natalus* y *Thyroptera* como grupos más externos debido a que se contaba con información fósil.

Para este trabajo se utilizaron para los representantes de Agavaceae tanto ejemplares frescos, congelados y herborizados, éstos últimos pertenecientes a la colección del Herbario Nacional; mientras que todas las secuencias de los murciélagos se obtuvieron de Genbank a excepción de *L. nivalis* que se secuenció en el laboratorio.

En el Apéndice de Distribución se encuentra la ubicación geográfica y tipo de hábitat de cada una de las especies de *Agave sensu lato* utilizadas, así como la información de colecta de las herborizadas.

2. Extracción de ADN genómico

La extracción del ADN de todos los ejemplares vegetales se realizó mediante el protocolo de Mini-Prep (Tabla 4), con la única diferencia de que los tejidos frescos fueron molidos en mortero y los herborizados en tubos “ependorff”, debido a que se contaba con menor cantidad de tejido para estos últimos. El ejemplar de *L. nivalis* (proporcionado por Miguel Morales) se extrajo con el kit Quiagen. Una vez obtenido el “pellet” seco de ADN se adicionaron 100 μ l de agua ultra pura y se dejaron a resuspender mínimo por 12 hrs. previas a ser utilizadas para la amplificación de los genes de interés.

3. Amplificación de los genes de cloroplasto y citocromo *b*

El ADN obtenido tanto de muestras frescas como congeladas (Revco -80 °C) resultó en una banda intensa y bien definida al ser corrida en un gel de agarosa al 1%, por lo que se utilizó directamente en las reacciones de PCR. Por el contrario, el extraído de ejemplares herborizados resultó en un barrido (i.e., ADN degradado y sucio) o en la ausencia de banda y siempre requirió diluirse antes para su amplificación. El grado de dilución (1-1, 1-10, 1-100, 1-1000) fue muy variable, dependiendo tanto de la especie como del fragmento a amplificar, en algunos casos incluso se requirió diluir al punto de no observar banda alguna en el gel para que la PCR funcionara.

Los reactivos, concentración y volumen utilizados por cada primer (Tabla 5) para la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se muestran en la Tabla 6. La secuencia de los tres primeros primers fue proporcionada por Jim Leebens-Mack quien los modificó para agaváceas, mientras que tanto *trnD-trnT* (Shaw et al. 2005) y los del citocromo *b* (Steppan et al., 1999) se tomaron de la literatura y se sintetizaron en el IBT UNAM. Todas las reacciones se hicieron con Taq polimerasa (Roche o

Amplicasa, Biogenica) con su respectivo buffer.

Tabla 1. Muestreo género <i>Agave sensu stricto</i>			
Subgénero <i>Littaea</i>			
<i>Littaea</i>	no. especies	Especie	%
Marginatae	18	<i>A.lechuguilla</i> <i>A.victoria-reginae</i> <i>A.garcia-mendozae</i>	17
Filiferae	5	<i>A.schidigera</i>	20
Parviflorae	4	No MEX	0
Polycephalae	6	<i>A. celsii</i>	17
Urceolatae	1	No MEX	0
Striatae	6	<i>A.striata</i> <i>A.petrophila</i>	33
Amolae	8	<i>A.vilmoriniana</i>	13
Choritepalae	3	<i>A.guengola</i>	33
Total	51	9 spp.	18
Subgénero <i>Agave</i>			
<i>Agave</i>	no. especies	Especie	%
Americanae	8	No ADN	0
Campaniflorae	5	No MEX	0
Ditepalae	12	No ADN	0
Hiemiflorae	12	<i>A.potatorum</i>	8
Crenatae	7	<i>A.inaequidens</i> <i>A.cupreta</i>	29
Deserticolae	10	<i>A. deserti</i>	10
Marmoratae	4	No ADN	0
Parryanae	5	No ADN	0
Rigidae	12	<i>A.angustifolia</i> <i>A.fourcroydes</i>	8
Salamianae	5	No ADN	0
Umbelliflorae	2	No MEX	0
Total continentales	83	7 spp.	8.4
Total isleñas	43 en 6 gpos.	0	0
TOTAL	177	14	8
TOTAL México	123	15	12

Tabla 2. Grupos herbáceos: <i>Agave sensu lato</i> (Tribu Poliantheae)			
Subgénero <i>Manfreda</i>			
Grupo Morfológico	No. Especies	Especies utilizadas	%
Brunnea	7	-	0
Scabra	10	<i>M.revoluta</i> , <i>M.jaliscana</i> , <i>M.pubscens</i> , <i>M.maculata</i>	40
Guttata	8	<i>M.guttata</i> , <i>M.fusca</i> , <i>M.pringlei</i>	38
Virginica	1	<i>M.virginica</i>	100
TOTAL	28	8	28.6
Subgénero <i>Polianthes</i>			
Grupo Morfológico	No. Especies	Especies utilizadas	%
Polianthes	11	<i>P.tuberosa</i> , <i>P.longiflora</i>	27

Bravo	6	<i>P. densiflora, P. geminiflora, P. graminifolia, P. howardii</i>	50
TOTAL	19	6	32
Subgénero Prochnyanthes			
<i>Prochnyanthes</i>	1	<i>Prochnyanthes mexicana</i>	100
TOTAL	48	15 spp.	31

Tabla 3. Especies utilizadas como grupo externo a <i>Agave sensu lato</i>			
Grupo Hermano			
Género	No. especies	Especies utilizadas	%
<i>Furcraea</i>	7	<i>F. macdougallii, F. cahum, F. bedinghausii, F. guatemalensis, F. guerrerensis, F. longaeva, F. parmentieri</i>	28
<i>Beschorneria</i>	4	<i>B. calcicola, B. septentrionalis, B. rigida, B. tubiflora</i>	57
Total	32	11 spp.	34.4
Género <i>Yucca</i>			
Morfogrupo	No.sp	Especies utilizadas	%
Sarcocarpa	24	<i>Y. schidigera</i>	4.2
Chaenocarpa	24	<i>Y. glauca, Y. filamentosa, Y. queretaroensis</i>	12.5
Clistocarpa	<i>Y. brevifolia</i> (1sp)	-	0
Total	49	4	8.2
Clado basal de Agavaceae			
Género	No. especies	Especies utilizadas	%
<i>Hesperoyucca</i>	1	<i>Hesperoyucca whipplei</i>	100
<i>Hesperaloe</i>	5	<i>H. funifera, H. nocturna</i>	40
<i>Hosta</i> *	23	<i>Hosta fortunei</i>	4
Grupo externo a Agavaceae			
Familia hermana	Anthericaceae	<i>Chlorophytum comosum</i>	

Se emplearon tres diferentes ciclos de tiempo/temperatura para amplificar todos los fragmentos. Para *trnK2621F-matK13825R* y *taber e - taber f* se utilizó el ciclo A, para *matK743F-trnK111R* el B y para el *trnT-trnD* el ciclo C (Tabla 4). Los productos se almacenaron a 4°C hasta ser corridos en un gel de agarosa al 1.5%, empleando bromuro de etidio como marcador para así calcular tanto el tamaño mediante la comparación con el marcador (ladder) de 100 pb Invitrogen, como la concentración. Cuando la banda era demasiado tenue y se repitió la reacción para un volumen de 60 µl duplicando todas las cantidades excepto del ADN y la Taq

polimerasa, por lo que el H₂O tampoco era el doble, sólo se aforaba a 60 µl.

Tabla 4. Método “Mini-Prep”

<ol style="list-style-type: none"> 1. moler 1gr de tejido 2. 1,000ml CTAB2X 3. Centrifugar 10,000g 8 min 4 °C Eliminar sobrenadante = es. 4. 600 ml CTAB2X 5. Incubar 60 °C 10 min 6. 600 ml cloroformo : octanol 24:1 a -20 °C 7. Centrifugar a 7000 g 12 min 4 °C Recuperar 250 ml sobrenadante en tubo nuevo 8. 2/3 de vol. (600 ml) de isopropanol a -20 °C 9. Reposar 2 hrs o más a -20 °C 10. Centrifugar 9,000 g 5 min 4 °C, es. 11. 1000 ml etanol 70 % a -20 °C Reposar 5 min a temperatura ambiente 12. Centrifugar 7,000 g 5 min, es. 13. Secar 14. Rehidratar con 70 ml Dejar a -4 °C 12 hrs antes de usar
--

Tabla 5. Secuencia de Primers para PCR y secuenciación*

<i>trnK</i> 2621F	AAC TAG TCG GAT GGA GTA G
<i>matK</i> 13825R	CTT CGA CTT TCG TGT GCT AG
<i>matK</i> 743F	GTT CCA GAA GAT GTT AAT CG
<i>trnK</i> 11R	CTC AAC GGT AGA GTA TTC GG
taber e	GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC
taber f	ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG
<i>trnD</i> ^{GUC} F	ACC AAT TGA ACT ACA ATC CC
<i>trnT</i> ^{GGU} R	CTA CCA CTG AGT TAA AAG GG
* <i>trnE</i> ^{UUC}	AGG ACA TCT CTC TTT CAA GGA G
* <i>trnY</i> ^{GUA}	CCG AGC TGG ATT TGA ACC A
L14725 - citocromo- <i>b</i>	TGA AAA AYC ATC GTT GT
H15195 - citocromo- <i>b</i>	TCT TCA TTT YWG GTT TAC AAG AC

La mayoría de los productos de la PCR fueron filtrados con placas “manifold” conectadas a una bomba de succión, lo que eliminó los productos inespecíficos de

bajo peso molecular sin afectar ni la secuencia de nucleótidos ni la longitud del fragmento. Estas son placas con 96 pozos independientes donde se colocó el fragmento amplificado más 200 µl de agua, se succionó y se agregaron otros 100 µl de agua nuevamente. Una vez que se observó que los filtros de cada pozo estaban secos se agregó 30 µl de agua y se dejó en agitación a 400 rpm durante 20 min. para recuperar los productos.

Ciclo	A	B	C
Desnaturalización inicial	94 °C / 3 min.	94 °C / 3 min.	94 °C / 5 min.
Número de ciclos	30	35	30
Alineamiento	94 °C / 40 seg.	93 °C / 40 seg.	94 °C / 45 seg.
Extensión	55 °C / 40 seg.	58 °C / 40 seg.	55 °C / 30 seg.
Extensión	68 °C / 90 + 2 seg / ciclo	68 °C / 90 + 2 seg / ciclo	72 °C / 1 min.
Termociclador	ThermoHybaid y PTC – 100 indistintamente		

La mayoría de los productos de la PCR fueron filtrados con placas “manifold” conectadas a una bomba de succión, lo que eliminó los productos inespecíficos de bajo peso molecular sin afectar ni la secuencia de nucleótidos ni la longitud del fragmento. Estas son placas con 96 pozos independientes donde se colocó el fragmento amplificado más 200 µl de agua, se succionó y se agregaron otros 100 µl de agua nuevamente. Una vez que se observó que los filtros de cada pozo estaban secos se agregó 30 µl de agua y se dejó en agitación a 400 rpm durante 20 min. para recuperar los productos.

4. Secuenciación de los genes de cloroplasto y citocromo-*b*

Tanto para la reacción de amplificación PCR como para su secuenciación se utilizaron los mismos primers a excepción de trnT-trnD, que requirió primers específicos (Shaw et al., 2005). Para las reacciones de secuenciación de todos los fragmentos se utilizaron 2 µl de BDT, 1.6 µl de primer (realizando de manera independiente el F=forward y el R=reverse de cada uno) y de 7 – 11.4 µl de ADN

dependiendo de la intensidad de la banda; agregando el volumen necesario de agua para llevar el volumen total a 15 μ l. Los ciclos utilizados para la reacción de secuenciación que se muestran en la Tabla 7 son los universales y se realizaron en los termocicladores GeneAmp PCR system 2700, ThermoHybaid y PTC-100 indistintamente. Sin embargo, para la secuenciación del citocromo b de *L. nivalis* fue necesario utilizar el mismo ciclo que para su PCR (con 45 ciclos en vez de 35).

Tabla 7. Ciclos para Secuenciación	
Desnaturalización inicial	95 °C / 5 min.
Número de ciclos	45
Desnaturalización	95 °C / 10 seg.
Alineación	50 °C / 10 seg.
Extensión	60 °C / 4 min.

Posteriormente se limpiaron siguiendo el protocolo de etanol 70%, se dejaron secar a temperatura ambiente y se agregó 16 μ l de formamida para colocarlos en la placa, se desnaturalizaron 2 min. y se paró la reacción en hielo 2 min., para finalmente introducirse al secuenciado ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer.

5. Edición y alineación de las secuencias de ADN

Una vez obtenidas todas las secuencias de los fragmentos de interés se evaluó la calidad de la secuencias en 3100-Avant Data Collection 2.0, el programa del secuenciador, revisando cuidadosamente los electroferogramas donde la calidad de la secuencia no fuera azul (excelente) y asignando donde era posible de manera manual la base correcta y una N cuando no se podía distinguir. Las secuencias de baja calidad se eliminaron y repitieron. Posteriormente se procedió a hacer una búsqueda (BLAST) en GenBank, lo cual nos sugiere a que se parece más nuestra secuencia de todas las contenidas en esa base de datos; de esta manera es posible

saber si amplificamos al organismo y el fragmento deseados. Las secuencias se alinearon en BIOEDIT n7.0.0 (Hall, 2005) utilizando Clustal W todas las especies por primer, primero el “forward” y luego el “reverse”. Se buscaban todos los sitios que fueran distintos en el electroferograma correspondiente para corroborar si la base asignada era la correcta. Una vez obtenidas las dos matrices, se unieron los dos fragmentos construyendo construir así una sola matriz de ADN para cada espaciador de cloroplasto.

6. Selección del Modelo de Evolución Molecular

Para seleccionar el modelo de sustitución molecular en Agavaceae se valoró el ajuste de cada uno de los genes de cloroplasto, así como de la matriz de los 4 concatenados, a todos los modelos disponibles en el programa, comparándolos con una prueba de verosimilitud LRT y el criterio de Información de Akaike AIC utilizando MODELTEST (Posada y Crandall, 1998). Se procedió de la misma manera para las secuencias de citocromo *b* de Phyllostomidae.

7. Estimación de las Filogenias

La filogenia se estimó mediante Inferencia Bayesiana utilizando MRBAYES (Huelsenbeck et al., 2001; Ronquist et al., 2003) con el modelo de sustitución obtenido para la matriz concatenada de 2191 pb, pidiéndole que explorara tanto las topologías como los demás parámetros del modelo y que generara el consenso de mayoría con las longitudes de rama promedio para cada terminal. Se hicieron 800,000 generaciones muestreando un árbol cada 200 con un “burn-in” del 28.5 % del total de caracteres (625 árboles). Una vez terminado el análisis se generan 2 archivos (dos corridas paralelas) tanto de árboles como de parámetros con su verosimilitud asociada, así como el consenso de mayoría con longitudes de ramas. La estimación filogenética de la filogenia de Phyllostomidae se realizó de la misma

manera.

La convergencia se evaluó en 2 etapas, durante el análisis y posteriormente. Previamente a que se detenga la estimación mediante inferencia bayesiana, MRBAYES te muestra la desviación estándar promedio de las frecuencias de división (average standard deviation of the split frequencies) así como los valores de PSRF (potential scale reduction factor) y en el momento en que la primera se aproxima a 0 y los segundos a 1 se detuvo el análisis. Posteriormente se analizó el comportamiento tanto de la verosimilitud global como de cada uno de los parámetros estimados.

8. Prueba de la Hipótesis de Reloj Molecular

La prueba de la hipótesis del reloj molecular consiste en comparar la verosimilitud de una filogenia, forzando un reloj molecular (hipótesis nula, que es un caso particular de la hipótesis alternativa) y sin forzarlo (hipótesis alternativa) mediante una prueba de cociente de verosimilitudes LRT, donde $\ln L_0$ = verosimilitud con reloj molecular y $\ln L_1$ = sin reloj molecular (Felsenstein 1983).

$$LRT = 2 (\ln L_0 - \ln L_1)$$

En un árbol en el que se supone un reloj molecular el número de longitudes de rama a estimar sería $n - 1$ donde n = número de taxa, mientras que si no se supone reloj es $2n - 3$ (Lewis, 1998). Una manera sencilla de visualizarlo es imaginar el árbol más pequeño (3 terminales), si se asume reloj molecular se requerirá estimar únicamente 2 longitudes de rama, una del grupo externo y otra de cualquiera de las otras dos terminales hermanas ya que se asume que su longitud de rama es la misma. Por otro lado si en el mismo árbol no se asume reloj molecular se tendrán que estimar 3 distintas.

La LRT es una prueba estadística diseñada para comparar dos modelos anidados que en este caso los parámetros limitados son las longitudes de rama (Lewis, 1998). La verosimilitud de $\ln L_0$ necesariamente es la misma o menor que $\ln L_1$. Si $\ln L_0$ es mucho menor que $\ln L_1$ la hipótesis nula (con reloj) se debe rechazar

debido a que, asumir un reloj molecular no nos permite explicar los datos tan bien como lo hace el relajamiento de esta hipótesis. En caso de que la verosimilitud sea muy semejante para saber si la diferencia es significativa, se hace uso del hecho que $LRT = 2 * (\ln L_0 - \ln L_1)$ se distribuye de manera muy similar a una variable aleatoria de χ^2 con ν grados de libertad. En este caso los grados de libertad son $\nu = n - 2$ porque hay $n - 2$ menos ramas que necesitan ser estimadas en el modelo limitado en comparación con el alternativo (Felsenstein, 1981). Esta prueba se realizó tanto para la filogenia de Agavaceae que fue construida con 51 taxa como para Phyllostomidae con 34 taxa, por lo que los grados de libertad son 49 y 32 respectivamente.

9. Estimación del origen de clados y sus tiempos de divergencia

Una vez obtenido el estimado puntual de la filogenia con longitudes de ramas se realizó la fechación mediante el método de Verosimilitud Penalizada (PL) de Sanderson (2002), que es un método semiparamétrico. Éste permite diferentes tasas de sustitución entre ramas penalizando los cambios muy rápidos al igual que el NPRS de Sanderson (1997), pero que a diferencia de éste regula la contribución relativa del modelo paramétrico y la penalización mediante un "parámetro suavizante" λ (Sanderson, 2003). Lambda es un factor determinante para la estimación de las tasas y tiempo de divergencia, por lo que resulta de crucial importancia seleccionar un valor que ajuste bien a los datos. La magnitud óptima para este parámetro se obtiene implementando una validación cruzada en los datos que consiste en eliminar una a una las ramas terminales de la filogenia y estimar los parámetros en las ramas restantes mediante PL para posteriormente utilizarlos para predecir la longitud de las ramas eliminadas. La diferencia entre las longitudes predichas y las observadas constituirá el error, que es utilizado como un índice del poder de predicción y se deberá seleccionar el valor de λ asociado al conjunto de parámetros que resulten en el menor error (Magallón, 2004).

Por lo general los valores de λ explorados van de 3 a 1000 (equivalente a un rango de 0.5 a $3 \log \lambda$), sin embargo si con éstos no se logra determinar el valor de λ sin ambigüedad (e.g., el error estándar asociado sigue bajando) se deben explorar otros valores a distintos intervalos. Mientras para Agavaceae el valor de λ cayó dentro de el rango anteriormente mencionado, para la cv de Phyllostomidae se requirió explorar valores entre 1×10^3 y 1×10^8 . La validación cruzada requiere de la calibración del árbol mediante la fijación al menos de uno de los nodos en un punto temporal absoluto. En este caso fijó la fecha del origen del género *Yucca* a 14 MA (Tidwell y Parker, 1990) ya que es la única fecha fósil disponible. Asimismo se eliminó al taxón más externo de la filogenia en este caso *Chlorophytum* (que fue utilizado para enraizar la topología) debido a que la longitud de su rama es un artefacto (Sanderson, r8s manual 2006). Una vez obtenida la magnitud de λ se estimaron las fechas de todos los nodos utilizando como calibración secundaria el rango temporal de entre 13-19 ma para el origen de *Yucca*, dentro del que queda contenida la edad fósil. Este rango es un estimado molecular obtenido por Good-Avila et al. (2006), utilizando fósiles de monocotiledóneas para su calibración.

En la validación cruzada de Phyllostomidae se utilizó la edad de la divergencia entre *Pteronotus* y la familia Phyllostomidae (nodo NOC en la Fig. 4) a 30 ma, que es un estimado molecular utilizando varias edades fósiles (Teeling et al., 2005) para estimar λ . Para la fechación se utilizaron los intervalos fósiles de 30-42 ma para NOC y de 37- 47 ma para NVP y de 50 - 60 ma para la divergencia entre *Natalus* y *Myotis* (Teeling et al., 2005).

10. Análisis de la tendencia de las tasas de diversificación en *Agave sensu lato*

Para la evaluación de las tasas de diversificación se utilizó la topología con el valor de verosimilitud más elevado estimada por MRBAYES con longitudes de rama estimadas con máxima verosimilitud, previamente fechada. Nos interesaba saber si la tasa de diversificación había sido constante a lo largo del tiempo y de no ser así a

que modelo de tasas variables se ajustaba mejor, así como cuantos cambios habían sucedido (incrementos o decrementos) y cuando se habían presentado. Todo esto se estimó con LASER (Rabosky, 2006) utilizando el árbol ultramétrico de *Agave sensu lato* (filogenia fechada con r8s). Para determinar el valor crítico de 13.5 con un $\alpha \leq 0.05$ se construyó un histograma de la distribución nula de los ΔAIC de 500 filogenias que fueron simuladas muestreando 15 especies de un total de 208. Una vez obtenido éste valor se corrió LASER con el árbol ultramétrico evaluando dos modelos de tasas constantes (RC) y cinco de tasas variables (RV). Asimismo se obtuvo la gráfica del surgimiento de linajes en el tiempo LTTP y se señalaron los incrementos únicamente para hacer más visual el resultado.

VI. RESULTADOS

1. Amplificación y secuenciación de los genes de cloroplasto

En la Tabla 1 se muestran los genes de cloroplasto para los cuales se logró obtener la secuencia para construir la matriz de datos en la que se basaron todos los análisis de Agavaceae. En total se analizaron 2191 pares de bases de 51 taxa, ya que se eliminaron las especies para las cuales no se logró obtener la secuencia de al menos 2 fragmentos (50%). Los primeros dos fragmentos pertenecen al gen *matK* mientras que los otros dos son regiones no codificantes. De la mayoría de las especies se obtuvieron al menos tres fragmentos completos. El asterisco al lado del nombre de la especie indica que el ADN se extrajo de material herborizado tomado del Herbario Nacional, (Instituto de Biología, UNAM) y la "x" que contamos con una secuencia de buena calidad.

2. Selección del modelo de sustitución molecular

En la Tabla 4 se muestran los modelos que mejor se ajustaron a las secuencias de los espaciadores por separado, así como al conjunto de datos construido por la concatenación de todas las secuencias para cada especie identificado con ModelTest (Posada y Crandall, 1998). Para todo el segmento *trnK-matK* así como para *trnL-trnF* se eligió el mismo modelo tanto por HLRT como por AIC, mientras que para *trnD-trnT* y para la matriz concatenada se seleccionaron unos ligeramente distintos. Lo que sucede es que el AIC (Akaike Information Criterion) penaliza la adición de parámetros, mientras que HLRT (Hierarchical Likelihood Ratio Test) no lo hace, por lo que el primer método generalmente escoge un modelo con mejor ajuste pero con mayor número de parámetros. La diferencia fundamental entre los criterios de selección del modelo se encontró a nivel de la proporción de sitios invariables y la distribución gamma (Tabla 5); sin embargo para la matriz concatenada ambos criterios coinciden.

Especie	<i>matK</i>₁	<i>matK</i>₂	<i>trnL-trnF</i>	<i>trnD-trnT</i>
1. <i>Manfreda guttata</i> *	x	x	x	x
2. <i>M. revoluta</i> *	x	x	x	x
3. <i>M. fusca</i> *	x	x	x	-
4. <i>M. maculata</i> *	x	x	x	x
5. <i>M. virginica</i> *	x	x	x	-
6. <i>M. jaliscana</i> *	x	x	x	x
7. <i>M. pubscens</i> *	x	x	x	x
8. <i>M. pringlei</i> *	x	x	x	x
9. <i>Polianthes densiflora</i>	x	-	x	-
10. <i>P. graminifolia</i> *	x	x	x	x
11. <i>P. geminiflora</i> *	x	x	x	x
12. <i>P. tuberosa</i>	x	x	x	x
13. <i>P. howardii</i> *	x	x	-	x
14. <i>P. longiflora</i> *	x	x	x	x
15. <i>Prochnyanthes mexicanana</i> *	x	x	x	x
16. <i>Agave angustifolia</i>	x	-	-	-
17. <i>A. deserti</i>	x	x	x	x
18. <i>A. garciae-mendozae</i>	x	x	x	x

19. <i>A. guiengola</i>	x	x	x	-
20. <i>A. schidigera</i>	x	x	x	x
21. <i>A. vilmoriniana</i>	x	x	x	x
22. <i>A. victoriareginae</i>	x	x	x	x
23. <i>A. lechuguilla</i>	x	x	x	x
24. <i>A. petrophila</i>	x	x	x	x
25. <i>A. fourcroydes</i>	x	x	x	x
26. <i>A. cupreata</i>	x	x	x	x
27. <i>A. inaequidens</i>	x	x	x	x
28. <i>A. celsii</i>	x	x	x	x
29. <i>A. potatorum</i>	-	x	x	x
30. <i>A. striata s1</i>	x	x	x	x
31. <i>A. striata s3</i>	x	x	x	x
32. <i>A. striata s2</i>	x	x	-	x
33. <i>Furcraea longaeava*</i>	x	x	x	x
34. <i>F. guerrerensis*</i>	x	x	x	x
35. <i>F. guatemalensis*</i>	x	x	x	x
36. <i>F. macdughallii*</i>	x	-	x	x
37. <i>F. bedinghausii</i>	x	x	-	x
38. <i>F. parmentieri*</i>	x	x	x	x
39. <i>F. cahum*</i>	x	x	-	x
40. <i>Beschorneria calcicola*</i>	x	x	x	-
41. <i>B. rigida*</i>	x	x	x	x
42. <i>B. tubiflora*</i>	x	x	x	x
43. <i>B. septentrionalis*</i>	x	-	x	-
44. <i>Hesperoyucca whippleii</i>	x	x	x	x
45. <i>Hesperaloe Nocturna</i>	x	x	x	x
46. <i>H. funifera</i>	x	x	x	x
47. <i>Yucca queretaroensis</i>	x	x	x	x
48. <i>Y. filamentosa</i>	x	x	-	-
49. <i>Y. glauca</i>	-	-	x	x
50. <i>Hosta fortunei</i>	x	-	x	x
51. <i>Chlorophytum comosum</i>	x	x	x	x

Tabla 4. Evaluación de diversos modelos de sustitución nucleotídica y elección del que presentó mejor ajuste de acuerdo a HLRT y AIC

GEN	MODELO	
	Hierarchical Likelihood Ratio Test (HLRT)	Akaike Information Criterion (AIC)
<i>matK</i> ₁ (480bp)	K81 Kimura 3 parámetros	K81 Kimura 3 parámetros
<i>matK</i> ₂ (1000bp)	K81 Kimura 3 parámetros	K81 Kimura 3 parámetros
<i>trnL-trnF</i> (480pb)	Tr N Tamura-Nei + G	Tr N Tamura-Nei + I
<i>trnD-trnT</i> (673pb)	F81 Felsenstein 81	HKY Hasegawa Kishino Yano
Concatenados	K81uf + I + G	TIM + I + G

Tabla 5. Proporción de sitios invariables y valores gamma asociados al modelo de sustitución elegido

GEN	Proporción de sitios invariables		Gamma	
	HLRT	AIC	HLRT	AIC
<i>matK</i> ₁ (480bp)	-	0	0.2464	0.2464
<i>matK</i> ₂ (1000bp)	-	0.6951	0.1735	-
<i>trnL-trnF</i> (480pb)	-	0.8399	0.0157	-
<i>trnD-trnT</i> (673pb)	-	0.7039	-	-
Concatenados	0.7964	0.7982	0.8451	0.8977

3. Estimación de las Filogenias

La filogenia de Agavaceae se obtuvo con base en la base de datos concatenada mediante un análisis bayesiano con un modelo de sustitución molecular "tipo GTR", ya que considera 6 valores distintos de frecuencias de sustitución, que fue identificado como de mejor ajuste a los datos tanto por el AIC como por el LRT. Sin embargo no se le proporcionaron a MrBayes los valores de éstas ni los de los parámetros gamma y proporción de sitios invariables, sino que se solicitó que los estimara. Las probabilidades posteriores asociadas a cada bipartición se muestran en la Figura 1. Para su obtención se eliminaron las topologías en las cuales el valor de verosimilitud asociado aún no se estabilizaba; a éste conjunto se le conoce como "burn in". Cabe destacar que los valores de las longitudes de rama en este caso son un promedio de la obtenida en todas las filogenias estimadas.

Asimismo es posible elegir entre todas las topología la que tenga asociado el valor más alto de verosimilitud; con esto obtenemos una filogenia más resuelta con longitudes de rama estimados en ella específicamente. Si aunado a esto nos interesan particularmente las longitudes de rama es posible re-estimarlas mediante ML (máxima verosimilitud) sobre esta topología o sobre la que tuvo el valor de verosimilitud asociado más alto y que por lo general esta más resulta, la cual se muestra en la Figura 2.

Respecto a la filogenia de Phyllostomidae, se siguió la misma metodología: el modelo de substitución que mejor se ajustó fue el GTR y la filogenia se estimó mediante Inferencia Bayesiana, obteniendo un consenso con longitudes de rama promedio y sus probabilidades posteriores asociadas a cada nodo Figura 3. Al igual que en el caso de Agavaceae se puede seleccionar la topología que presentó el valor de verosimilitud más elevado y sobre esa re-estimar las longitudes de rama mediante máxima verosimilitud, la cual se muestra en la Figura 4.

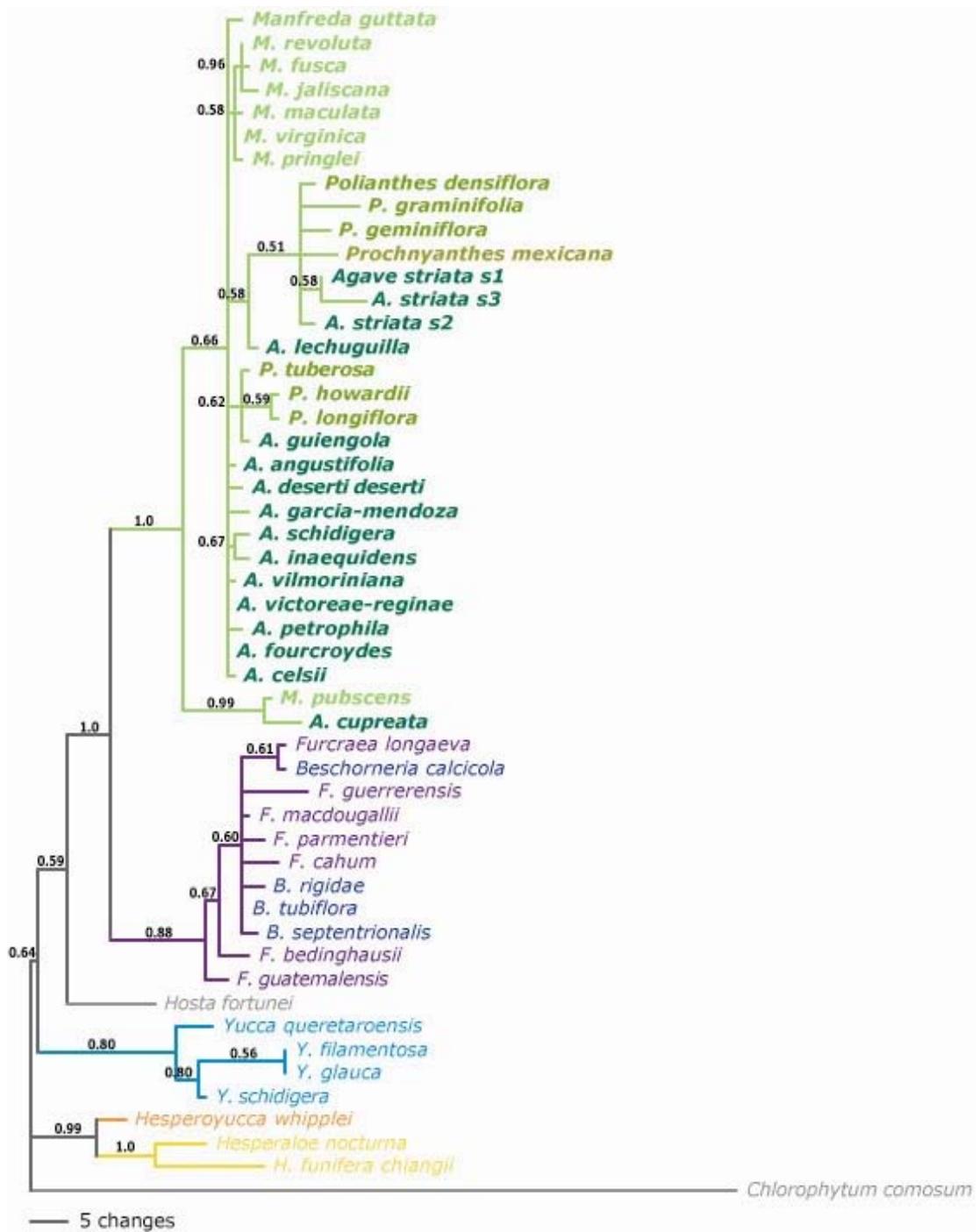


Figura 1. Topología Bayesiana resultante del consenso de mayoría de Agavaceae. Filogenia construida con la matriz de los 4 fragmentos de ADN de cloroplasto concatenados: *matK₁*, *matK₂*, *trnL-trnF* y *trnD-trnT*. La topología es el consenso de los 3500 árboles muestreados y la longitud de ramas es el promedio en todos los árboles para cada terminal. Los números en los nodos indican las probabilidades posteriores bayesianas.

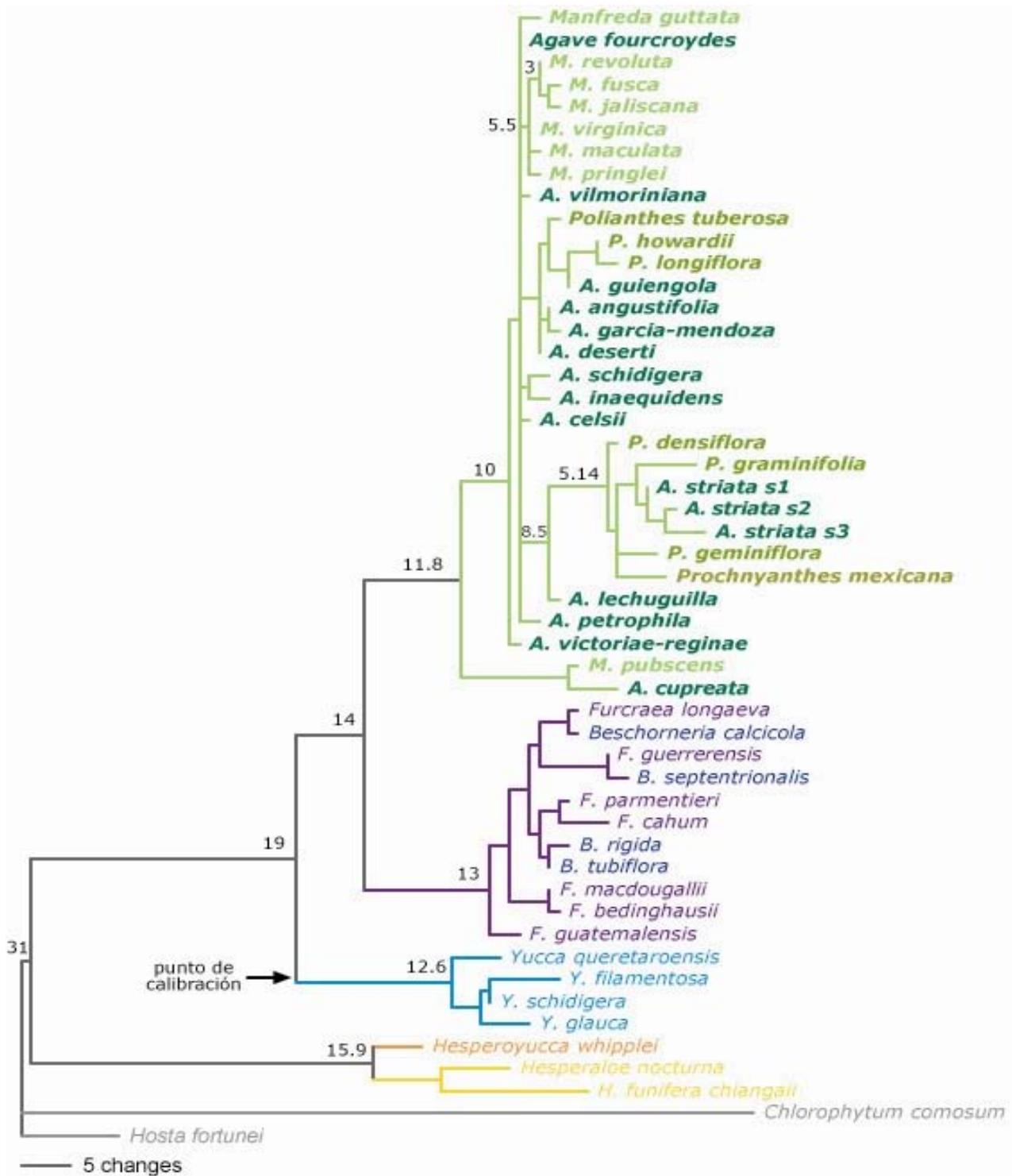


Figura 2. Filogenia puntual indicando las fechas de Agavaceae. Topología bayesiana con mayor valor de verosimilitud asociado en la cual se re-estimaron las longitudes de rama mediante Máxima Verosimilitud. Los números asociados a los nodos indican las edades en millones de años. El punto de calibración se fijó en el origen de *Yucca* entre 13–19 ma.

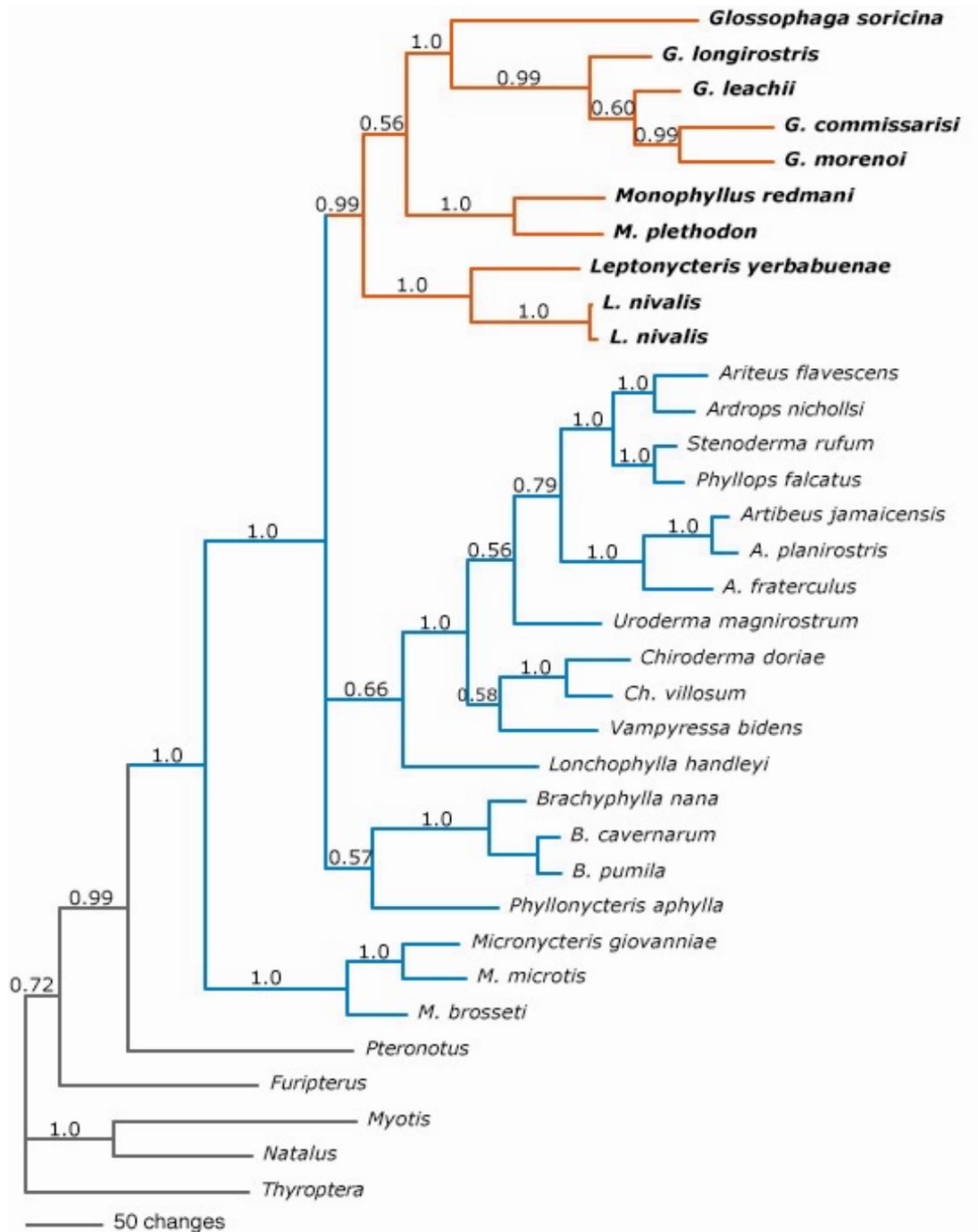


Figura 3. Topología Bayesiana resultante del consenso de mayoría de Phyllostomidae. La filogenia fue construida utilizando las secuencias de citocromo *b* y las longitudes de rama son el promedio en todos los árboles para cada terminal. Los números asociados a los nodos indican las probabilidades posteriores bayesianas.

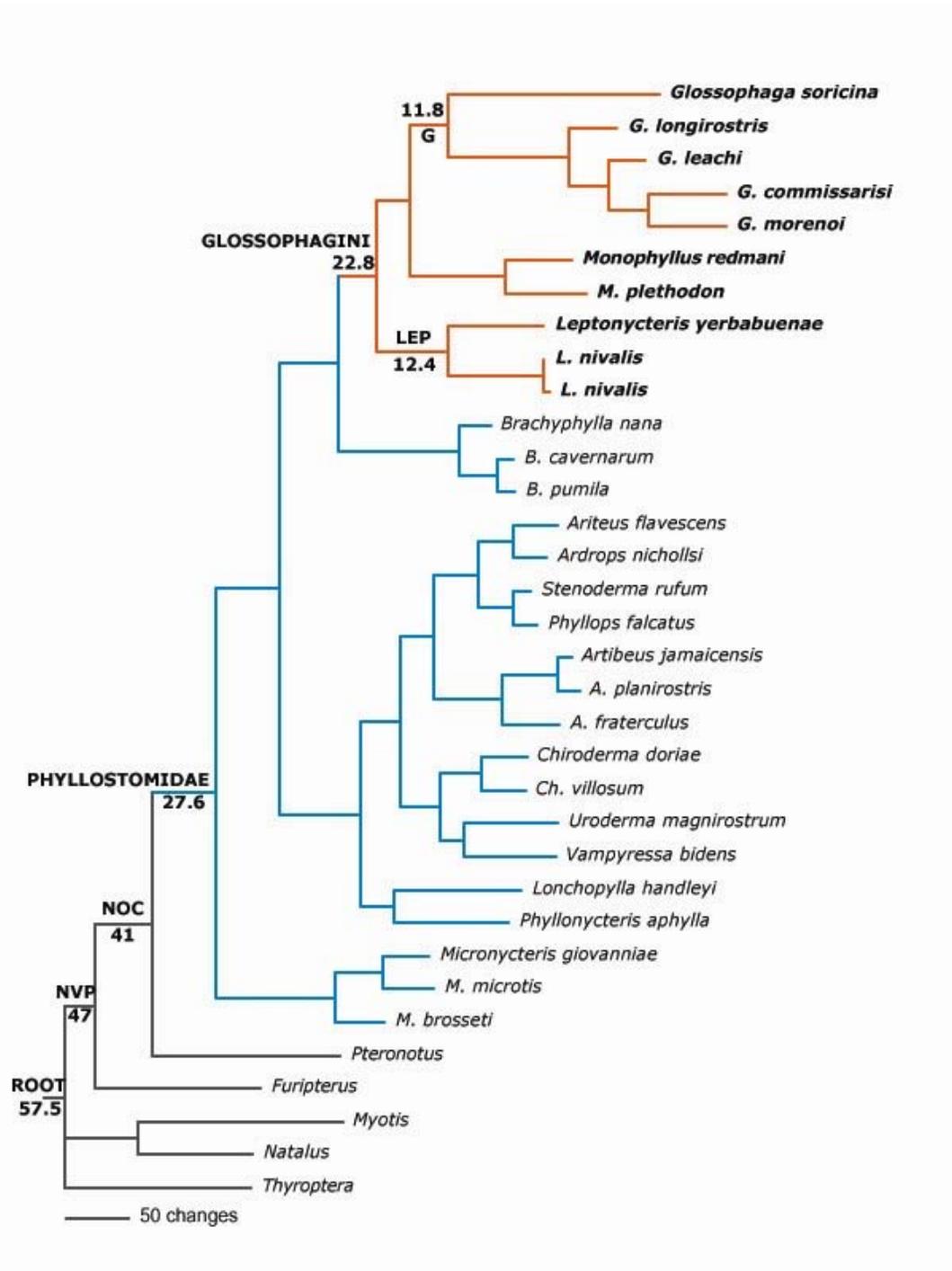


Figura 4. Filogenia puntual indicando las fechas de Phyllostomidae. La topología es uno de los árboles utilizados para construir el consenso de la Fig. 3, elegido por tener el valor de verosimilitud mayor y re-estimándose las longitudes de rama con Máxima Verosimilitud. Los números asociados a los nodos indican las edades estimadas con Verosimilitud Penalizada. Como puntos de calibración se utilizaron las edades de NOC entre 30-42, NVP entre 37-47y NV entre 50-60.

4. Prueba de la Hipótesis del Reloj Molecular

El valor de verosimilitud asociado de la filogenia consenso de Agavaceae (Fig. 1) sin reloj es $-\ln L_1 = 5168.4$, mientras que considerando una tasa constante en todas as ramas, es decir suponiendo un reloj molecular en esta misma topología es de $-\ln L_0 = 5496$. Sustituyendo en:

$$LRT = 2 (\ln L_0 - \ln L_1) = 2(5496.7 - 5168.4) = 656$$

De esta manera se rechaza la hipótesis del reloj molecular para esta hipótesis filogenia con una significancia de 99%, debido a que 656 es mayor que i.e., 85 valor tablas de χ^2 con $P = 0.001$ y para 49 grados de libertad, con un valor de $p \leq 0.0001$. De igual forma, para la filogenia puntual con el mayor valor de verosimilitud, la cual se utilizó para la fechación (Fig. 2) se rechaza la hipótesis del reloj molecular con 99% de significancia por presentar los siguientes valores: $-\ln L_0 = 5127.3$ y $-\ln L_1 = 5331.4$ da un valor de $LRT = 408.2$ que también es mayor a 85.

Respecto a las filogenias de Phyllostomidae, la verosimilitud de la filogenia consenso (Fig.3) el valor de verosimilitud asociado es de $-\ln L_1 = 12693.3$ y asumiendo un reloj molecular sobre esta es $-\ln L_0 = 12891.3$ de ahí que $LRT = 396$. Por su parte en la filogenia con valor de verosimilitud mayor asociado, la utilizada para la fechación (Fig.4) $-\ln L_1 = 12696.4$ y $-\ln L_0 = 12730.6$ y un valor de $LRT = 68.4$. De esta manera se rechaza la hipótesis del reloj molecular en el primer caso con un 99% ($p \leq 0.0001$) y en el segundo con un 95% con $P = 0.05$ y para 32 grados de libertad.

5. Estimación de las fechas en las filogenias de Agavaceae y Phyllostomidae

Las edades y los tiempos de divergencia de los clados de la Familia Agavaceae se muestran en la Figura 2. Para esto primero se obtuvo el valor del parámetro suavizante ($\lambda=32$) mediante una validación cruzada fijando únicamente el

origen de *Yucca* a 15MA. Posteriormente la estimación de las fechas se realizó utilizando el consenso de mayoría con longitudes promedio calculado con Inferencia Bayesiana, un rango de 13-19MA para el origen de *Yucca* (Good-Avila et al., 2006), $\lambda = 32$, el algoritmo de búsqueda TN (truncated newton) y el método de verosimilitud penalizada PL (Sanderson, 2003) eliminando a *Chlorophytum comosum* como se sugiere en el manual de r8s, debido a que la longitud de la rama que lo une con el resto del árbol es una artefacto. La Tabla 6 contiene las fechas estimadas tanto para el árbol consenso como para el de máxima verosimilitud.

Agavaceae			Phyllostomidae			
Clado	Puntual (MV)	Consenso	Puntual (MV)	Consenso	Nodo	Clado
			47 ma	46.11 ma	NVP	
			40.97 ma	37 ma	NOC	
<i>Agavaceae sensu stricto</i>	31.62 ma		27.61 ma	21.51 ma	PH	Phyllostomidae
<i>Hesperoyucca / Hesperaloe</i>	15.89 ma	15.28ma	22.79 ma	17.82 ma	GLO	Glossophagini
<i>Furcraea / Beschorneria</i>	13.05 ma	7.74 ma	12.43 ma	8.04 ma	LEP	<i>Leptoncyteris</i>
<i>Agave sensu lato</i>	11.8 ma	7.05 ma	11.82 ma	8.23 ma	G	<i>Glossophaga</i>
<i>Polianthes, Prochnyanthes, A. striata</i>	8.52 ma	3.87 ma				
<i>Manfreda</i>	5.46 ma	2.66 ma				

Para calcular la tasa se especiación promedio se ha propuesto una formula muy sencilla (Bailey, 1964):

$$D = (\ln n_1 - \ln n_0) / t$$

donde n_1 = No. spp existentes (en este caso las utilizadas) , n_0 =diversidad inicial (que es 1 porque todas tienen un ancestro común) y t =tiempo en ma. Sustituyendo $n_1= 208$ en ambos casos y $t=11.08$ ma y $t=7.05$ nos da una tasa de especiación de 0.75 especies por millón de años. Si aunado a esta, consideramos las fechas del árbol consenso obtendríamos un rango de 0.45-0.75 sp/ma.

Respecto a la fechación de la filogenia de Phyllostomidae se llevó a cabo el mismo procedimiento, fijando la edad de la divergencia entre *Pteronotus* y la familia

Phyllostomidae (nodo NOC) a 30 ma para estimar el parámetro suavizante, $\lambda = 1000,000$. Mientras que para la obtención de la estimación de las fechas se utilizaron los intervalos fósiles de la siguiente manera: NOC 30 - 42 ma, NVP 37 - 47 ma y NV 50 - 60 ma (Teeling, 2005). En la Tabla 6 se incluyeron las fechas obtenidas para ambas filogenias de los Phyllostomidae, tanto la consenso como la puntual con mayor verosimilitud MV (Figura 4) para una comparación más sencillas con las obtenidas para los clados de Agavaceae.

6. Tendencia de las tasas de especiación en *Agave sensu lato*

Para analizar el surgimiento de las especies de agave en el tiempo, se evaluó con LASER (Rabosky, 2006b) el modelo de especiación que mejor se ajustaba a la sección de *Agave sensu lato* del árbol fechado. De esta forma se seleccionó el modelo "yule-3 rate variable", que como se puede observar en la Tabla 5 al comparar sus valores de ΔAIC presenta un ajuste significativamente mejor a los demás modelos evaluados. Cualquier modelo con una diferencia en su valor de ΔAIC mayor a 13.5 (valor crítico determinado mediante el histograma de frecuencias de los valores de ΔAIC_{RV} en las filogenias simuladas) deber ser rechazado, por lo que el modelo "yule-2 shifts" que sería el siguiente con mejor ajuste al presentar una diferencia de 91 unidades, se rechaza. El modelo "Yule-3 rates" tiene 5 parámetros ($r1$, $r2$ y $r3$ son las tres distintas tasas y $st1$ y $st2$ que son los tiempos en que éstos cambios de tasa ocurren "shift times").

Esto mismo se puede observar en la gráfica del surgimiento de los linajes en el tiempo LTTP (Figura 5), que es otro de los resultados generados por LASER generada a partir del árbol ultramétrico fechado. En ésta se señalan las dos fechas a las cuales ocurren los dos cambios en la tasa de diversificación así como los valores de las pendientes que equivalen a las tres distintas tasas registradas.

Tabla 7. Selección del modelo de especiación mediante LASER														
Modelo	Parámetros	NP	Tipo	LH	R1	R2	A	Xp	K	St	AIC	St2	R3	Δ AIC
1. pureBirth	r1	1	RC	-14.068	0.128	NA	NA	NA	NA	NA	30.136	NA	NA	45.635
2. BD	r1, a	2	RC	-14.068	0.128	NA	0	NA	NA	NA	32.136	NA	NA	47.635
3. DDL	r1, k	2	RV	-1.106	0.525	NA	NA	NA	31.1	NA	6.213	NA	NA	21.712
4. DDX	r1, x	2	RV	-2.068	5.322	NA	NA	1.29	NA	NA	8.137	NA	NA	23.636
5. yule2 rates	r1, r2, ts	3	RV	7.311	3.042	8.91e-002	NA	NA	NA	10.68	-8.623	NA	NA	6.876
6. yule 3 rates	r1, r2, r3, st1, st2	5	RV	12.749	2.967	1.33e-001	NA	NA	NA	10.76	-15.499	2.66	0.0122	0

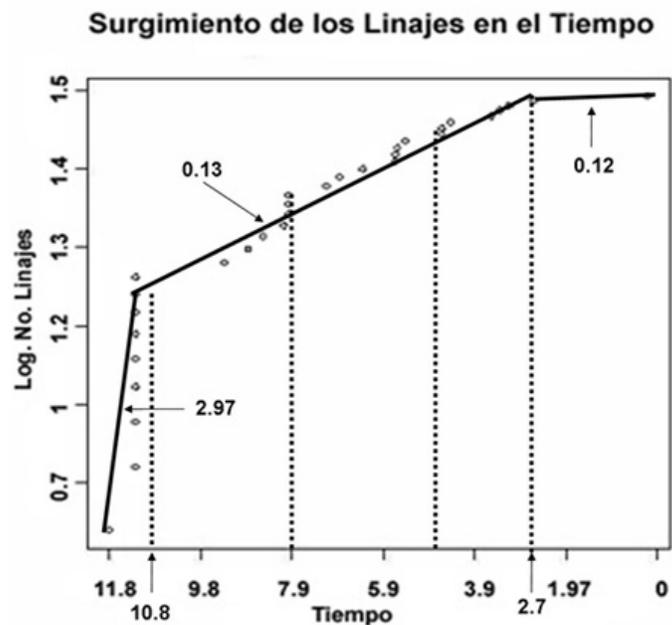


Figura 5. Surgimiento de especies en el tiempo (LTTP), en escala semilogarítmica. Esta gráfica se construyó a partir la sección de *Agave sensu lato* del árbol ultramétrico fechado de Agavaceae. Las

pendientes muestran las tres tasas de diversificación estimadas para “Yule3” (r_1 2.97, r_2 0.13 y r_3 0.012). Asimismo se señalan con flechas las fechas en que estos cambios en las tasas ocurrieron (10.8 ma y 2.7 ma). Las líneas punteadas indican otros dos cambios en las tasas (uno hace 7.9 ma y 4.7 ma aprox.) que se observan de manera cualitativa.

VII. DISCUSIÓN

1. FILOGENIA

1.1 Muestreo Taxonómico

La relevancia del muestreo en éste tipo de estudios radica en que se sabe que tiene un efecto tanto en la estimación filogenética como en la fechación y en el análisis de sus tasas de diversificación. En éste estudio no se incluyeron todas las especies de *Agave sensu lato*, como es el caso de la mayoría de los trabajos similares, debido en primer lugar a que no fue posible conseguirlas, extraer el ADN, amplificarlo o secuenciar todos los fragmentos de interés y debido que nuestro interés principal no se centraba en conocer las relaciones filogenéticas entre cada una de las especies del género sino construir una idea general lo suficientemente robusta para permitirnos fecharla y obtener las edades de los nodos críticos en relación a una posible coevolución con sus murciélagos polinizadores. Debido a esto, entre otras razones se hizo un muestro muy cuidadoso incluyendo todos los géneros de *Agavaceae sensu lato*, buscando incluir la mayor diversidad morfológica, ecológica y geográfica (dentro de México) así como de los géneros *Furcraea* y *Beschorneria* que juntos constituyen su grupo hermano. La importancia del muestreo de los demás géneros de la familia *Agavaceae* radica en el interés de poner en un contexto evolutivo a *Agave sensu lato* pero sobre todo en obtener una fechación lo más precisa posible mediante la disminución de la distancia entre el punto de calibración y el resto de las especies.

Por su parte el muestreo de sus murciélagos polinizadores tuvo un objetivo sutilmente distinto. En éste caso la principal motivación de la reconstrucción filogenética era poder obtener fechas confiables sobretodo para los géneros que potencialmente pudieran haber desempeñado un papel relevante en la diversificación de *Agave sensu lato*, lo que implica que tengan una dieta basada en polen y néctar y que compartan la distribución geográfica. De ésta manera decidimos incluir todos los representantes que fuera posible de la subfamilia Glossophagini así como miembros de Phyllostomidae de los que se tuviera información temporal.

1.2 Reconstrucción filogenética

Se eligieron genes de cloroplasto para la reconstrucción filogenética de Agavaceae debido a que por ser de herencia materna no recombinan. Dentro del ADN del cloroplasto elegimos el gen *matk* así como fragmentos no codificantes (*trnL-trnF*, *trnD-trnT*) debido a que su baja presión de selección incrementaba la probabilidad de que presentaran una alta tasa de sustitución. De esta manera se esperaba tener secuencias capaces de resolver al máximo las relaciones tanto al interior de *Agave sensu lato* como a nivel de la familia. De haberse utilizado genes nucleares, nos habríamos enfrentado muy probablemente a genes parálogos, ya que varias de las especies de *Agave* son poliploides (Pinkava y Baker, 1985). El bajo número de sitios variables encontrado en los cuatro espaciadores utilizados aún a nivel de la familia sugiere, que puede tratarse de una diversificación reciente y es muy probable que de haberse utilizado regiones codificantes la resolución habría sido menor.

Por su parte, para Phyllostomidae se utilizó el citocromo *b* ya que se ha reportado que este gen es un buen marcador para resolver las relaciones filogenéticas a este nivel en otros grupos de mamíferos y a que las secuencias de la mayoría de las especies de interés se encontraban disponibles.

Respecto al método de reconstrucción filogenética decidimos utilizar Inferencia Bayesiana (MRBAYES) debido a que permite el uso de diversos modelos de sustitución (a pesar de que finalmente no fue necesario utilizar distintos modelos

para cada fragmento, pero si se hubiera requerido es sencillo y eficiente computacionalmente) conservando la nube de probabilidades tanto de la topología como de los demás parámetros, así como elegir un árbol en base a un criterio objetivo (mayor valor de verosimilitud) para análisis particulares (Nylander et al., 2004). Con este método es posible detectar de manera sencilla cuando se estabiliza cada uno de los parámetros así como la verosimilitud de estos y dependiendo del interés del usuario, elegir uno o hacer un consenso que refleje toda la nube de probabilidades. Una ventaja de las aproximaciones probabilísticas es que el uso de modelos permite la exploración de los datos de manera explícita, el cálculo de longitudes de ramas aunado a que la selección del árbol no depende de una combinación particular de estados de carácter en los nodos internos (como en Máxima Parsimonia) debido a que cada estado tiene una probabilidad asociada (Lewis, 1998).

Una vez elegida la topología se decidió re-estimar sobre esta las longitudes de ramas mediante máxima verosimilitud, ya que es una manera más precisa de hacerlo (debido a que en un análisis bayesiano la estimación de las longitudes de rama es tan solo uno más de los parámetros mientras que en un análisis de MV en el que se proporciona la topología se concentra todo el esfuerzo en su estimación) y éste es el parámetro (junto con la topología) en el que se basa tanto la fechación y análisis de las tasas de diversificación (Sanderson, 2003).

1.3 Interpretación de la Filogenia de Agavaceae

Este estudio concuerda con la evidencia molecular y morfológica en que *Agave sensu stricto* es polifilético. El linaje que en éste trabajo llamamos *Agave sensu lato* incluye *Agave s.s.*, *Manfreda*, *Polianthes* y *Prochnyanthes* y si constituye un grupo monofilético con un soporte de 1.0 de probabilidad posterior, sin embargo de manera independiente cada uno de éstos géneros es polifilético. Asimismo los

grupos morfológicos propuestos por Gentry en 1982 tampoco forman grupos naturales (ej: *A. lechuguilla* y *A. victoria-reginae* pertenecen a Marginatae, *A. inaequidens* y *A. cupreata* a Crenatae, a pesar de esto ninguno de estos pares se agrupan) de ahí que las especies que pertenecen al mismo grupo se ubiquen en clados distintos. Sin embargo, sí se forma un clado integrado por la mayoría de las especies de *Manfreda* con un soporte de 0.58 (excepto *M. guttata* la cual no queda resuelta y *M. pubscens* que se agrupa con *A. cupreata*) y otro conformado por varios representantes de varios *Polianthes* y *Prochnyanthes mexicana* con los tres individuos de *A. striata* así como con *A. lechuguilla*. Sin embargo otro grupo de *P. howardii*, *P. tuberosa* y *P. longiflora* se agrupan con *A. guiengola*. Este resultado sugiere que probablemente *Manfreda* constituye un clado monofilético anidado dentro de *Agave sensu lato*, mientras que *Polianthes* y *Prochnyanthes* si serían polifiléticos.

En la filogenia de Agavaceae se muestra de manera contundente con una probabilidad posterior de 1.0 que el grupo hermano de *Agave sensu lato* es *Furcraea/Beschorneria*, clado monofilético formado por dos géneros polifiléticos. La parte más basal de la filogenia no presenta resultados contundentes ni probabilidades posteriores tan altas. Mientras en la filogenia puntual con el mayor valor de verosimilitud el grupo hermano de *Agave sensu lato* + *Furcraea/Beschorneria* es el genero *Yucca*, (dentro del cual *Y. queretaroensis*, especie mexicana queda más alejada del resto), en el consenso de mayoría el grupo hermano es el género asiático *Hosta*. El análisis sugiere que *Hesperoyucca* + *Hesperaloe* es el grupo más tempranamente divergente de todos, con un apoyo es de 0.64 de probabilidad posterior. Cómo ya se mencionó el status de *Hosta* no está claro, ya que mientras que en el consenso queda como grupo hermano del clado *Agave sensu lato* + *Furcraea/Beschorneria* con una probabilidad posterior de 0.59, en la topología puntual con el valor de máxima verosimilitud más elevado, la familia Agavaceae *sensu stricto* es completamente americana y monofilética.

1.4 Interpretación de la Filogenia de Phyllostomidae

La Familia Phyllostomidae constituye un clado monofilético con un apoyo de 1.0 de probabilidad posterior, al igual que la tribu Glossophagini con un apoyo de 0.99. En la filogenia puntual bayesiana con mayor verosimilitud Glossophagini es el grupo hermano de *Brachyphylla*, género principalmente nectarívoro. Ese grupo nectarívoro queda como hermano de diferentes géneros pertenecientes en su mayoría a la subfamilia Stenodermatinae (grupo de murciélagos frugívoros) a excepción de *Lonchophylla handleyi* y *Phyllonycteris aphylla*, especies nectarívoras. Por su parte el consenso de mayoría de las topologías bayesianas no conserva todas estas relaciones filogenéticas debido a la pérdida de resolución de algunos clados, sin embargo se conserva la monofilia de Phyllostomidae, Glossophagini y Stenodermatinae. En ambos estimados filogenéticos ese gran clado que depende de recursos vegetales queda como hermano de *Micronycteris*, grupo insectívoro de bosques húmedos neotropicales. Las especies que constituyen el grupo hermano de Phyllostomidae pertenecen a géneros (*Thyroptera*, *Myotis*, *Natalus*, *Furipterus* y *Pteronotus*) insectívoros, al igual que los grupos más tempranamente divergentes de la familia. De entre éstos el género más cercano a Phyllostomidae es *Pteronotus* con un apoyo de 0.99 de probabilidad posterior, seguido de *Furipterus* con un apoyo de 0.72.

2. ESTIMACIÓN DE LAS EDADES EN LAS FILOGENIAS

Se sabe que el muestreo taxonómico tiene un importante efecto en la estimación de las filogenias (Felsenstein, 1978; Graybel, 1998; Poe 1998;), asimismo se ha demostrado su influencia determinante en la estimación de las tasas y edades de los clados (Sanderson y Doyle, 2001; Linder et al., 2005). En lo que se refiere a la estimación de las fechas y el análisis de sus tasas de diversificación sensibilidad a un muestreo deficiente varía mucho entre los diferentes métodos. NPRS es sumamente sensible, al grado que un muestreo del 10% genera un estimado de la mitad de la

magnitud de la edad estimada incluyendo el 100% (Linder et al., 2005). El método bayesiano tiene una baja sensibilidad al muestreo, pero no a la distancia al punto de calibración, mientras que la Verosimilitud Penalizada PL (que fue precisamente el método que utilizamos) es el más resiliente tanto a un bajo muestreo (ambas filogenias de éste estudio) como a la distancia al punto de calibración (Linder et al., 2005). Podríamos pensar que si se tiene un muestreo completo, el mismo punto de calibración y el mismo fragmento de ADN los estimados temporales con distintos métodos podrían llegar a convergir en valores similares pero no es así, de ahí la importancia en evaluar si los datos se ajustan a un reloj molecular, porque de ser así lo más conveniente es utilizar éste método de fechación ya que es el menos sensible al muestreo y a la distancia al punto de calibración. Debido a que muchas veces la hipótesis del reloj molecular se rechaza, el método más recomendable es PL (Linder et al., 2005).

Evidencias empíricas también han mostrado que las estimaciones de las tasas y edades derivadas de genes y particiones de genes distintos suelen generar resultados diferentes. En nuestro caso resulta sorprendente que con un muestreo de especies, genes y métodos tanto de estimación filogenética como de fechación distintos encontremos fechas similares (entre 7 y 12ma) para el origen de *Agave sensu lato* a los obtenidos por Good-Avila et al. (2006).

En este trabajo tanto para Agavaceae (a pesar de ser regiones no codificantes) como para Phyllostomidae, se rechazó la hipótesis del reloj molecular, por lo que se eligió el método de Verosimilitud Penalizada (PL). Las fuentes de error recurrentes respecto a la fechación son la calibración de la filogenia y la estimación de las longitudes de rama. Respecto a la asignación de la *Protuyucca*, por las características morfológicas del fósil (Tidwell y Parker 1990) se considera cercana al origen de *Yucca* y para minimizar el error en la estimación de las longitudes de rama a utilizar se re-estimaron mediante máxima verosimilitud. Por su parte para Phyllostomidae se utilizaron tres puntos de calibración, lo cual protege contra errores que pueda presentar un único punto (Lee, 1999), ya sea por la edad asignada al fósil en cuestión como por la ubicación de éste en la filogenia. Tanto la fechación como el análisis de la tasa de diversificación son altamente confiables dada la estrategia de

muestreo y los métodos utilizados para su estimación.

Es probable que existan diferencias utilizando genes nucleares, en parte debido a que refleja la historia evolutiva biparental y a que su tasa evolutiva puede ser más alta que la de los genes neutros, por lo que sería interesante incluir al menos un gen para el estudio Agavaceae. Sin embargo se complicaría su interpretación aún clonando, debido a que muchas especies son poliploides.

2.1 Comparación de fechas estimadas entre árboles

Las edades estimadas para el origen de los clados y sus tiempos de divergencia son invariablemente más recientes en el árbol consenso con longitudes de rama promedio que en el árbol bayesiano con el valor asociado de verosimilitud más alto, tanto para Agavaceae como para Phyllostomidae. A pesar de esto en la filogenia de Agavaceae las fechas estimadas tanto para el origen de la familia, como para los grupos más tempranamente divergentes dentro de ésta (*Hesperoyucca*, *Hesperaloe* y *Yucca*) son muy similares en ambas filogenias, las diferencias significativas se encuentran en los grupos recientes dentro de los cuales se encuentra *Agave sensu lato* y su grupo hermano. Sabemos que estas diferencias no radican en el muestreo, en los genes utilizados, ni en el método de fechación (o punto de calibración) debido a que es el mismo en ambos casos, por lo que resulta posible concluir que se debe a las diferencias en la topología (pérdida de resolución en *Agave sensu lato* en la filogenia consenso) y sobre todo al método de estimación de las longitudes de ramas. Considerando que el estimado con MV es más certero, decidimos utilizar ese filograma para el análisis de las tasas de diversificación.

Comenzando por la edad para el origen de Agavaceae, nuestro estimado de 32 ma es más antiguo que el estimado por Eguiarte (1995) mediante una metodología más básica en 14 ma, así como del más reciente estimado por Good-Avila et al. (2006) entre 19 y 29 ma dependiendo el método y marcador utilizado. Sin embargo es más reciente que el propuesto por Pellmyr y Leebens-Mack (1999) que

estimaron que la colonización de *Yucca* por parte de sus polillas polinizadoras (*Tegeticula*) se dio hace 41.7 ma mediante la calibración (con evidencia biogeográfica) de un reloj molecular a las secuencias de ADN mitocondrial de *Tegeticula*. Ellos infieren que dada la rápida diversificación de los géneros polinizadores de polillas, la diversificación se dio simultánea o previamente. Cabe destacar que el fósil más antiguo reportado para Asparagales, grupo al que pertenece la familia Agavaceae es de hace 37.5 ma (Couper 1960; Muller 1981; Herendeen y Crane 1995), lo cual sugiere que 42 ma es un estimado demasiado antiguo, ya que Agavaceae no constituye el grupo más tempranamente divergente dentro de las Asparagales. Respecto a *Agave sensu lato* nuestro estimado en 11.8 ma también es un poco más antiguo que el de Eguiarte et al. (2000) que obtuvo 8 ma y los de Good-Avila et al. (2006) que van de 6 a 12 ma dependiendo del método de fechación y del marcador, dentro de los cuales el más cercano (9.8 ± 3.3 ma) fue el estimado con el espaciador de cloroplasto *trnL-trnF* mediante NPRS.

3. ANÁLISIS DE LAS TASAS DE DIVERSIFICACIÓN DE *AGAVE SENSU LATO*

La alta tasa de diversificación obtenida para *Agave sensu lato* indica que la gran cantidad de especies que contiene en comparación con otros géneros de Agavaceae (ej: *Yucca* el género que le sigue en diversidad y *Furcraea/Beschorneria*, su grupo hermano) es resultado de una radiación y no de una acumulación de especies en un largo periodo de tiempo. Los resultados señalan que *Agave sensu lato* se originó hace aproximadamente 11.8ma y tuvo su mayor diversificación hace 10.7ma, cuya tasa de diversificación promedio es de 0.3-0.5 sp/ma considerando únicamente las especies utilizadas en este trabajo y de 0.48-0.75 sp/ma incluyendo todas. Estos valores coinciden relativamente con los estimadores de tasas absolutas de diversificación $S = 0.32$ (que utiliza información de las longitudes de ramas, considerando un grado de extinción) y $D = 0.51$ (suponiendo que no hubo extinción), siendo este último el estimador utilizado en este estudio (Rocha et al., 2006).

Mientras que la tasa de diversificación de *Furcraea/Beschorneria* es de 0.26-0.45 sp/ma, mucho menor que la de su grupo hermano. El rango de la tasa de diversificación obtenido en ambas circunstancias (0.3-0.75) es considerablemente mayor a los dos estimados promedio reportados para las angiospermas: 0.077- 0.089 (Magallón y Sanderson, 2001) y 0.12 - 0.39 (Bremer, 1992). Aún comparado con grupos con tasas particularmente elevadas como son: la familia Asteraceae con un valor de 0.27 - 0.33 (Magallón y Sanderson, 2001) y la radiación de las "Silversword Alliance" en Hawai de 0.56 ± 0.17 (Baldwin y Sanderson, 1998) sigue siendo muy elevada y más considerando que la radiación de *Agave* es continental. Por su parte comparada con una radiación de peces (Goodeidae) mexicanos con una tasa con $D=0.217$ es bastante alta (Webb et al., 2004).

Nos interesa evaluar si durante la evolución de *Agave sensu lato* han existido incrementos en las tasas de diversificación en el tiempo, para así poder correlacionarlas ya sea con el surgimiento de algún carácter o estado de carácter particular, con características ecológicas y/o con el surgimiento de algún grupo con el que tenga una interacción importante, en este caso sus murciélagos polinizadores. Nosotros esperamos cambios en su tasa de diversificación, los cuales se observaron gráficamente como variaciones en la pendiente de la curva en distintos tiempos. El problema de un muestreo incompleto se puede abordar de dos maneras: construir intervalos de confianza simulando muestreos aleatorios de 40 spp de 208 spp o, como decidimos hacerlo, mediante la evaluación del ajuste de diversos modelos de diversificación en nuestra hipótesis filogenética. Una vez valorado el ajuste de varios modelos (con tasas constantes y variables, al igual que con y sin extinción y parámetros semejantes a la K implicaría densidad-dependencia) se calcula tanto su verosimilitud como su AIC. Primero se determina si se trata de un modelo de tasa constante o variables mediante el ΔAIC , que por ser positivo nos indica que se trata de un caso con tasas variables. Posteriormente para evaluar si el modelo con mejor ajuste (en este caso Yule3 con tres tasas) es estadísticamente significativo se requiere construir la distribución de ΔAIC para obtener la magnitud que debe tener la diferencia entre modelos para tener 95% de confianza (Rabosky, 2006).

Dentro de las fechas sugerentes se encuentran: 10.7 ma en la cual ocurre un fuerte incremento en la tasa de diversificación que va de 3 a 0.1 sp/ma aproximadamente (en la cual coinciden los ajustes a los modelos Yule2 y 3). Esta es la edad de la mayor diversificación dentro del género *Agave sensu lato*. En segundo lugar destaca (detectado únicamente por Yule 3) la de 3 ma aproximadamente, edad de diversificación de las manfredas recientes. Finalmente las otras fechas que sólo es posible detectar cualitativamente coinciden en cierto grado con la diversificación de un grupo de miembros de *Polianthes* incluyendo a *Prochnyanthes mexicana*.

4. CORRELACIÓN CON MURCIÉLAGOS POLINIZADORES

4.1 Correlaciones temporales

Las fechas estimadas para las filogenias de la familia Agavaceae y la de sus polinizadores (Phyllostomidae) concuerdan en gran medida, su origen data de 31.62ma y 34.6ma respectivamente. En Agavaceae esta fecha representa el momento en que se separa del género *Hosta*, perteneciente a Agavaceae *sensu lato*, que incluye a sus representantes asiáticos. Por su parte para Phyllostomidae constituye el origen de esta familia tan diversa en todos sentidos (hábitos alimenticios, hábitat, comportamiento etc.) y su separación de *Pteronotus* y todos las otras especies utilizados como grupos externos hace 40.97ma. *Pteronotus* es un género insectívoro al igual que los clados ancestrales al interior de Phyllostomidae y todas las otras especies utilizadas como grupos externos.

El origen de la Familia Phyllostomidae hace 34.61ma correlaciona con el origen de Agavaceae hace 31.62ma. *Agave sensu lato*, se originó hace 11.8ma (y hace 10.7ma tuvo su mayor diversificación) fecha que concuerda con el origen del género *Glossophaga* hace 11.8ma y la divergencia al interior de *Leptonycteris* en *L. nivalis* y *L. curasoae*, las especies más especializadas a la alimentación de polen y néctar hace 12.43ma. Esta fecha difiere drásticamente de los 200,000 años

estimados por Wilkinson y Fleming (1996), lo cual podría deberse a que utilizaron tanto genes como métodos de fechación distintos. Ellos utilizaron las distancias estimadas en un árbol de D-loop (un fragmento no codificante de ADN mitocondrial), asumiendo reloj molecular y sin utilizar ninguna calibración fósil. Los tiempos de divergencia entre las especies de *Leptonycteris* se basaron en distancias corregidas, asumiendo una tasa de diversificación del 10% por millón de año tomada de la región control entre ratones del género *Mus*, método sumamente cuestionado aún en esa época, de ahí que la extrema discrepancia no resulte sorprendente.

4.2 Tipos de polinización en cactáceas columnares y agaves

Se ha propuesto que la relación que existe entre los murciélagos del género *Leptonycteris* y las plantas de las que se alimentan (agaves y plantas columnares en zonas áridas) es asimétrica (Slauson 2000) ya que mientras ellos dependen del néctar y polen (Arita y Humphrey, 1988; Rojas-Martínez et al., 1999) de éstas, los agaves se benefician de su polinización, pero no les es indispensable. Sin embargo en bosques secos se alimentan principalmente de Bombacáceas árboles tropicales como *Ceiba* y *Pseudobombax* (Álvarez y González-Quintero, 1979; Arita y Ceballos, 1997), por lo que la dependencia de murciélagos polinizadores a cactáceas y agaves columnares presenta gran variación poblacional al interior de las especies involucradas.

Existen varias semejanzas entre los agaves y las cactáceas columnares, desde la gran abundancia y diversidad que presentan en ambientes áridos neotropicales (relacionada muy probablemente con la fotosíntesis CAM) hasta el grado de dependencia por parte de sus murciélagos polinizadores, la cual en ambos casos es mayor mientras más al norte de su distribución se encuentren. Otro ejemplo es el caso de *Yucca* y *Pachycereus schottii* (senita), ambos polinizados por polillas específicas, *Tegeticula* "yucca-moth" y *Upiga virescens* "senita-moth" respectivamente.

Sin embargo también existen diferencias importantes entre estos grupos; mientras

los murciélagos desempeñan el papel tanto de polinizadores como de dispersores de semillas de cactáceas (debido a que también se alimentan de sus frutos) para agaves sólo fungen como polinizadores. Asimismo mientras las fenologías de las especies simpátricas de cactáceas en los sitios de mayor diversidad como es Tehuacán -Cuicatlán, coinciden sugiriendo un bajo o nulo nivel de competencia (Valiente-Baunet et al., 1996,1997), en agaves sucede lo contrario, por ejemplo Meztitlán (Rocha et al., 2006).

Santos y Arita (2002) determinaron áreas prioritarias complementarias (basándose en los criterios de riqueza de especies y endemismos) para los murciélagos polinizadores en América encuentran que el Eje Neovolcánico transversal y la cuenca del balsas es de suma importancia (la segunda en importancia por diversidad y la primera tomando en cuenta el número de endemismos). Esta región cuenta con una alta riqueza de especies con distribuciones restringidas incluyendo 4 endémicas de Centroamérica: *G. leachii*, *G. morenoi*, *Hylonycteris underwoodi* y *Musonycteris harrisoni*. En el análisis de distribución de las especies de *Agave sensu lato* utilizadas en este trabajo esa región coincide con la de mayor diversidad (NV y SMS para nosotros), que es donde se encuentra la Barraca de Meztitlán y la reserva de Tehuacán-Cuicatlán, que es precisamente el área de mayor diversidad de cactáceas columnares. Esta es parte de una zona transición entre el neoártico y el neotrópico e incluye la mayoría de los biomas de México (Toledo y Ordóñez, 1998).

Las especies de murciélagos asociadas a bosque tropical tienden a presentar distribuciones amplias (Emmons, 1997), en contraste las de zonas áridas presentan distribuciones restringidas induciendo la formación de poblaciones aisladas de especies endémicas (Santos y Arita, 2002), lo mismo pasa con la mayoría de los agaves. García-Mendoza (1995) y Tambutti (2002) reportan que la mayoría de las especies de agaves se encuentran en un área de menos de 3 cuadros (cada uno de alrededor de 12,1000 km²) de un grado de latitud por uno de longitud; lo que implica

que la distribución total promedio por especie es de menos de 36,100km², equivalente a 190X190km.

Algunas especies de murciélagos polinizadores están consideradas en peligro de extinción debido a sus dietas especializadas, distribuciones restringidas y baja densidad poblacional. Asimismo tanto la presencia como la abundancia de los murciélagos está altamente correlacionada con la disponibilidad de plantas en floración, básicamente *Pachycereae* y *Agave* s.s. Por lo anterior, considerando especies migratorias (*Leptonycteris yerbabuena*) las siguientes áreas en orden de importancia serían: la Sierra Madre Oriental y Sierra Madre Occidental (más desierto de Sonora) las cuales contienen una gran diversidad tanto de agaves y como de cactáceas columnares (Santos y Arita, 2002).

Se han documentado cambios sutiles en la polinización de ambos grupos de plantas, mientras más al norte se encuentren menor es la dependencia a murciélagos polinizadores (el extremo de su distribución) y una mayor grado de polinización diurna, especialmente de aves aunque algunas veces de abejas, como es el caso de *A. lechuguilla*. Estos cambios se ven reflejados en su síndrome de polinización, en agaves se observan cambios en la coloración de las flores, se recorre el horario del pico de producción del néctar, así como la concentración de azúcares y proteínas en néctar y polen respectivamente. Por su parte en cactáceas el mayor cambio se da en el horario de apertura de las flores, como sucede en las especies de Baja California y el suroeste de Arizona (Fleming, 2002).

El que los murciélagos sean polinizadores impredecibles se ha planteado como una de las mayores fuerzas ecológicas en la evolución de un síndrome de polinización generalista de cactus columnares (Valiente-Baunet, 2002) y lo mismo pudo haber ocurrido en los agaves de zonas desérticas, constituyendo potencialmente un caso de coevolución entre los tres linajes. Sería interesante incluir las demás especies polen y nectarívoras mexicanas, pero especialmente a *Choeronycteris mexicana* y a *L. yerbabuena*.

IX. CONCLUSIÓN

En conclusión este estudio concuerda con evidencia morfológica y molecular en que *Agave sensu stricto* es polifilético y que el grupo natural monofilético incluye a los representantes herbáceos: *Manfreda*, *Polianthes* y *Prochnyanthes*. Asimismo ninguno de los 2 subgéneros de *Agave sensu stricto* (*Littaea* y *Agave*) es monofilético; de hecho se agrupan indistintamente. De igual manera tampoco se agrupan las especies pertenecientes al mismo grupo morfológico, de manera que éstos podrían estar más relacionados a su ecología que a su origen evolutivo.

La estimación de las edades de los clados y sus tiempos de divergencia dependen en gran medida del estimado de las longitudes de rama y en el método de fechación usado. Sin embargo también influye el muestro, el método de reconstrucción filogenética, de fechación y el fragmento de ADN utilizado. En este trabajo (controlando éstas variables al máximo) obtenemos un origen para el género *Agave sensu lato* de entre 11.8-10.7 ma la cual correlaciona con el de los géneros *Glossophaga* 11.8 y *Leptonycteris* 12.43 ma, lo cual apoya la hipótesis de una coevolución difusa entre estos linajes. El prolongado periodo pre-reproductivo de los agaves (entre 6-55 años dependiendo de la especie) permite que se acumule agua y nutrientes que serán utilizados posteriormente para la reproducción (producción de flores, frutos y semillas) de manera masiva (Slauson, 2000) y a la translocación del 68% aprox. de agua y nutrientes, en comparación con el 10% del promedio de otras plantas perennes (Nobel, 1977) causa la muerte de la roseta desde el punto de vista fisiológico. Este tipo de reproducción constituye la estrategia monocárpica presente en muchas radiaciones de plantas en ambientes extremos como son las lobelias africanas (Lobeliaceae), las silverswords de Hawai (Asteraceae), dendrosenecio (Asteraceae) y las puyas andinas (Bromeliaceae). Se ha documentado que a pesar de que esta estrategia no es muy común si se encuentra ampliamente distribuida taxonómicamente y por lo general los clados que la presentan tienen un mayor éxito reproductivo que sus hermanos iteróparos (Young y Augspurger, 1991). La estrategia monocárpica en *Agave sensu lato* puede constituir una innovación clave

en el contexto del surgimiento de unos eficientes polinizadores (debido a su alta dependencia en estas plantas y a que recorren grandes distancias) lo que favorece la ampliación de rangos de distribución de una alta heterogeneidad ambiental como es el territorio mexicano.

Perspectivas

El siguiente paso en el estudio de la radiación de *Agave sensu lato* implica el análisis de la evolución de sus áreas de distribución en el cual ya estamos trabajando. Para esto sería interesante aumentar el muestreo en zonas de la República Mexicana que no se hayan incluido (o que tengan un muestreo pobre respecto a su diversidad), más que buscar representar los grupos morfológicos de Gentry (1982) dado que nuestros resultados indican que éstos no forman clados.

Respecto a la evolución de la familia Agavaceae sería interesante incluir un mayor número de representantes del género *Yucca*. Específicamente a *Y. brevifolia* para contar con toda la diversidad morfológica, sin embargo independientemente de eso sería recomendable aumentar el porcentaje de representantes muestreados de éste género. En primer lugar porque es el género que se utilizó como punto de calibración, así como por ser el siguiente género con mayor número de especies dentro de la familia Agavaceae.

Otro aspecto de interés es el de la evolución de la semelparidad en *Agave*. Sin embargo este es un aspecto sumamente complejo conceptualmente, ya que primero habría que definir los diferentes grados de semelparidad debido a que muchas veces a pesar de que el rameto muere el geneto no lo hace. Asimismo mientras algunas especies sólo se reproducen sexualmente otras lo hacen únicamente de manera vegetativa. Una vez definidos los niveles de semelparidad habría que asignar a cada una de las especies a alguno de ellos, para lo cuál aún hacen falta estudios de historia natural, ya que para muchas especies se desconoce de manera certera su estrategia reproductiva. Una vez generada toda esta información, posiblemente se podría determinar el estado ancestral de la estrategia reproductiva de *Agave sensu*

lato y analizar cómo es que este se ha ido modificando correlacionándolo con distintos aspectos ecológicos. Uno de los aspectos ecológicos a valorar sería el tipo de polinización.

Por su parte respecto al papel de sus murciélagos polinizadores definitivamente deberíamos incluir al menos al resto de las especies pertenecientes a la tribu Glossophagini presentes en México. Al tener una filogenia fechada más detallada podríamos hacer correlaciones más finas respecto de la influencia del origen de grupos específicos de estos murciélagos sobre la diversificación de *Agave sensu lato*, su estrategia reproductiva y la evolución de sus áreas de distribución.

Apéndice de distribución de *Agave sensu lato*

Distribución de las especies utilizadas en el presente estudio de <i>Agave sensu stricto</i> en México				
Especie	Autor	Hábitat	Estados	Regiones
<i>A. angustifolia</i>	Haworth, 1812 <i>A. vivipara</i>	Savana tropical y bosque espinoso, Bosque tropical deciduo-seco	Casi todo México hasta Centroamerica (Panamá)	OCA, CP, NV, AM, SMO, SMC, SMS, YUC,
<i>A. deserti</i>	Engelmann, 1875	Desierto	California EUA, BCN y Sonora	BS
<i>A. cupreata</i>	Trealease y Berger, 1915	Cimas de montañas no heladas. Trópico de Cancer Larga estacion de secas	Michocán y Guerrero	NV, SMS
<i>A. inaequidens</i>	Koch, 1960	Pendientes de bosque de pino y encino zonas rocosas abiertas	Dgo., Jal., Hgo., Mich., DF, Mex., Mor., Pue.	NV, SMC, SMO
<i>A. potatorum</i>	Zuccarini, 1832	Zona semi-árida montañosa	Puebla y Oaxaca	NV, SMS
<i>A. fourcroydes</i>	Lemaire, 1864	Cultivado	Cultivada	No silvestre
<i>A. guiengola</i>	Gentry, 1960	En sombra ligera, climas templados a seco. En paredes de feldespató 90° y al pie montaña	Oaxaca (microendémica)	SMS
<i>A. vilmoriniana</i>	Berger, 1913	Acantilados a mas de 1250 m. No resiste heladas.	Son. sur, Sin., Dgo., Jal., Ags.	SMC, AM
<i>A. schidigera</i>	Lemaire, 1861 <i>A. filifera</i> var. <i>schidigera</i>	Pendientes y crecimientos rocosos	Chih., Sin., Dgo., Zac., SLP, Nay., Jal., Gto., Ags., Mich., Gro.	SMC, NV, SMS, AM
<i>A. lechuguilla</i>	Torrey, 1858	Crece en caliche, ausente en zonas volcánicas	EUA: Sur de Nuevo México y Texas. México: Chih., Coah., NL, SLP, Tamps., Dgo., Zac., Qro., Hgo., Mex., DF.	SMO, NV, SMC, AM,
<i>A. petrophila</i>	García-Mendoza y Martínez 1998	Rocky slopes on calcareous soil	Guerrero y Oaxaca	SMS
<i>A. celsii</i>	Jacobi, 1865	Valles y planicies secas	Barraca Meztitlán Hgo.	SMO
<i>A. striata falcata</i>	Zuccarini, 1832	Limitada a valles secos y planicies con precipitación anual <500mm	Coahuila (s3)	SMO
<i>A. striata</i>			Hidalgo, Zimapán (s1)	
<i>A. striata</i>			San Luis Potosí (s2)	
<i>A. garcia-mendoza</i>	Galván y Hernández, 2002	Matorral xerófilo	Hidalgo y Querétaro	SMO
<i>A. victoriae-reginae</i>	Moore, 1875	Climas secos, Matorral xerófilo, Afloramientos de carbonato clacio, paredes verticales	Sur de Coahuila, Centro de Durango, Noreste de Nuevo Leon	SMO

Distribución de las especies utilizadas de la Tribu Poliantheae: <i>Agave sensu lato</i> en México				
Especie	Autor	Habitat	Estados	Regiones
<i>Manfreda guttata</i>	Rose, 1903	Pastizales, sitios abiertos o campos rocosos, cumbres de montañas	Ags., Chih., Dro., Jal., Qro., SLP, Zac.	NV AM
<i>M. revoluta</i>	Klotzch, 1840	Sobre suelo arcilloso	Estado de México	NV
<i>M. fusca</i>	Ravenna, 1987	Bosque de pino-encino	Guatemala	OCA
<i>M. maculata</i>	(Martius) Rose, 1903	Meseta neovolcanica, pendientes rocosas, bosque encino, areas humedas sombreadas	Toluca, DF, Mex., y Taxo Gro., y Oax.	NV, SMS
<i>M. virginica</i>	Linné, 1753	Bosque y suelos rocosos y arenosos	Sureste EUA (de Missouri y Texas al Atlántico)	EUA
<i>M. jaliscana</i>	Rose, 1903	Rocoso, bosques de pino-encino y en pendientes de pastizal	Sonora Sur a Michoacan cerca de Jalisco	SMC, NV, CP
<i>M. pubscens</i>	Regel y Ortgies, 1874	Montañas, pendientes rocosas	Montañas Mor., Oax. y Chiapas	SMS, OCA, NV
<i>M. pringlei</i>	Verhoek, 1976	Bosque de pino y pino-encino	D.F., Hgo., Jal., Mex., Mich., Mor., Oax., Pue.	NV, SMS
<i>Polianthes densiflora</i>	Verhoek, 1976	Sitios abiertos del bosque de pino, sobre suelo calcáreo, en lugares húmedos, en depresiones arenosas	Chihuahua este (microendémica)	SMC
<i>P. graminifolia</i>	Verhoek, 1976	Bosque de pino-encino	Ags., Gto., Jal., Zac.	AM, NV
<i>P. tuberosa</i>	Linné, 1753	Nardo: sólo se conoce cultivada, ancestro <i>P. longiflora</i>	No hay poblaciones silvestres	-
<i>P. geminiflora</i>	Verhoek-Williams 1975	Bosque de pino-encino	Oax., Gro., DF, Mex., Mor., Hgo., Gto., Jal., Mich., Nay.	SMS, NV, SMO
<i>P. howardii</i>	Verhoek-Williams 1976	Suelos bien drenados en sombra parcial, bosque de encino o tropical deciduo	Colima y Jalisco	NV
<i>P. longiflora</i>	Rose, 1903	Bosque de pino-encino	Jalisco y Michoacán (poco)	NV
<i>Prochnyanthes mexicana</i>	(Zuccarini) Rose, 1903	Pendientes secas y rocosas, pino-encino, pastizales, zonas sombreadas y húmedas	Durango hasta Michoacan	NV, SMC

Datos de herbario de todas las especies utilizadas			
Especie	Colector	No. colecta	Localización
<i>Manfreda guttata</i>	Abisaí García Mendoza	6325	Municipio Batopilas, Chihuahua. 1 km al Oeste de Repuchinare.
<i>M. revoluta</i>	Abisaí García Mendoza	6543	Barranca de Malinaltenango, Mpio. Ixtapan de la Sal, Estado de México.
<i>M. fusca</i>	Abisaí García Mendoza	6266	9 km al Noroeste de Zaragoza camino a Comalapa, Mpio. Santa Cruz Balayna. Depto. Chimaltenango, Guatemala. 14° 41 ' 43" N 90° 53 ' 47" W
<i>M. maculata</i>	Abisaí García Mendoza	6087	Mpio. Zacualpan, 7 km al O de Zacualpan camino a Mamatla.
<i>M. virginica</i>	V.E. Mc Nelius	819	Tennessee, Loudon County
<i>M. jaliscana</i>	Calzada J.I., Flores G. y Solís A.	18737	Municipio San Pedro Lagunillas 1 km al S del entronque carretera Tepic-Chapalilla, Nayarit. 21.21 N 104.44 W
<i>M. pubscens</i>	Abisaí García Mendoza	6650	Rincón del Manguito, hacia Loma de Paxtle, Mpio. Lachixonace. Depto. Tehuantepec, Oaxaca
<i>M. pringlei</i>	Abisaí García Mendoza	6858	Mpio. Tlanepantla. Localizado a 1km el Norte de la desviación a San Felipe Neri, carretera Xochimilco-Oaxtepec. 19 2' N 98 56' W.
<i>Polianthes howardii</i>	Eloy Solano	868	Mpio. Ticuicítan Loc. 3 km al O sobre cerro de microondas de TV "Cerro Picila" 50 m antes de llegar al km 213. Altitud 1100 msnm
<i>P. graminifolia</i>	Eloy Solano Camacho	1114	Aguascalientes. Mpio. Jesús María. 1.5 km antes de llegar a la desviación a Milpillás. 21° 55' 09" N 120° 33' 43" W
<i>P. geminiflora</i>	V.W. Y P.I. Steinmann	2625	Michoacán municipio de Morelia a 2.5km SE de San Miguel del Monte doble la carretera a Tumbisca. 19 36' 30" N y 101 07' 30" W
<i>P. tuberosa</i>	Eloy Solano	1177	Mpio. Tantoyuca. Loc. El Manantial, Veracruz. 4.5 km aprox al NO de Ixcanelco. 21° 08' 50" N 98° 08' 49" W
<i>P. longiflora</i>	E. García	2933	Localidad Llano de Zinziro, Municipio Erongarícuaro, Michoacán.
<i>Prochnyanthes mexicana</i>	Gabriel Flores Franco	4079	Xalisco en el camino de terracería a el Carrizal. 21 23' 18 N, 104 57 22 W.
<i>Furcraea longaeva</i>	Abisaí García Mendoza y L. de la Rosa	6161	Falda de la honduras entre Cerro Oroije y Cerro Viborón Municipio San Pedro Nopala, Estado. Oaxaca. 17° 50' 18" N 97° 32' 19" W
<i>F. guerrerensis</i>	Abisaí García Mendoza y L. de la Rosa	6520	20 km al S de Chilpancingo, carretera a Tierra Colorada, Mpio. Mochitlán. Edo. Guerrero
<i>F. guatemalensis</i>	T. Wendt y A. Villalobos	4473	Oaxaca. Mpio. San Miguel Chimalapa. Rancho Quemado, al N del Cerro Pecho Blanco.
<i>F. macdoughallii</i>	Abisaí García Mendoza	6426	Jardín Botánico. Cultivada.
<i>F. parmentieri</i>	Abisaí García Mendoza	6235	3 km al N de Nahuatzen. Mpio. Nahuatzen. Michoacán
<i>F. cahum</i>	E. Martínez S.	27055	Municipio de Calakmul a 12 km al sur de Xan-ha camino a Xpujil 19° 0' 10" N, 89° 17' 37" W.
<i>Beschorneria calcicula</i>	Abisaí García Mendoza	2311	6 km al O de Tamazulapan camino a Chilapa, distrito de Teposcolula. Oaxaca.
<i>B. rigida</i>	Rzedowski	25644	Cerro del Agujón, cerca de El Zapote, aprox. 30 km al SSW de Río Verde. San Luis Potosí.
<i>B. tubiflora</i>	Abisaí García Mendoza	3199	Localidad La Palcita, 5 km al N de Minas Viejas, Mpio. Jacala, Hidalgo.
<i>B. septentrionalis</i>	Medrano	17381	Tamaulipas. Mpio. Hidalgo 3 km al E de Puerto Purificación, porción norte del área quemada de bosque de pino-encino.

Datos de herbario de todas las especies utilizadas (continuación)			
Especie	Colector	No. colecta	Localización
<i>Manfreda guttata</i>	Abisaí García Mendoza	6325	Municipio Batopilas, Chihuahua. 1 km al Oeste de Repuchinare.
<i>M. revoluta</i>	Abisaí García Mendoza	6543	Barranca de Malinaltenango, Mpio. Ixtapan de la Sal, Estado de México.
<i>M. fusca</i>	Abisaí García Mendoza	6266	9 km al Noroeste de Zaragoza camino a Comalapa, Mpio. Santa Cruz Balayna. Depto. Chimaltenango, Guatemala. 14° 41' 43" N 90° 53' 47" W
<i>M. maculata</i>	Abisaí García Mendoza	6087	Mpio. Zacualpan, 7 km al O de Zacualpan camino a Mamatla.
<i>M. virginica</i>	V.E. Mc Nelius	819	Tennessee, Loudon County
<i>M. jaliscana</i>	Calzada J.I., Flores G. y Solís A.	18737	Municipio San Pedro Lagunillas 1 km al S del entronque carretera Tepic-Chapalilla, Nayarit. 21.21 N 104.44 W
<i>M. pubescens</i>	Abisaí García Mendoza	6650	Rincón del Manguito, hacia Loma de Paxtle, Mpio. Lachixonace. Depto. Tehuantepec, Oaxaca
<i>M. pringlei</i>	Abisaí García Mendoza	6858	Mpio. Tlanepantla. Localizado a 1km el Norte de la desviación a San Felipe Neri, carretera Xochimilco-Oaxtepec. 19 2' N 98 56' W.
<i>Polianthes howardii</i>	Eloy Solano	868	Mpio. Ticuicítan Loc. 3 km al O sobre cerro de microondas de TV "Cerro Picila" 50 m antes de llegar al km 213. Altitud 1100 msnm
<i>P. graminifolia</i>	Eloy Solano Camacho	1114	Aguascalientes. Mpio. Jesús María. 1.5 km antes de llegar a la desviación a Milpillas. 21° 55' 09" N 120° 33' 43" W
<i>P. geminiflora</i>	V.W. Y P.I. Steinmann	2625	Michoacán municipio de Morelia a 2.5km SE de San Miguel del Monte doble la carretera a Tumbisca. 19 36' 30" N y 101 07' 30" W
<i>P. tuberosa</i>	Eloy Solano	1177	Mpio. Tantoyuca. Loc. El Manantial, Veracruz. 4.5 km aprox al NO de Ixcanelco. 21° 08' 50" N 98° 08' 49" W
<i>P. longiflora</i>	E. García	2933	Localidad Llano de Zinziro, Municipio Erongarícuaro, Michoacán.
<i>Prochnyanthes mexicanana</i>	Gabriel Flores Franco	4079	Xalisco en el camino de terracería a el Carrizal. 21 23' 18 N, 104 57 22 W.
<i>Furcraea longaeva</i>	Abisaí García Mendoza y L. de la Rosa	6161	Falda de la honduras entre Cerro Oroije y Cerro Viborón Municipio San Pedro Nopala, Estado. Oaxaca. 17° 50' 18" N 97° 32' 19" W
<i>F. guerrensis</i>	Abisaí García Mendoza y L. de la Rosa	6520	20 km al S de Chilpancingo, carretera a Tierra Colorada, Mpio. Mochitlán. Edo. Guerrero
<i>F. guatemalensis</i>	T. Wendt y A. Villalobos	4473	Oaxaca. Mpio. San Miguel Chimalapa. Rancho Quemado, al N del Cerro Pecho Blanco.
<i>F. macdougallii</i>	Abisaí García Mendoza	6426	Jardín Botánico. Cultivada.
<i>F. parmentieri</i>	Abisaí García Mendoza	6235	3 km al N de Nahuatzen. Mpio. Nahuatzen. Michoacán
<i>F. cahum</i>	E. Martínez S.	27055	Municipio de Calakmul a 12 km al sur de Xan-ha camino a Xpujil 19° 0' 10" N, 89° 17' 37" W.
<i>Beschorneria calcicula</i>	Abisaí García Mendoza	2311	6 km al O de Tamazulapan camino a Chilapa, distrito de Teposcolula. Oaxaca.
<i>B. rigida</i>	Rzedowski	25644	Cerro del Agujón, cerca de El Zapote, aprox. 30 km al SSW de Río Verde. San Luis Potosí.
<i>B. tubiflora</i>	Abisaí García Mendoza	3199	Localidad La Palcita, 5 km al N de Minas Viejas, Mpio. Jacala, Hidalgo.
<i>B. septentrionalis</i>	Medrano	17381	Tamaulipas. Mpio. Hidalgo 3 km al E de Puerto Purificación, porción norte del área quemada de bosque de pino-encino.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Arita H.T. and S. R. Humphrey. (1988) Revisión taxonómica de los murciélagos magueyeros del genero *Leptonycteris* (Chiroptera:Phyllostomidae). **Acta Zoológica Mexicana** **29**:60-1
2. Arita H.T. y C. Martínez del Río. (1990) Interacciones flor-murciélago: un enfoque zoocéntrico. **Publicaciones especiales del Instituto de Biología, UNAM, México, D.F. 4**: 1-35.
3. Arita H.T. y G. Ceballos. (1997) Los mamíferos de México: Distribución y estado de conservación. **Revista Mexicana de Mastozoología: vol. 2** 33-71..
4. Arizaga, S. (2000) Pollination ecology of *Agave macroacantha* (Agavaceae) in a mexican tropical desert. II The role of pollinators. **American Journal of Botany** **87**:1011-1017
5. Arizmendi M., Valiente-Banuet A., Rojas-Martínez A. y P. Dávila-Aranda (2002) Columnar Cacti and the diets of nectar-feeding bats, pp. 246-282. In T.H. Fleming and Valiente-Banuet (Eds.). **Columnar cacti and their mutualists**. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona, USA.
6. Avise, J.C. (2000) **Phylogeography: the History and Formation of Species**. Harvard University Press.
7. Axerold, D.I. (1979) Age and origin of the Sonoran Desert. *Occas. Pap. Calif. Acad. Sci.* **132**:1-74.
8. Baldwin, B. and M.J. Sanderson (1998) Age and rate of diversification of the Hawaiian silversword alliance. **Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.** **95**: 9402- 9406.
9. Barraclough, T.G., Vogler A.T.and P.H. Harvey(1998) Revealing the factors that promote speciation. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B** **353**: 241-240
10. Barraclough, T.G., Harvey P.H. and S.Nee (1996) Rate of rbcL sequence evolution and species diversification in flowering plants (angiosperms). **Proceedings of the Royal Society of London, Series B** **263**: 589-591

11. Barraclough, T.G. and S. Nee (2001) Phylogenetics and Speciation. **Trends in Ecology and Evolution** 16: 391-399
12. Berlocher, S.H. (1998) Can sympatric speciation be proven from phylogenetic and biogeographic evidence? In Howard, D.J. and S. H. Berlocher (Eds.) **Endless Forms: Species and Speciation**. Oxford University Press
13. Bogler D., J.C. Pires and J. Frenacisco-Ortega (2006) Phylogeny of Agavaceae based ndhF, rbcL and ITS sequences: implications of molecular data for classification. pp. 313-328. In J.T. Columbus, E.A.Friar, J.M. Porter, L.M. Prince, and M.G. Simpson (Eds.). **Monocots: comparative biology and evolution (excluding Poales)**. Rancho Santa Ana Botanic Garden, Claremont, California. USA.
14. Bolger, D J., and B.B. Simpson. (1996). Phylogeny of Agavaceae based on ITS rADN sequence variation. **American Journal of Botany** 83: 1225-1235.
15. Brooks, D.R. and D. A. McLennan. (1991) **Phylogeny, Ecology and Behaviuor: a Research Program in Comparative Biology**. Chicago University Press.
16. Cadaval-Narezo, A. (1999) Estudio evolutivo de los azúcares del néctar de Agave lechuguilla en el desierto de Chihuahua. Tesis de Licenciatura, UNAM, México D.F. 61p
17. Cole R.F. and D.E. Wilson (2006) *Leptonycteris yerbabuena*. **Mammalian Species** 797:1-7
18. Couper, R. A. 1960. New Zealand Mesozoic and Cainozoic plant microfossils. New Zealand **Geol. Surv. Palaeontol. Bull.** 32:1–87.
19. De Queiroz A. (2002) Contingent Predictability in the Evolution: Key Traits and Diversification. **Systematic Biology** 51: 917-929.
20. Donoghue M.J. and B. Moore (2003) Toward an Integrative Historical Biogeography. **Integrative and Comparative Biology** 43: 261-270.
21. Eguiarte, L.E. (1995) Hutchinson (Agavales) vs. Huber y Dahlgren: análisis moleculares sobre la filogenia y evolución de la familia Agavaceae sensu Hutchinson dentro de las monocotiledóneas. **Boletín de la Sociedad Botánica de México** 56: 45-56.

22. Eguiarte, L.E. y A. Bórquez (1987) Reproductive ecology of *Manfreda Brachystachya* an iteroparous species of Agavaceae. S.W. **Naturalist 32**: 169-179.
23. Eguiarte, L.E. y A. Bórquez (1988) Reducción en la fecundidad de *Manfreda Brachystachya* (Cav.) Rose, una agavacea polinizada por murciélagos: los riesgos de la especialización en la polinización. **Boletín de la Sociedad Botánica de México 48**: 147-149.
24. Eguiarte, L.E., Souza V. y A. Silva-Montellano (2000) Evolución de la Familia Agavaceae: filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. **Boletín de la Sociedad Botánica de México 66**: 131-150.
25. Emmons, L.H. (1997) **Neotropical rainforest mammals. A field guide 2ed.** Chicago:University of Chicago Press.
26. Faegri, K. and Van der Pijl (1979) **The principles of pollination ecology.** Pergammon Press Ltd, Oxford.
27. Felsenstein J. (1973) Maximum likelihood and minimum steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. **Systematic Zoology 22**: 240-249.
28. Felsenstein J. (1978) Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. **Systematic Zoology 27**: 401-410
29. Felsenstein J. (1983) Statistical inference of phylogenies. **Journal of the Royal Statistical Society, Series A. 146**: 246-272.
30. Fleming T.H. (2000) Pollination biology of four species of sonoran desert columnar cacti, pp. 207-223. In T.H. Fleming and Valiente-Baunet (Eds). **Columnar cacti and their mutualists.** The University of Arizona Press, Tucson, Arizona, USA.
31. Fleming T.H. (2000) Population biology of the lesser long-nosed bat *Leptonycteris curasoae* in Mexico and Northern South America, pp. 283-305. In T.H. Fleming and Valiente-Baunet (Eds.) **Columnar cacti and their mutualists.** The University of Arizona Press, Tucson, Arizona, USA.
32. Fulton, R.E. (1983) **Reproductive ecology of *Agave deserti* Engelm. (Agavaceae) in the absence of co-evolved bat pollinators.** M.S. Thesis,

California State University, Fullerton.

33. Good-Avila, S., Souza V., Gaut B. and L. Eguiarte (2004) Timing and rate of speciation in Agave (Agavaceae) **Proceedings of the National Academy of Science U.S.A. 103**: 9124-9129.
34. García-Mendoza, A. (1995) Riqueza y endemismos de la familia Agavaceae en México, pp.59-83 en E. Linares, P. Dávila, F. Ching, R. Bye y T. Elias (Eds.) **Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques**. UNAM. México D.F.
35. García-Mendoza, A. (1998) **Con Sabor a Maguey**. UNAM Pp.114
36. García-Mendoza, A. (2002) Distribution of Agave in Mexico. **Journal of Cactus and Succulent of the Society of America 74**: 177-186
37. Gentry, H.S. (1982) **Agaves of continental North America**. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona, USA. 670 p.
38. Givinish, J. and J. Systma (1997) **Molecular Evolution and Adaptive Radiation**.
39. Gillette, D.D. (1975) Evolution of feeding strategies in bats. **Tebiwa 18**: 39-48.
40. Goldman, N. (1993) Statistical tests of models of nucleotide substitution. **Journal of Molecular Evolution. 36**: 182-198.
41. Gonzáles, A. (2004) **Biología reproductiva y genética de poblaciones del Agave garcia-mendozae**. Tesis de Licenciatura, UNAM, México D.F. 88p.
42. Graybel, A. (1998) It is better to add taxa or characters to a difficult phylogenetic problem? **Systematic Biology 47**: 9-17
43. Hall, T. (2001) <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
44. Harvey, P.H. and M. Pagel (1991) **The comparative method in evolutionary biology**. Oxford University Press.
45. Herendeen, P. S., and P. R. Crane.1995. The fossil history of the monocotyledons. Pp. 1–21 in P. J. Rudall, P. J. Cribb, D. F. Cutler, and C. J. Humphries, eds. **Monocotyledons: systematics and evolution**. Royal Botanic Gardens, Kew, U.K.
46. Hernández, L. (1995) Análisis cladístico de la familia Agavaceae. **Boletín de la Sociedad Botánica de México 56** :57-68
47. Hillis, D.M. (1996) Applications of molecular systematics: the state of the field and

- a look to the future. In *Molecular Systematics*, eds. Hillis, D.M., Mortiz C., and B.K. Mable, pp. 515-543. **Sinauer Associates, Sutherland Massachusetts.**
48. Howell, D.J. (1972). **Physiological adaptations in the syndrome of chiropterophily with emphasis on the bat *Leptonycteris Lydekker***. Ph.D. dissertation, University of Arizona, Tucson.
 49. Howell, D.J. (1974) Bats and Pollen: Physiological aspects of the syndrome of chiropterophily. **Comparative Biochemistry and Physiology** 48 A: 263-276.
 50. Howell, D. and Roth B.S. (1981) Sexual reproduction in agaves: the benefits of bats; the cost of semelparous advertising. **Ecology** 62: 1-7.
 51. Huelsenbeck, J. P. and F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. **Bioinformatics** 17:754-755.
 52. Hughes C. and R. Eastwood (2006) Island radiation on a continental scale: Exceptional rates of plant diversification after uplift of the Andes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** vol.103 no.27 pp. 10334-1339.
 53. Johnson S.D. y Steiner K.E. (2000) Generalization versus specialization in plant pollination systems. **Trends in Ecology and Evolution** 15: 140-143.
 54. Kendall DG (1948) On the generalized birth-death process. **Annals of Mathematical Statistics** 19: 1-15.
 55. Kimura M. (1969) The rate of molecular evolution considered from the standpoint of populaion genetics. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 63(4): 1181-1188.
 56. Klark C. (2004) Unmatched tempo of evolution in the Southern African semi-desert ice plants. **Nautre** vol. 427:63-65.
 57. Koopman, K.F., (1993) Order Chiroptera. In *Mammal Species of the world. A Taxonomic and Geographic referenc.* 2ed., eds. D.E. Wilson and D.M. Reeder. Washington, D.C.: **Smithsonian Institution Press.**
 58. Kuban, J.F. (1989) The pollination biology of two populations of the Big Bend century plant, *Agave havardiana* Trel: a multiple pollinator syndrome with floral specialization for vertebrate pollinators. **Ph. D. dissertation, Syracuse University, Syracuse.**

59. Knox E.B. and Palmer J.D.(1995) Chloroplast DNA variation and the recent radiation of the giant senecios (Asteraceae) on the tall mountains of eastern Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** Vol. 92 pp. 10349-10353
60. Lack D. (1947) Darwin's Finches. **Cambridge University Press.**
61. Lewis O.P. (1998) Maximum Likelihood as an alternative to Parsimony for inferring phylogeny using nucleotide sequence data. Pp. 132-163 in Slotis P., Slotis D. and Doyle J. eds. Molecular systematics in Plants. **Kluwer Academic, Boston.**
62. Lee, M.S.Y.(1999) Molecular clock calibrations and metazoan divergence dates. **Journal of Molecular Evolution.** 49, 385-391:
63. Linder H.P. et al., (2004) Taxon sampling effects in molecular clock dating: An example from African Restionaceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 35 569-582
64. Lutzoni et al (2000) Integrating ambiguous aligned regions of ADN sequences in phylogenetic analyses without violating positional homology. **Systematic Biology** 49(4):628-651
65. Magallón, S. and M. Sanderson (2000) Absolute diversification rates in angiosperm clades. **Evolution** 55 (9) 1762-1780.
66. Magallón, S. (2004) Dating Lineages: Molecular and Paleontological Approaches to the temporal framework of clades. **International Journal of Plant Sciences** 165 (4):7-21
67. Molina-Freaner, F. and L. Eguiarte (2003) The pollination biology of two paniculate agaves (Agavaceae) from northwestern Mexico: contrasting roles of bats as pollinators. **American Journal Botany** 90(7): 1016-1024
68. Moore, B.R., Chan K.M.A. and M.J. Donoghue (2004) Detecting diversification rate variation in supertrees. Pp. 487-533 in O.R.P. Bininda-Emons ed. **Phylogenetic supertrees: combining information to reveal the tree of life. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands.**
69. Muller, J. (1981) Fossil pollen of extant angiosperms. **Botanical Reviews** 47: 1–142.

70. Nee, S., Mooers, A.O., and P.H. Harvey (1992) Tempo and mode of evolution revealed from molecular phylogenies. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 89: 8322-8326
71. Nee, S., Holmes E.C., May R.M., and P.H. Harvey (1994) Extinction rates can be estimated from molecular phylogenies. **Philosophical Transactions: Biological Sciences** 344, 77-82
72. Nee, S. (2001) Inferring speciation rates from phylogenies. **Evolution** 55: 661-668
73. Nobel, P.S. (1988) Environmental biology of agaves and cacti. **Cambridge University Press, New York USA**. 270p.
74. Nylander, J.A.A., Ronquist F., Huelsenbeck J.P., and J.L., Nieves-Aldrey (2004) Bayesian Phylogenetic Analysis of Combined Data. **Systematic Biology** 53 (1): 47-67
75. Ornelas, J.F., Ordano M. and A. Hernández (2002) Nectar oasis produced by *Agave marmorata* Roezl. (Agavaceae) lead to spatial and temporal segregation among nectarivores in the Tehuacan Valley, Mexico **Journal of Arid Environment**. 52: 37-51
76. Pellmyr, O. (2003) Yuccas, yucca moths, and coevolution: a review. **Annual Missouri Botanical Garden** 90: 35-55.
77. Penny, D., P.J. Lockhart, M.A.Steel and M.D. Hendy (1994) The role of models in reconstructing evolutionary trees. In **Models in Phylogeny reconstruction** eds. Scotland, Siebert and Williams, pp. 211-230. **Clarendon Press, Oxford**.
78. Pinkava, D.J., and M.A., Baker (1985) Chromosome and Hybridation studies of agaves. **Desert Plants** 8 (2): 93-100
79. Poe, S. (1998) Sensitivity of phylogeny estimation to taxonomic sampling. **Systematic Biology** 47: 18-31
80. Posada D. and K.A. Crandall (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics** 14:817-818
81. Pybus, O.G. and P.H.Harvey (2000) Testing macroevolutionary models using incomplete molecular phylogenies. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences** 267, 2267-2272
82. Rabosky D.L.(2006) Likelihood methods for detecting temporal shifts in

- diversification rates. **Evolution** 60 (6) pp. 1152-1164.
83. Rauscher J.T. (2002) Molecular phylogenetics of the Espeletia complex (asteraceae): evidence from NRDNA ITS sequences on the closest relatives of an Andean adaptive radiation. **American Journal of Botany** 89 (7): 1074-1084.
 84. Rzedowski, J. (1993) Diversity and origins of the phanerogamic flora of Mexico, pp. 129-144. en: T.P. Ramamoorthy, R Bye, A. Lot y J. Fa [eds.] **Biological Diversity of Mexico. Oxford University Press. New York, USA.**
 85. Ree, R., B.R. Moore, C.O. Webb and M.J. Donoghue (2005) A likelihood framework for inferring the evolution of geographic range on phylogenetic trees. **Evolution**, 59 (11) pp. 2299-2311.
 86. Rhode, K. et al. (1996) Robust phylogenies and adaptive radiations—a critical re-examination of methods used to identify key innovations. **American Naturalist** 148:481-500.
 87. Rocha, M., Good-Ávila S.V., F. Molina-Freaner, H.T. Artia, A. Castillo, A. García-Mendoza, A. Silva-Montellano, B. Gaut, V. Souza and L.E., Eguiarte (2006) Pollination biology and adaptive radiation of Agavaceae, with special emphasis on Agave genus. **Aliso** 22, pp. 329-344
 88. Rojas-Martinez, A., Valiente-Banuet, A., Arizmendi, M. C., Alcantara-Eguren, A. & Arita, H. T. (1999) **Journal of Biogeography** 26, 1065–1077.
 89. Ronquist, F. (1997) Dispersal-vicariance analysis: A new approach to the quantification of historical biogeography. **Systematic Biology** 46: 193-201
 90. Ronquist, F. and J. P. Huelsenbeck. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics** 19:1572-1574.
 91. Sanderson, M. and M.F., Wojciechowski (1996) Diversification rates in a temperate legume clade: Are there "so many species" of Astragalus? **American Journal of Botany** 83:1488-1502.
 92. Sanderson, M.J. (1997) A nonparametric approach to estimating divergence times in the absence of rate constancy. **Molecular Biology and Evolution** 19, 101-109.
 93. Sanderson, M.J. (1998) Estimating rate and time in molecular phylogenies:

- beyond the molecular clock? Pp. 242-264 in Slotis P., Slotis D. and Doyle J. eds. **Plant molecular systematics. Chapman and Hall, London.**
94. Sanderson, M.J. and Donoghue, M.J. (1996) Reconstructing shifts in diversification rates on phylogenetic trees. **Trends in Ecology and Evolution** 11:15-20
 95. Sanderson, M.J. and Doyle (2001) Sources of error and confidence intervals in estimating the age of angiosperms from rbcL and 18S rDNA data. **American Journal of Botany** 88:1499-1516.
 96. Sanderson, M. (2002) PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), 4.0 edn, **Sinauer, Sunderland, MA.**
 97. Sanderson, M. (2003) r8s: inferring absolute rates of molecular evolution and divergence times in the absence of a Molecular Clock. **Bioinformatics** Vol. 19 No.2 301-302
 98. Santos, M. and H.T. Arita (2002) Priority areas for the conservation of new world nectar-feeding bats, pp. 342-363. In T.H. Fleming and Valiente-Baunet eds., **Columnar cacti and their mutualists. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona, USA.**
 99. Sauve, R.J. and S. Zhou (2005) Randomly amplified polymorphic DNA analysis in the genus *Hosta*. **Hortscience** 40 (5): 1243-1245.
 100. Shaw, et al (2005) The tortoise and the hare II. **American Journal of Botany** 92 (1):142-166.
 101. Simmons and Ochoterena (2000) Characters as sequence-based phylogenetic analyses. **Systematic Biology** 49 (2) : 369-381.
 102. Simpson G.G. (1953) **The Major Features of Evolution.** New York: Columbia Univ. Press.
 103. Silva-Montellano, A. (2001) Ecología reproductiva y genética de poblaciones de *Agave lechiguilla* (Torr.) en un gradiente latitudinal. **Ph.D.dissertation. UNAM, México D.F.** 142p.
 104. Silva-Montellano, A. and Eguiarte L.E. (2003) Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechiguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. I: Floral characteristics, visitors, and fecundity. **American Journal of**

Botany 90: 377-387

105. Silva-Montellano, A. and Eguiarte L.E. (2003) Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert.II: Genetic variation, differentiation, and inbreeding estimates. **American Journal of Botany** 90: 700-706
106. Schluter, D. (2000) The ecology of adaptive radiation. **Oxford University Press, Oxford UK**. 288P
107. Slauson, L. A. (2000) Pollination biology of two chiropterous agaves in Arizona. **American Journal of Botany** 87: 825-836
108. Slauson, L. A. (2001) Insights on the pollination biology of *Agave* (Agavaceae). **Haseltonia** 8: 10-23.
109. Sutherland, S.D. (1987) Why hermaphroditic plants produce many more flowers than fruits: experimental test with *Agave mckelveyana*. **Evolution** 41: 750-759.
110. Tambutti, M. (2002) Diversidad del Género *Agave* en México: Una síntesis para su conservación. **Tesis de Licenciatura. UNAM. México D.F.** 53p.
111. Teeling, E. (2005) A Molecular Phylogeny for Bats Illuminates Biogeography and the Fossil Record. **Science** Vol.307 pp.580-584
112. Tidwell, W.D. and L.R. Parker (1990) *Protyucca Shadishii* gen. Et sp. Nov., An Arborescent Monocotyledon with Secondary Growth from the Middle Miocene of Northwestern Nevada, USA. **Review of Paleobotany and Palynology**, 62 pp.79-95
113. Toledo, V.M. y Ordóñez M. (1998) El Panorama de la biodiversidad de México: Una revisión de los hábitats terrestres. **En Diversidad Biológica de México: Orígenes y distribución**, eds. T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa México: **Instituto de Biología , Universidad Nacional Autónoma de México**.
114. Trejo, R. E. (2007) Dinámica de la polinización en *Agave difformis*, *A. garciae-mendozae* y *A. striata* (Agavaceae) en la Barraca de Mezitlán, Hidalgo. **Tesis de Licenciatura UNAM**
115. Van der Pijl, (1936) **Fledermaus und Blumen Flora** 131: 1-40
116. Verhoek, S. (1975) A study of the tribe Polianthae (including *Manfreda*) and revisions of *Manfreda* and *Prochnyanthes* (Agavaceae). **Ph.D.dissertation**,

Cornell University, Ithaca, New York, USA.401p.

117. Waser, N. and J. Ollerton (2006) From Specialization to Generalization. **University Chicago Press.**
118. Webb, S.A., J.A. Graves, C. Macias-Garcia, A.E. Magurran, D.O. Foighil and M.G. Ritchie (2004) Molecular phylogeny of the livebearing Goodeidae (Cyprinodontiformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution** 30 (3): 527-44.
119. Wetterer, A.L., M.V. Rockman, and N.B. Simmons. (2000) Phylogeny of Phyllostomid Bats (Mammalia: Chiroptera): Data From diverse morphological systems, sex chromosomes and restriction sites. **Bulletin of the American Museum of Natural History.** no. 248 200p.
120. Wiens, J. J. and M. J. Donoghue, (2004) Historical biogeography, ecology, and species richness. **Trends in Ecology and Evolution** 19: 639-644
121. Wilkinson, G.S. and Fleming T.H. (1996) Migration and evolution of the lesser long-nosed bats *Leptonycteris curasoae*, inferred from mitochondrial DNA. **Molecular Ecology** 5: 329-339
122. Wollenberg, K., J. Arnold and J.C. Avise (1996) Recognizing the forest for the trees: testing temporal patterns of cladogenesis using a null model of stochastic diversification. **Molecular Biology and Evolution** 13: 833-49
123. Yang Z. et al. (1994) Comparison of models for nucleotide substitution used in maximum-likelihood phylogenetic estimation. **Journal of Molecular Evolution** 11: 316-324.
124. Young and Aupurberg (1991) Ecology and Evolution of Long-Lived Semelparous Plants. **Trends in Ecology and Evolution** vol. 6 no. 9 Pp. 285-289
125. Zharkikh, A. (1994) Estimation of evolutionary distances between nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution** 39: 315-329

I. INTRODUCCIÓN

1. Diversidad de Agaváceas en México

México es considerado como un país con una biodiversidad muy alta, que resulta en parte de su gran diversidad de ecosistemas, ya que no sólo cuenta con un gran número de especies distintas a lo largo de todo su territorio, sino que el recambio de estas en poca distancia suele ser muy grande. Por la gran variación en la identidad de las especies que integran cada uno de los distintos tipos de ambientes, las interacciones entre éstas suelen ser muy variables. En particular los ambientes áridos y semiáridos de México poseen una biodiversidad muy alta, la cual en lo que respecta a vegetación tiene un componente importante causado por las familias Cactaceae y Agavaceae. Las plantas pertenecientes a éstas familias son consideradas especies clave de montañas y desiertos mexicanos, tanto por su abundancia como por la cantidad de recursos que producen.

La Familia Agavaceae *sensu stricto* está constituida por 9 géneros (293 spp.) de los cuáles México cuenta con más del 50% de las especies de cada uno de ellos como se muestra en la Tabla 1, modificada de García-Mendoza (1998). Lo que actualmente se maneja como *sensu stricto* hace referencia a conceptos (taxonómicos) clásicos tanto de familias como de géneros, sin embargo hoy sabemos que la familia Agavaceae incluye algunos géneros asiáticos y norteamericanos que no se encuentran en México (ej: *Chlorogalum*, *Hesperocallis*, *Camassia* y *Hosta*, Bogler et al. 2006).

Tabla 1. Distribución de los Miembros de la Familia Agavaceae sensu stricto		
GENEROS	TOTAL SPP.	SPP. EN MÉXICO
<i>Manfreda</i>	28	27 (96%)
<i>Polygonum</i>	13	13 (100%)
<i>Prochnyanthes</i>	1	1 (100%)
<i>Agave</i>	166	125 (75%)
<i>Furcraea</i>	20	11 (55%)
<i>Beschorneria</i>	7	7 (100%)
<i>Yucca</i>	50	30 (60%)
<i>Hesperoyucca</i>	1	1 (100%)
<i>Hesperaloe</i>	3	3 (100%)
Total	289	218 (75%)

2. Potencial Radiación Adaptativa en *Agave sensu lato*

El 74% de la diversidad de Agavaceae se encuentra concentrada en dos géneros: *Yucca* (50 spp) y *Agave sensu stricto* (116 spp), lo cual podría tratarse en ambos casos de radiaciones adaptativas. Ambos géneros presentan un diseño similar (rosetas suculentas de vida larga) pero una estrategia reproductiva contrastante. Las yucas son plantas iteróparas de vida larga con polinización especializada y constituyen uno de los ejemplos clásicos de coevolución estricta con sus polinizadores: diversas especies de polillas del género *Tegeticula* (Pellmyr, 2003). Los agaves son monocápicos y generalistas con un síndrome quiropterofílico (Johnson y Steiner, 2000; Molina-Freaner y Eguiarte, 2003; Rocha et al., 2006). A pesar de solo tener un evento reproductivo por rameto, el geneto de los agaves tiene la oportunidad de reproducirse más de una vez ya que muchos tienen la capacidad de diversas formas de clonación (Gentry, 1982; Eguiarte et al., 2000).

2.1 Radiación Adaptativa

El concepto de radiación adaptativa proviene del campo de la paleontología, propuesto por Fairfield Osborne en 1902 como opuesto a la convergencia evolutiva. Poco después es George Gaylord Simpson (1953) quien propone el término de “innovaciones clave” para las características biológicas capaces de acelerar la diversificación. Estos términos han cambiado muy poco conceptualmente, sin embargo las aproximaciones de estudios se han modificado drásticamente. David Lack (1947) fue quien le dio sentido ecológico al concepto de radiación adaptativa, con su estudio del desplazamiento de caracteres en los pinzones de Darwin. Al comienzo de la discusión contemporánea había al menos dos posturas al respecto: una enfatiza el rápido surgimiento de muchas especies en relación a su grupo hermano (Slowinski y Gruyer, 1994; Sanderson y Donoghue, 1994, 1996; Barraclough et al., 1996; Rhode et al., 1996; Sanderson y Wojciechowski, 1996) y para la otra lo más relevante es la conquista de nuevos nichos enfatizando las adaptaciones (Givinish, 1997). De forma que un rápido incremento en el número de especies sin invasión de nuevos nichos es una radiación no adaptativa.

Recientemente, Schluter (2000) considera que una radiación adaptativa implica la rápida proliferación de especies, mediante la diferenciación de un ancestro en un conjunto de especies que habiten una variedad de ambientes y que difieran en los caracteres (morfo-fisiológicos) utilizados para explotar esos ambientes. De acuerdo con esta definición una radiación adaptativa puede detectarse mediante 4 criterios: ancestría común, correlación fenotipo-ambiente, utilidad del carácter y especiación rápida. Tanto para valorar la ancestría común como la especiación rápida se requiere de un análisis filogenético calculando las tasas de diversificación. Respecto a la correlación fenotipo-ambiente, por lo general la evidencia proviene de observaciones de campo que indiquen que las diferencias fenotípicas de las especies están asociadas con el uso diferencial de recursos u otras características del ambiente. Para probarlo de manera estadística y controlar la no independencia de los atributos que la filogenia puede introducir, se utiliza el método comparativo (Harvey y

Pagel, 1991). Por su parte, la valoración de la utilidad del carácter requiere una aproximación experimental (Givinish, 1997).

2.1.1 Aproximación Filogenética Molecular

Esta es una manera de considerar la historia evolutiva en los estudios adaptativos, que generalmente se quedaban a nivel ecológico, permitiendo el análisis del carácter de interés en un mayor número de especies y en el contexto de su filogenia. Esta aproximación permite detectar especies capaces de proporcionar información relevante para responder nuestras preguntas de manera más profunda. Esto hace posible que el estudio se complemente con trabajos ecológicos de campo y de genética de poblaciones mucho más específicos.

Las filogenias moleculares a nivel de especies proveen de un registro indirecto de los eventos de especiación que han originado las especies actuales, así como del "tempo" (ritmo) de la evolución del grupo (Hillis et al., 1996; Avise, 2000). La información geográfica y los atributos ecológicos de las especies junto con filogenias moleculares ofrecen un enorme potencial para investigar las causas generales de las tasas de especiación dentro de los clados (Brooks y McLennan, 1991; Barraclough et al., 1998; Berlocher, 1998), así como explorar preguntas evolutivas centrales como la variación de las tasas de especiación entre diferentes linajes, tiempo y regiones geográficas (Barraclough y Nee, 2001).

2.1.2. Métodos probabilísticos con Modelos de Substitución

Los métodos para inferir una filogenia se dividen en los de distancia, que la construyen mediante una matriz de distancia generada a partir de los datos empíricos, y los que utilizan directamente la matriz de datos discretos. Una ventaja que proporciona utilizar los caracteres discretos directamente es la posibilidad de estimar los estados de carácter ancestrales. Tanto la Máxima Parsimonia como la

Máxima Verosimilitud y la Inferencia Bayesiana, utilizan la matriz de caracteres discretos. La máxima parsimonia se distingue de todos los demás métodos (incluyendo los de distancia) por no utilizar un modelo de sustitución de nucleótidos explícito. Cuando se pretende reconstruir una filogenia con base en nucleótidos, se utiliza la evidencia actual para llegar a una inferencia acerca de la historia evolutiva de un grupo de organismos o genes (Felsenstein, 1973).

Uno de los argumentos para el uso de modelos es que nos permiten incorporar lo que sabemos, tanto de la filogenia como de los procesos de sustitución (Lewis, 1998). Aunado a esto tienen la ventaja de que los modelos utilizados en la inferencia filogenética se pueden poner a prueba (Goldman, 1993; Penny et al., 1994; Yang et al., 1994) y que son capaces de estimar otros parámetros (como las longitudes de rama) que pueden llegar a ser tan relevantes o aún más que la propia topología del árbol.

Contrariamente a lo que muchas veces se piensa, el uso de modelos nos permite controlar y por lo tanto analizar mejor las variables involucradas. Respecto a la inferencia bayesiana, su adaptación al ámbito de la reconstrucción filogenética consiste en la exploración del universo de árboles mediante cadenas de Markov, en lugar de resolver el algoritmo bayesiano. Esta modificación optimiza el tiempo computacional, al punto de hacerlo sumamente accesible aún para análisis que involucren varios genes con modelos independientes y un gran número de terminales. Posteriormente se calcula la verosimilitud de las filogenias obtenidas incluyendo topología, longitudes de rama y demás parámetros del modelo elegido y los va acumulando en un archivo, por un lado las filogenias estimadas y por otro los valores de los parámetros con su verosimilitud asociada a cada una de ellas. El número de puntos de inicio de búsqueda depende del número de generaciones que se soliciten, mientras que el número de árboles incluidos en el archivo de salida (output) de la frecuencia de muestreo.

2.1.3 Estimación de las edades del origen y divergencias de los clados

Los métodos moleculares de estimación de edades se basan en el hecho de que al paso del tiempo se acumulan diferencias moleculares en las secuencias. La hipótesis del reloj molecular se basa en la Teoría Neutral de la evolución molecular propuesta por Motoo Kimura en 1969, la cual supone que las sustituciones nucleotídicas ocurren de manera constante, de manera que el grado de cambios acumulados entre dos secuencias es directamente proporcional al tiempo desde que se separaron de su ancestro común.

Las mutaciones son modificaciones en el ADN que ocurren al azar, dentro de éstos cambios están las sustituciones de nucleótidos que es precisamente lo que buscan modelar la mayoría de los modelos de reconstrucción filogenética. A pesar de ser un proceso estocástico se sabe que existen sesgos ocasionados principalmente debido a que hay regiones más susceptibles de mutar (hotspots) así como al cociente entre transiciones/transversiones, que por lo general es mayor a uno. Debido a lo anterior se opta por un modelo de sustitución distinto al de Poisson como lo es la distribución gamma. Por esto la selección del modelo de sustitución correcto es crucial para la estimación de tasas y tiempos de divergencia. El modelo debe tomar en cuenta las características relevantes de los datos sin incluir parámetros superfluos, ya que esto reduciría su poder de predicción y generaría excesiva varianza en los parámetros estimados (Zharkikh, 1994; Lewis, 1998; Sanderson, 1998).

La naturaleza de periodicidad estocástica de la sustitución molecular introduce un error inherente (Hillis et al., 1996) que se incrementa cuando las tasas son altas, pero decrece con el aumento de los datos: longitud y número de secuencias (Sanderson, 1998). Uno de los problemas más serios en lo que respecta a la fechación radica en asumir constancia en las tasas de sustitución en ausencia de ésta (Sanderson, 1998), de ahí que la prueba de la hipótesis del reloj molecular resulta crucial para la estimación de edades y tasas.

Mientras la estimación de las longitudes de ramas en una filogenia como el producto de la tasa de sustitución y el tiempo transcurrido no representa un

problema, su estimación independiente si lo es. La separación de la tasa y duración de una rama sólo puede lograrse mediante la incorporación independiente de uno o ambos parámetros. En este estudio, las edades fósiles con las que se calibró la filogenia constituyen esa información independiente del parámetro tiempo. La calibración consiste en asignar una edad absoluta a un nodo para convertir los tiempos de divergencia relativos en unidades absolutas de tiempo (millones de años). La adecuada selección del nodo de calibración es otro punto crítico en la fechación, de ahí que este nodo debe representar una relación filogenética con un buen soporte, es decir presumiblemente correcta. Asimismo la edad asignada al nodo debe tener una alta probabilidad de estar cercana al tiempo real de la separación del linaje. Es posible asignar límites temporales a los nodos, imponiendo límites mínimos y máximos a las posibles edades; esto también sirve para desacoplar el binomio tiempo-tasa, sobretudo en ausencia de reloj molecular. Frecuentemente los límites se asignan como edades mínimas, indicando que la divergencia ocurrió al menos en ese tiempo (Magallón, 2004). Sin embargo también se puede asignar como límite máximo (Sanderson y Doyle, 2001) cuando la edad tiene una alta probabilidad de estar cerca de la edad real del linaje.

El ejemplar fósil a utilizarse puede formar parte del grupo corona o del troncal. El grupo corona consiste en el clado monofilético menos inclusivo que incluya a todos los representantes actuales del clado, más todas las especies extintas que divergieron posteriormente a la divergencia más antigua que origino 2 especies actuales. Por su parte el grupo troncal contiene al grupo corona más todas las especies extintas que se encuentran entre la divergencia del grupo corona y su clado hermano, lo cual se muestra gráficamente en la Figura 1.

Para estimar tiempos de divergencia existen métodos que suponen constancia en las tasas y que consisten en hacer una regresión lineal de distancias moleculares del tiempo transcurrido junto con una optimización de máxima verosimilitud de las edades de los nodos y más recientemente, otros métodos que permiten heterogeneidad entre las tasas (Magallón, 2004), un ejemplo de éstos son los métodos NPRS Non-Parametric Rate Smoothing (Sanderson, 1997) y PL Penalized Likelihood (Sanderson 2002). Sin embargo estimaciones empíricas indican que no se

debe suponer constancia en las tasas sin poner a prueba esta hipótesis. Una vez determinado si los datos se ajustan a un reloj molecular o no, se procede al fechado de la filogenia. Inferir las edades de los clados es complicado, debido a la naturaleza del proceso de sustitución y a las incertidumbres del registro paleontológico.

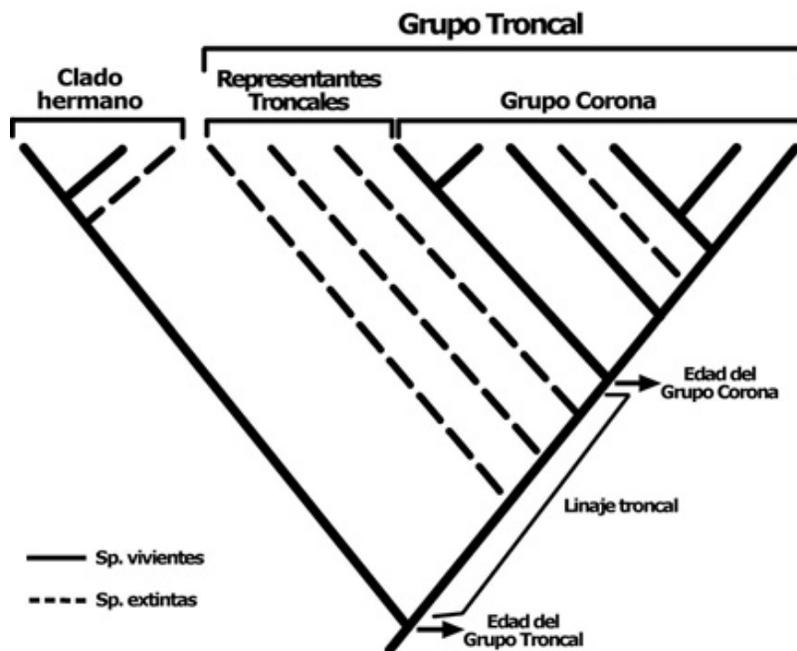


Figura 1. Grupos Troncal y Corona. En esta filogenia hipotética demuestra gráficamente la definición de los grupos troncal y corona. La línea continua representa especies vivientes mientras que la punteada a especies extintas. Figura tomada de Magallón y Sanderson (2001).

2.1.4 Tasas de especiación en el Tiempo

Para el estudio de la variación temporal en las tasas de diversificación se requiere de la estimación de las longitudes de las ramas que se utilizan para estimar el tiempo de los eventos de especiación. Los tiempos de espera entre los eventos de especiación sucesivos se comparan con la distribución esperada bajo un proceso de

ramificación estocástico con tasas constantes en el tiempo (Wollenberg et al., 1996).

El modelo nulo más ampliamente utilizado para el análisis de las tasas de diversificación es el modelo de nacimiento-muerte de Kendall (1948), donde el número de clados crece bajo una tasa constante de especiación y extinción para cada linaje. Se han desarrollado una gran cantidad de estadísticos paramétricos y no paramétricos para evaluar que tanto se aleja la distribución de los nodos internos de una filogenia de un proceso de nacimiento puro, que es un caso especial del modelo de Kendall donde la extinción $\mu = 0$. A pesar de que los métodos de nacimiento puro (γ es el más utilizado) pueden detectar decrementos temporales en las tasas de diversificación, son incapaces de detectar aceleramientos en las tasas (Pybus y Harvey, 2000; Nee, 2001) que es precisamente lo que se espera en una radiación. Otra alternativa es una aproximación mediante pruebas de verosimilitud, que permite preguntar si es más probable que los datos observados se generaran mediante un modelo con una tasa constante o variable temporalmente, sin asumir ninguna parametrización en el modelo mediante la implementación del modelo de nacimiento-muerte (Rabosky, 2006). Esta aproximación tiene la ventaja de que nos proporciona estimados de tiempos y magnitud de los incrementos o decrementos en las tasas, sin embargo para detectar estos cambios se requiere de un tamaño de muestra más o menos grande ($N =$ de 60 a 100 especies) y que la magnitud del cambio sea grande.

Rabosky (2006) propone utilizar los puntos de ramificación de un árbol ultramétrico y probar el ajuste de varios modelos macroevolutivos (e.g., nacimiento-muerte) y estima la tasa de diversificación. Asimismo con LASER (Rabosky 2006) es posible de detectar donde hubo un cambio en la tasa de diversificación en el tiempo. Esto lo hace tomando el vector de los tiempos de ramificación de cada nodo en un árbol ultramétrico y calcula su verosimilitud bajo diferentes modelos de evolución: nacimiento puro y nacimiento muerte bajo una tasa constante RC así como nacimiento puro con 1 o 2 tasas de diversificación (modelos yule 2 o 3), denso-dependientes (nacimiento puro hasta la capacidad de carga K) y nacimiento-muerte con tasas variables RV. Posteriormente compara la verosimilitud de éstos modelos utilizando el criterio de información AIC de Akaike (1973) en lugar de la tradicional

prueba de cociente de verosimilitud (LRT).

El AIC es una función del logaritmo de la verosimilitud y del número de parámetros libres en el modelo:

$$AIC = -2 \log L + 2p$$

donde p es el número de parámetros que son estimados de los datos. Mientras el aumento en el número de parámetros mejora el ajuste del modelo a los datos, también incrementan el término de penalización ($2p$). De ésta manera no sólo es posible evaluar si la tasa de diversificación se ha mantenido constante sino identificar el modelo macroevolutivo que mejor se ajustaba y conocer la magnitud y fecha de los incrementos. Rabosky (2006), basado en análisis de simulaciones, considera que elegir el AIC más pequeño no es suficiente, sino que hay que calcular la diferencia entre los AICs menores estimados para cada uno de los modelos de tasas variables AIC_{RV} y el mejor de tasa constante AIC_{RC}

$$\Delta AIC_{RV} = AIC_{RC} - AIC_{RV}$$

ΔAIC_{RV} es positivo si el modelo que mejor se ajusta implica variación en las tasas, mientras que es negativo cuando lo es uno de tasa constante. El sentido de analizarlo de esta manera es que posibilita identificar una diferencia en los valores de AIC que sea estadísticamente significativa $\alpha \leq 0.05$. El valor de ΔAIC_{RV} que produce una tasa de $\alpha \leq 0.05$ de error tipo 1 corresponde al 95% de la distribución de los valores de ΔAIC_{RV} derivados de las simulaciones de árboles para la estimación del valor crítico específico tomando en cuenta el muestreo para la construcción de la filogenia. Finalmente se estima el valor de $\Delta AIC = AIC$ (menor) – AIC (del modelo en cuestión) para cada modelo evaluado de manera que el modelo con el mejor ajuste (menor valor de AIC) tendrá un $\Delta AIC = 0$ y si la diferencia en la magnitud de ΔAIC del siguiente modelo con mejor ajuste sobrepasa el valor crítico se rechaza.

2.2 Antecedentes en *Agave sensu lato*

Tradicionalmente se distingue el género *Agave* de la tribu *Poliantheae*, que comprende los géneros herbáceos (*Manfreda*, *Polianthes* y *Prochnyanthes*) por tener hojas fibrosas suculentas de vida larga mientras que los otros tienen hojas de cartáceas (delgadas como papel) a poco suculentas y son estacionales. En la Tabla 2, construida a partir de la clave de Verhoek (1975), se muestran las características diagnósticas de estos dos grupos.

Tabla 2. Caracteres diagnósticos de <i>Agave</i>		
Estado de Caracter	<i>Agave sensu stricto</i>	Agaves Herbáceos
Tipo de hojas	Gruesas - Fibrosas	Cartáceas
Duración de las hojas	Vida larga	Estacionales
Capas de endotecio	3 – 6	2 – 3
Tubérculo	Ausente	Presente

Cabe destacar que el género *Agave sensu stricto* es de suma importancia nacional, tanto cultural como económicamente. Las plantas pertenecientes a este género se han utilizado por parte de las diversas culturas mesoamericanas. El maguey constituyó una deidad conocida como Mayahuel, diosa madre de muchos dioses de la embriaguez, representada en múltiples códices. El uso del maguey y aguamiel, a los cuales se les atribuye un origen divino, estaba ligado a eventos rituales. Actualmente sus bebidas alimenticias son una importante fuente nutricional para muchas etnias. Asimismo se utiliza para la elaboración de diversos platillos tradicionales. Su importancia económica para el país radica en el tequila y mezcal a partir de un gran número de especies, así como por la extracción de fibras de henequén a partir de *A. fourcroydes* y otras especies.

Por su parte *Agave sensu stricto* se divide en dos subgéneros de acuerdo al tipo de su inflorescencia: *Littaea* (espigada) y *Agave* (paniculada). A su vez cada uno de estos subgéneros tiene varios grupos morfológicos. A pesar de lo mencionado anteriormente, estudios tanto morfológicos (Hernández, 1995) como moleculares (Eguiarte et al., 2000; Bogler y Simpson, 1996; Good-Avila et al., 2006) recientes

muestran que los géneros *Agave sensu stricto*, *Manfreda*, *Polianthes* y *Prochnyanthes* constituyen un grupo monofilético de 208 spp conocido como *Agave sensu lato*, del cual México cuenta con un 80% de las especies. Las relaciones al interior de cada uno de estos grupos no han podido resolverse, debido a que existe muy poca variación entre especies, sugiriendo una posible diversificación reciente.

Análisis moleculares de las tasas de diversificación de *Agave sensu lato* sugieren dos momentos de especiación acelerada (Good-Avila et al., 2006), uno entre 8-6 MA y el más reciente 3-2.5 MA. El primero podría estar asociado a la desertificación de Norteamérica que comenzó alrededor de hace 8-15 MA (Axelrod, 1979) acoplado a innovaciones clave (e.g., rosetas con hojas fibrosas y suculentas), intensificado por deriva génica, como en el caso de la radiación de las Aizoaceae en Sudáfrica (Klark, 2004). El surgimiento de innovaciones clave en ese contexto específico, es decir en ese nuevo ambiente y en combinación con otros caracteres ya presentes en este grupo (De Queiroz, 2002) pudo conferirles ventajas adaptativas muy grandes. Los caracteres clave podrían ser adaptaciones morfofisiológicas como hojas en roseta, así como raíces muy extendidas y superficiales que permiten una captura muy eficiente de agua (Gentry, 1982), de ahí que *Agave sensu stricto* sea considerado el género más tolerante a condiciones áridas dentro de la familia (Nobel, 1988). Por su parte, todas los integrantes de *Manfreda*, *Polianthes* y *Prochnyanthes* podrían constituir otra radiación que les permitió invadir ambientes más húmedos; sin embargo debido a que Good-Avila et al. (2006) no incluyó suficientes representantes herbáceos no fue posible detectar su diversificación.

De Queiroz (2002) propone que los factores que pueden influenciar la manera en que un carácter clave afecta la diversidad pueden categorizarse en tres clases: A) por su interacción con otros taxa, B) por la interacción con otros caracteres del mismo organismo y C) por el ambiente físico. Respecto a la primera clase, la estrategia monocárpica pudo permitirles la entrada a una nueva zona adaptativa inaccesible a los otros miembros de su comunidad. Este tipo de reproducción pudo ser seleccionada por sus murciélagos polinizadores, debido a que el esfuerzo

requerido para satisfacer las necesidades nutricionales de estos animales es muy alto. Con base al elevado requerimiento nutricional de estos polinizadores, se ha propuesto la existencia de una correlación positiva entre la producción de néctar y la altura de la inflorescencia con la polinización por murciélagos (Howell y Roth, 1981). Estudios teóricos y empíricos coinciden en que esta estrategia reproductiva tiende a surgir en ambientes con una alta heterogeneidad donde el éxito reproductivo es poco frecuente y está correlacionado positivamente con el esfuerzo reproductivo (Young y Augspurger, 1991). Se sabe que el surgimiento de la estrategia monocárpica esta relacionado con radiaciones impresionantes en plantas de climas áridos y relativamente aislados como es el caso de las espeletias andinas (Rauscher 2002), las silversword en Hawaii (Baldwin y Sanderson, 1998), las lobelias gigantes y los dendrosenecios de África (Knox y Palmer 1995).

La polinización por murciélagos para especies del género *Agave sensu lato* no está sugerida únicamente por su fenotipo floral, cantidad de néctar y concentración de azúcar en éste (quiropterofilia), sino que en muchos casos está documentada por observaciones y experimentos de campo (Arizaga et al., 2000; Eguiarte, 2000; Molina-Freaner y Eguiarte, 2003; Rocha et al., 2006 y Trejo, 2007). De los murciélagos, las tres especies del género *Leptonycteris* se alimentan básicamente del néctar y polen de cactáceas columnares y agaves (Arita y Humphrey, 1988; Rojas-Martínez et al., 1999; Cole y Wilson, 2006).

2.2.1 Distribución de *Agave sensu lato*

Del 75% de las especies que se encuentran en México de *Agave sensu stricto*, 68% es microendémico lo que implica que se encuentra en menos del 3% de su área de distribución que es menor a 30,000 km² (García-Mendoza, 2002). Un aspecto muy interesante de su distribución es que la mayoría de las especies tienen áreas de distribución restringidas y se encuentran únicamente en unos pocos hábitats y rangos montañosos. Las especies se encuentran en ambientes muy diversos. Son

abundantes en bosque tropical decíduo, matorral xerófito, pastizal, desierto y chaparral. La mayor diversidad y densidad poblacional (68% de las especies mexicanas) se encuentra en comunidades que se destacan por ser calidas y secas. El 30 % restante se encuentra en bosques de pino-encino. Por su parte son escasos (4 spp.) en selvas así como en bosque tropical en el sur del país, que se caracteriza por alta humedad y neblina todo el año. Se encuentran desde el nivel del mar hasta 3400 m, más comúnmente entre 1000-2000 m. Crecen preferentemente en suelo de roca ígnea ácida, volcánica y caliza (García-Mendoza, 2002).

La mayor diversidad de *Agave* ocurre en el centro de México. En primer lugar destaca el Valle de Tehuacan-Cuicatlan en el límite entre Puebla y Oaxaca con un mosaico de ambientes (bosque tropical decíduo, matorral xerófito y chaparral) de clima semiárido (precipitación anual de 400 mm), todos ellos constituidos por comunidades ricas en plantas suculentas, espinosas y en forma de roseta. En segundo lugar se encuentra el Noroeste de la Sierra Madre Occidental entre Sonora, Chihuahua y Sinaloa, área caracterizada por bosque de coníferas. El tercer lugar en diversidad lo ocupa el Desierto Chihuahuense en el Noreste de México. Éste se localiza entre San Luis Potosí, Nuevo León y Tamaulipas, constituida por desierto y chaparral caracterizados por un clima sumamente árido (<400 mm precipitación anual) con altas temperaturas en verano.

Otras áreas con diversidad considerable se encuentran en la Barraca de Meztitlán; Hidalgo, Baja California Sur, Coahuila, Michoacán, Chiapas y el Estado de México (García-Mendoza, 2002).

Si en lugar de considerar los límites políticos, analizamos su distribución de acuerdo a provincias biogeográficas resulta que Mega México 3 (Rzedowski, 1993) que va de EUA hasta Nicaragua, cuenta con el 78% de las especies, casi todas endémicas. Asimismo se encuentran especies de *Agave* s.s en todas las islas del Caribe (Las Antillas, Bahamas, Aruba, Curaçao, Trinidad y Tobago) al igual que en centro América y el Norte de Sudamérica: Colombia, Perú y Venezuela (García-Mendoza, 2002). Respecto a la distribución de los agaves herbáceos, estos son en su mayoría mexicanos, exceptuando unas pocas Manfredas que se encuentran en el

sureste de EUA y las de Centroamérica. El resto de las especies de *Manfreda* están distribuidas en toda la república mexicana excepto en las penínsulas de Baja California y de Yucatán. Por su parte *Polianthes* (principalmente en Jalisco) y *Prochnyanthes mexicana* (que va de Durango y Nayarit a Michoacán) son géneros endémicos de México (Rocha et al., 2006).

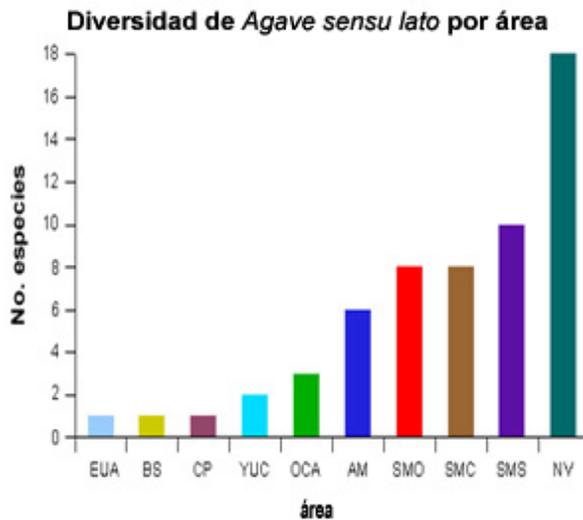
En el estudio de una radiación adaptativa el espacio físico donde se han venido dando los eventos de especiación y extinción es un factor de suma importancia, de ahí el interés en el análisis de su historia biogeográfica. Las propiedades actuales de las comunidades reflejan los orígenes filogenéticos de los taxa que contienen, así como los eventos únicos y circunstancias geográficas que ocurrieron durante su formación. Recientemente se han desarrollado métodos que al igual que DIVA (Ronquist 1996; 1997) buscan inferir la historia geográfica de los linajes, pero que a diferencia de éste incorporan información independiente a la filogenia como puede ser, fechas y tiempos de conexiones entre áreas, así como otras oportunidades de dispersión entre éstas junto con los tiempos de divergencia de los linajes (Donoghue y Moore, 2003; Weins y Donoghue, 2004; Ree et al., 2005).

El siguiente paso del proyecto será precisamente analizar su historia biogeográfica con uno de éstos métodos para lo cual se requiere asignar una área de distribución actual a cada una de las especies utilizadas para construir la filogenia fechada. Para esto utilizamos las áreas fisiográficas de la República Mexicana que se observan en la Figura 2 A y asignamos a cada una de las especies de *Agave sensu lato* todas las áreas en que se encontraran presentes actualmente. Cómo se puede observar en 2 B el Eje Neovolcánico contiene la mayor diversidad seguido por las Sierras Madre del Sur, Occidental y Oriental. En 2 C se muestra lo mismo desde el punto de vista de las especies, la mayoría de ellas se encuentra en menos de 6 áreas. A pesar de que no incluimos a todas las especies de *Agave sensu stricto*, sino que fue un muestreo, de éste junto con la misma proporción de los géneros herbáceos pertenecientes a *Agave sensu lato*, los resultados concuerdan en que la mayoría de las especies son endémicas y que la mayor diversidad de especies se encuentra concentrada en el centro de la República Mexicana.

A



B



C

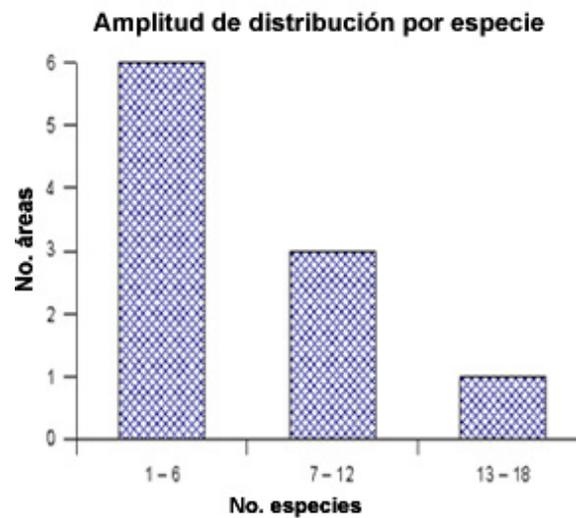


Figura 2. A. Áreas Fisiográficas de México. Las iniciales significan: EUA Estados Unidos de América, BS Península de Baja California y Sonora, CP costa del Pacífico, SMC Sierra Madre Occidental, SMS Sierra Madre del Sur, SMO Sierra Madre Oriental, YUC península de Yucatán, AM Altiplano Mexicano, NV Eje Neovolcánico, OCA occidente de Centroamérica. En **B** se muestra que la el Eje Neovolcánico cuenta con la mayor diversidad seguido de la SMS y en **C** se muestra que la mayoría de las especies se encuentran en una sola área (dist. Restringida), mientras que únicamente una especie se encuentra en 8 áreas. En las Tablas 1 y 2 del apéndice de distribución se encuentra toda esta información detallada.

2.3 Polinización

La polinización mediada por animales constituye una de las interacciones mutualistas dominantes en hábitats terrestres, posiblemente tan ubicua como las micorrizas (Waser, 2006). A pesar de que los términos especialista y generalista sugieren una dicotomía, en realidad son dos extremos de un continuo en el uso de un recurso o amplitud del nicho. El concepto de síndrome de polinización lo debemos a los antiguos naturalistas, sin embargo éste se ha ido modificando (evitando interpretaciones teleológicas) y enriqueciendo. Faegri y Van der Pijl (1979), con base en otros estudios (principalmente el de Vogel 1954) proponen diversos tipos florales de acuerdo a su recompensa, forma, color, olor y otras características fenotípicas. Actualmente sabemos que los síndromes de polinización representan convergencias adaptativas entre especies no emparentadas para polinizadores particulares.

Actualmente se ha visto que en la gran mayoría de estudios de campo detallados se encuentran más de un tipo de polinizadores. Por un lado la visión del ecólogo (postura empírica, ya que propone conceptos de acuerdo a sus observaciones de campo) sugiere generalización, sin embargo quienes intentan buscar patrones (visión sistemática que busca que los conceptos construidos a priori concuerden con la naturaleza) e imponer orden a toda la diversidad proponen que la especialización es la norma (Waser, 2006). Los que buscan patrones consideran que a pesar de que observemos varios tipos de visitantes en las flores, el único polinizador importante es el más efectivo y que de hecho la mayoría de los demás visitantes ni siquiera polinizan. Muchas veces los resultados que encontramos dependen de la pregunta que nos hagamos y de cómo la abordamos. Anteriormente la mayoría de los estudios ecológicos se concentraban en una pareja mutualista, mientras que a la fecha se ha intentado hacerlo a nivel comunidad, utilizando teoría de redes tróficas. Las redes de polinización estudiadas muestran asimetría, es decir que polinizadores especialistas visitan plantas generalistas y que las plantas especialistas son visitadas muchas veces por animales generalistas, lo cual muestra una realidad muy distinta a la concepción tradicional de especialistas coevolucionados.

2.3.1 Polinización en *Agave sensu lato*

Agave sensu lato presenta un síndrome de polinización considerado como quiropterofílico (Slauson, 2001) el cual se caracteriza por flores que van de blanco a amarillo o verde pálido, dehiscencia de anteras y producción nocturna de un néctar diluido. Se ha propuesto que este síndrome constituye un sistema abierto de polinización, es decir que permite la visita efectiva (para ambos interactuantes) de otro tipo de polinizadores como son aves (principalmente colibríes) e insectos nocturnos (principalmente, esfíngidos). Gentry (1982) propuso que el subgénero *Littaea* es polinizado por insectos principalmente, con base en el pequeño tamaño de las flores, menor volumen de néctar y bajo contenido proteico en el polen (Howell, 1972).

Considerando el número total de especies o simplemente el número de grupos morfológicos de *Agave*, existen pocos estudios de polinización, sin embargo las especies en que se han realizado se observaron varios tipos de polinizadores. Los primeros estudios fueron realizados en especies que se presentan en el límite norte de la distribución del género *Agave*, la cual muchas veces para sus murciélagos polinizadores implica que están fuera de su rango. Dentro de las especies estudiadas con distribución más nórdica destacan: *A. mackelveyana* (Sutherland, 1987), *A. chrysantha* (Slauson, 2000), *A. parviflora* (Slauson, 2001), *A. schottii*, *A. shawii* (Slauson, 2000), *A. deserti* (Fulton, 1983) y *A. havardiana* (Kuban, 1989), la mayoría presenta un síndrome quiropterofílico pero su éxito reproductivo no depende exclusivamente de los murciélagos.

Agave angustifolia junto con *A. cerulata*, *A. lechuguilla* y *A. scabra* resaltan por tener una distribución amplia, así como poblaciones con un gran número de individuos. Por otro lado *A. subsimplex*, como la mayoría de los agaves, presenta una distribución muy localizada, en las regiones costeras del centro de Sonora e Isla Tiburón (Molina-Freaner y Eguiarte, 2003). Mientras *A. angustifolia* es polinizado principalmente por *Leptonycteris yerbabuena*, *A. subsimplex* (igualmente especie auto-incompatible y con concentración de néctar similar) lo es tanto por *L. yerbabuena* y varias polillas como por *Apis mellifera*.

En estudios poblacionales intensivos de *A. lechuguilla* (Silva-Montellano, 2001; Silva-Montellano y Eguiarte, 2003; Cadaval-Narezo, 1999) encontraron que el volumen del néctar decrece latitudinalmente, la coloración y la forma de las flores son polimórficas, en el norte la corola es roja, más corta y abierta mientras que hacia el sur es verde pálido. Esta adaptación local a distintos tipos de polinizadores correlaciona con una tasa de entrecruzamiento mayor en el sur, intermedia en poblaciones centrales y baja en el norte. Por su parte *A. marmorata* es visitado preferencialmente por aves percheras y colibríes, así como por *Choeronycteris mexicana* y *L. nivalis* (Ornelas et al., 2002) sin embargo siempre se detectaron otros visitantes.

Un estudio detallado de 6 especies simpátricas del cañón de Meztitlán, que es una de las regiones con mayor riqueza en México, sugiere que *L. yerbabuena*, *Glossophaga* y *Ch. mexicana* son importantes polinizadores (González, 2004; Rocha et al., 2006; Trejo, 2007). Estas especies, a pesar de ser simpátricas a nivel regional, se encuentran en distintos micro-hábitats y presentan distintas fenologías. Otras especies de *Agave* que además de su síndrome quiropterofílico se tienen reportes de visitas de murciélagos son *A. angustifolia* (Van der Pijl, 1936) con una distribución muy amplia básicamente en la república mexicana y suroeste de EUA, *A. macroacantha* (Arizaga, 2000) en el centro sur de México y *A. palmeri* en el sur de EUA (Howell, 1972; Howell y Roth, 1981) en los cuales *Choeronycteris mexicana* y *L. yerbabuena* respectivamente son sus polinizadores principales. Asimismo en *Manfreda brachystachya* los principales polinizadores son dos especies de murciélagos nectarívoros: *L. yerbabuena* y *Anoura geoffroyi* (Eguiarte y Búrquez, 1987,1988). Este esquema implicaría adaptación mutua entre pocas especies de murciélagos a un gran número de especies de *Agave*, así como su interacción con otros polinizadores.

2.3.2 Murciélagos polinizadores: Glossophaginae (Phyllostomidae)

Los murciélagos (orden Chiroptera) son el grupo dominante de mamíferos en la mayoría de las tierras bajas de bosques neotropicales, tanto por su abundancia como por diversidad de especies (Emmons, 1997). En el Viejo Mundo una docena de especies pertenecientes a Macroglossinae presentan diversos grados de adaptación a una dieta basada en productos florales. En América existen 30 especies con adaptaciones similares, todas ellas pertenecientes a la familia Phyllostomidae, una familia muy diversa (49 géneros y >140spp.) y endémica del Nuevo Mundo (Koopman, 1993; Wetterer et al., 2000). Además del gran número de especies, esta familia neotropical presenta una gran diversidad de hábitos alimenticios: insectos, peces y otros pequeños vertebrados, néctar, polen, frutas y sangre. Estudios filogenéticos encuentran que se forman clados independientes para cada tipo de dieta; es decir que las especializaciones correspondientes han evolucionado una única vez, sin embargo si han ocurrido reversiones (pérdida del hábito nectarívoro y polínívoro en muchos *Phyllostominae* y *Stenodermatinae*) y algunas especializaciones (e.j., carnivoría) han evolucionado más de una vez (Wetterer et al., 2000). El mapeo y optimización de su dieta sobre un árbol filogenético indica que el ancestro de la familia era predominantemente insectívoro y de ahí los clados tempranamente divergentes pasaron a ser por un lado hematófagos o carnívoros, mientras que los más derivados constituyen dos clados, uno insectívoro y otro predominantemente vegetariano con 2 subclados, uno nectarívoro y el otro frugívoro (Wetterer et al., 2000).

México cuenta con 12 especies nectarívoras: *Anoura geoffroyi*, *Choeroniscus godmani*, *Choeronycteris mexicana*, *Glossophaga soricina*, *G.morenoi*, *G.comissarisi*, *G.leachii*, *Hyalonycteris underwoodi*, *Leptonycteris nivalis*, *L.yerbabuena*, *Linchonycteris obscura* y *Musonycteris harrisoni*, la mayoría de los cuales está asociado a zonas áridas tropicales y subtropicales (Santos y Arita, 2002). Asimismo las plantas de las que se alimentan también presentan adaptaciones a ser polinizadas por murciélagos, lo que se conoce como flores con síndrome quiropterofílico. La mayoría de éstas presentan antésis nocturna, olor almizclero y

producen grandes cantidades de néctar (Faegri y van der Pijl, 1979), y muchas veces su polen contiene una concentración proteica mucho mayor así como aminoácidos esenciales para los murciélagos (Howell, 1974; Arita y Martínez del Río, 1990). Como sucede con los síndromes de polinización de las flores, la dieta en los murciélagos no es absoluta-restrictiva, es decir que el que predomine un tipo de alimentación no implica que el animal no se alimente de otras cosas. Su dieta muchas veces es complementaria y predomina una sobre otra dependiendo el grupo, época del año y lugar donde se encuentre dentro de su área de distribución.

El origen de la dieta predominantemente frugívora o nectarívora se ha explicado mediante la hipótesis de la "fuente alimenticia dual" (Gillette, 1975), la cual considera que de una condición insectívora generalista, evolucionaron a una condición especialista insectívora, buscando insectos en frutas o flores. En algún momento cambiaron a usar el substrato (material vegetal) como fuente de alimento junto con los insectos de los que se alimentaban originalmente, pasando a depender en un fuente alimenticia dual. La culminación de esta tendencia evolutiva involucró la explotación única de la fuente alternativa de alimento, la planta en este caso. Específicamente el hábito nectarívoro predominante se asocia al grupo *Hirustaglossa* que agrupa a dos subfamilias: *Phyllonycterinae* y *Glossophaginae*, esta última constituida por dos tribus (polinívora y nectarívoras igualmente: *Lonchophyllini* y *Glossophagini*. Las especies que se alimentan de *Agave sensu lato* y cactáceas columnares durante su paso por desiertos y montañas mexicanas pertenecen a la tribu *Glossophagini* formado por 10 géneros: *Glossophaga*, *Monophyllus*, *Leptonycteris*, *Anoura*, *Hyalonycteris*, *Linchonycteris*, *Scleronycteris*, *Choeronyctus*, *Choeronycteris* y *Musonycteris*. Estos géneros en su mayoría tienen representantes en México, a excepción de dos géneros con dos y una especie respectivamente, *Monophyllus* de las Antillas y *Scleronycteris ega* presente únicamente en el noreste de Brasil y sur de Venezuela. En un análisis tipo "agrupamiento jerárquico" de las dietas de 16 spp de murciélagos nectarívoros de las zonas áridas neotropicales donde se evaluó la importancia relativa de cactáceas y agaves respecto a otras plantas encontraron que las especies *L. curasoae*, *L. yerbabuena*, *L. nivalis* y *Choeronycteris mexicana* son las más especializadas en alimentarse de néctar y

polen de agaves y cactus columnares en las zonas áridas de Norteamérica (Arizmendi, 2002). Mientras *L. yerbabuena* se distribuye desde Arizona y Nuevo México (en la Figura 3 se muestran sus sitios de apareamiento y maternidad) hasta el noreste de Guatemala y *L. curasoae* en Colombia, Venezuela y las islas del Caribe, ambas abundantes en zonas áridas. *L. nivalis* es una especie rara desde Texas hasta Guatemala y se encuentra sobretodo en bosque de pino-encino.



Figura 3. Refugios de apareamiento y de maternidad de *Leptonycteris yerbabuena*.
Figura modificada de Fleming y Nassar 2002

Por su parte *Choeronycteris mexicana* es poco abundante desde el suroeste de EUA hasta Guatemala. Respecto a las dos especies de *Glossophaga* presentes en México (*G. soricina* desde el Norte de México hasta el norte de Argentina y *G. leachii* únicamente en Centroamérica) se alimentan de árboles tropicales básicamente, sin embargo *G. longirostris* (ausente en México) se alimenta de cactus, agaves y ceibas en Colombia y Venezuela (Arizmendi, 2002). *Anoura geoffroyi* es abundante en bosque húmedo de altura y a pesar de ser predominantemente insectívoro, complementa su dieta con polen y néctar tanto de árboles como de las especies de agaves ahí presentes (Arizmendi, 2002).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestreo y materiales utilizados

El objetivo del muestreo en Agavaceae fue representar la diversidad morfológica, ecológica y taxonómica de *Agave sensu lato* así como incluir miembros de *Furcraea-Beschorneria*, su grupo hermano y demás géneros de la familia Agavaceae. Asimismo se incluyó a un representante de la familia Anthericaceae (*Chlorophytum comosum*) que se ha propuesto como grupo hermano de la familia Agavaceae. En la Tabla 1 se muestran todos los representantes utilizados de los diversos grupos morfológicos propuestos por Gentry (1982) para *Agave sensu stricto*, en la Tabla 2 los representantes herbáceos de *Agave sensu lato* (*Manfreda*, *Polianthes* y *Prochnyanthes*) y en la Tabla 3 se encuentran las especies que conformaron el grupo externo. Por su parte respecto a los murciélagos se buscó incluir el mayor número posible de especies pertenecientes a Glossophaginae, así como especies representativas de los diversos géneros de Phyllostomidae incluyendo a *Pteronotus*, *Furipterus*, *Myotis*, *Natalus* y *Thyroptera* como grupos más externos debido a que se contaba con información fósil.

Para este trabajo se utilizaron para los representantes de Agavaceae tanto ejemplares frescos, congelados y herborizados, éstos últimos pertenecientes a la colección del Herbario Nacional; mientras que todas las secuencias de los murciélagos se obtuvieron de Genbank a excepción de *L. nivalis* que se secuenció en el laboratorio.

En el Apéndice de Distribución se encuentra la ubicación geográfica y tipo de hábitat de cada una de las especies de *Agave sensu lato* utilizadas, así como la información de colecta de las herborizadas.

2. Extracción de ADN genómico

La extracción del ADN de todos los ejemplares vegetales se realizó mediante el protocolo de Mini-Prep (Tabla 4), con la única diferencia de que los tejidos frescos fueron molidos en mortero y los herborizados en tubos “ependorff”, debido a que se contaba con menor cantidad de tejido para estos últimos. El ejemplar de *L. nivalis* (proporcionado por Miguel Morales) se extrajo con el kit Quiagen. Una vez obtenido el “pellet” seco de ADN se adicionaron 100 μ l de agua ultra pura y se dejaron a resuspender mínimo por 12 hrs. previas a ser utilizadas para la amplificación de los genes de interés.

3. Amplificación de los genes de cloroplasto y citocromo *b*

El ADN obtenido tanto de muestras frescas como congeladas (Revco -80 °C) resultó en una banda intensa y bien definida al ser corrida en un gel de agarosa al 1%, por lo que se utilizó directamente en las reacciones de PCR. Por el contrario, el extraído de ejemplares herborizados resultó en un barrido (i.e., ADN degradado y sucio) o en la ausencia de banda y siempre requirió diluirse antes para su amplificación. El grado de dilución (1-1, 1-10, 1-100, 1-1000) fue muy variable, dependiendo tanto de la especie como del fragmento a amplificar, en algunos casos incluso se requirió diluir al punto de no observar banda alguna en el gel para que la PCR funcionara.

Los reactivos, concentración y volumen utilizados por cada primer (Tabla 5) para la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) se muestran en la Tabla 6. La secuencia de los tres primeros primers fue proporcionada por Jim Leebens-Mack quien los modificó para agaváceas, mientras que tanto *trnD-trnT* (Shaw et al. 2005) y los del citocromo *b* (Steppan et al., 1999) se tomaron de la literatura y se sintetizaron en el IBT UNAM. Todas las reacciones se hicieron con Taq polimerasa (Roche o

Amplicasa, Biogenica) con su respectivo buffer.

Tabla 1. Muestreo género <i>Agave sensu stricto</i>			
Subgénero <i>Littaea</i>			
<i>Littaea</i>	no. especies	Especie	%
Marginatae	18	<i>A. lechuguilla</i> <i>A. victoria-reginae</i> <i>A. garcia-mendozae</i>	17
Filiferae	5	<i>A. schidigera</i>	20
Parviflorae	4	No MEX	0
Polycephalae	6	<i>A. celsii</i>	17
Urceolatae	1	No MEX	0
Striatae	6	<i>A. striata</i> <i>A. petrophila</i>	33
Amolae	8	<i>A. vilmoriniana</i>	13
Choritepalae	3	<i>A. guiengola</i>	33
Total	51	9 spp.	18
Subgénero <i>Agave</i>			
<i>Agave</i>	no. especies	Especie	%
Americanae	8	No ADN	0
Campaniflorae	5	No MEX	0
Ditepalae	12	No ADN	0
Hiemiflorae	12	<i>A. potatorum</i>	8
Crenatae	7	<i>A. inaequidens</i> <i>A. cupreta</i>	29
Deserticolae	10	<i>A. deserti</i>	10
Marmoratae	4	No ADN	0
Parryanae	5	No ADN	0
Rigidae	12	<i>A. angustifolia</i> <i>A. fourcroydes</i>	8
Salamianae	5	No ADN	0
Umbelliflorae	2	No MEX	0
Total continentales	83	7 spp.	8.4
Total isleñas	43 en 6 gpos.	0	0
TOTAL	177	14	8
TOTAL México	123	15	12

Tabla 2. Grupos herbáceos: <i>Agave sensu lato</i> (Tribu Poliantheae)			
Subgénero <i>Manfreda</i>			
Grupo Morfológico	No. Especies	Especies utilizadas	%
Brunnea	7	-	0
Scabra	10	<i>M. revoluta</i> , <i>M. jaliscana</i> , <i>M. pubscens</i> , <i>M. maculata</i>	40
Guttata	8	<i>M. guttata</i> , <i>M. fusca</i> , <i>M. pringlei</i>	38
Virginica	1	<i>M. virginica</i>	100
TOTAL	28	8	28.6
Subgénero <i>Polianthes</i>			
Grupo Morfológico	No. Especies	Especies utilizadas	%
Polianthes	11	<i>P. tuberosa</i> , <i>P. longiflora</i>	27

Bravo	6	<i>P. densiflora, P. geminiflora, P. graminifolia, P. howardii</i>	50
TOTAL	19	6	32
Subgénero Prochnyanthes			
<i>Prochnyanthes</i>	1	<i>Prochnyanthes mexicana</i>	100
TOTAL	48	15 spp.	31

Tabla 3. Especies utilizadas como grupo externo a <i>Agave sensu lato</i>			
Grupo Hermano			
Género	No. especies	Especies utilizadas	%
<i>Furcraea</i>	7	<i>F. macdougallii, F. cahum, F. bedinghausii, F. guatemalensis, F. guerrerensis, F. longaeva, F. parmentieri</i>	28
<i>Beschorneria</i>	4	<i>B. calcicola, B. septentrionalis, B. rigida, B. tubiflora</i>	57
Total	32	11 spp.	34.4
Género <i>Yucca</i>			
Morfogrupo	No.sp	Especies utilizadas	%
Sarcocarpa	24	<i>Y. schidigera</i>	4.2
Chaenocarpa	24	<i>Y. glauca, Y. filamentosa, Y. queretaroensis</i>	12.5
Clistocarpa	<i>Y. brevifolia</i> (1sp)	-	0
Total	49	4	8.2
Clado basal de Agavaceae			
Género	No. especies	Especies utilizadas	%
<i>Hesperoyucca</i>	1	<i>Hesperoyucca whipplei</i>	100
<i>Hesperaloe</i>	5	<i>H. funifera, H. nocturna</i>	40
<i>Hosta</i> *	23	<i>Hosta fortunei</i>	4
Grupo externo a Agavaceae			
Familia hermana	Anthericaceae	<i>Chlorophytum comosum</i>	

Se emplearon tres diferentes ciclos de tiempo/temperatura para amplificar todos los fragmentos. Para *trnK2621F-matK13825R* y *taber e - taber f* se utilizó el ciclo A, para *matK743F-trnK111R* el B y para el *trnT-trnD* el ciclo C (Tabla 4). Los productos se almacenaron a 4°C hasta ser corridos en un gel de agarosa al 1.5%, empleando bromuro de etidio como marcador para así calcular tanto el tamaño mediante la comparación con el marcador (ladder) de 100 pb Invitrogen, como la concentración. Cuando la banda era demasiado tenue y se repitió la reacción para un volumen de 60 µl duplicando todas las cantidades excepto del ADN y la Taq

polimerasa, por lo que el H₂O tampoco era el doble, sólo se aforaba a 60 µl.

Tabla 4. Método “Mini-Prep”

1. moler 1gr de tejido
2. 1,000ml CTAB2X
3. Centrifugar 10,000g 8 min 4 °C
Eliminar sobrenadante = es.
4. 600 ml CTAB2X
5. Incubar 60 °C 10 min
6. 600 ml cloroformo : octanol 24:1 a -20 °C
7. Centrifugar a 7000 g 12 min 4 °C
Recuperar 250 ml sobrenadante en tubo nuevo
8. 2/3 de vol. (600 ml) de isopropanol a -20 °C
9. Reposar 2 hrs o más a -20 °C
10. Centrifugar 9,000 g 5 min 4 °C, es.
11. 1000 ml etanol 70 % a -20 °C
Reposar 5 min a temperatura ambiente
12. Centrifugar 7,000 g 5 min, es.
13. Secar
14. Rehidratar con 70 ml
Dejar a -4 °C 12 hrs antes de usar

Tabla 5. Secuencia de Primers para PCR y secuenciación*

<i>trnK</i> 2621F	AAC TAG TCG GAT GGA GTA G
<i>matK</i> 13825R	CTT CGA CTT TCG TGT GCT AG
<i>matK</i> 743F	GTT CCA GAA GAT GTT AAT CG
<i>trnK</i> 11R	CTC AAC GGT AGA GTA TTC GG
taber e	GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC
taber f	ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG
<i>trnD</i> ^{GUC} F	ACC AAT TGA ACT ACA ATC CC
<i>trnT</i> ^{GGU} R	CTA CCA CTG AGT TAA AAG GG
* <i>trnE</i> ^{UUC}	AGG ACA TCT CTC TTT CAA GGA G
* <i>trnY</i> ^{GUA}	CCG AGC TGG ATT TGA ACC A
L14725 - citocromo- <i>b</i>	TGA AAA AYC ATC GTT GT
H15195 - citocromo- <i>b</i>	TCT TCA TTT YWG GTT TAC AAG AC

La mayoría de los productos de la PCR fueron filtrados con placas “manifold” conectadas a una bomba de succión, lo que eliminó los productos inespecíficos de

bajo peso molecular sin afectar ni la secuencia de nucleótidos ni la longitud del fragmento. Estas son placas con 96 pozos independientes donde se colocó el fragmento amplificado más 200 µl de agua, se succionó y se agregaron otros 100 µl de agua nuevamente. Una vez que se observó que los filtros de cada pozo estaban secos se agregó 30 µl de agua y se dejó en agitación a 400 rpm durante 20 min. para recuperar los productos.

Ciclo	A	B	C
Desnaturalización inicial	94 °C / 3 min.	94 °C / 3 min.	94 °C / 5 min.
Número de ciclos	30	35	30
Alineamiento	94 °C / 40 seg.	93 °C / 40 seg.	94 °C / 45 seg.
Extensión	55 °C / 40 seg.	58 °C / 40 seg.	55 °C / 30 seg.
Extensión	68 °C / 90 + 2 seg / ciclo	68 °C / 90 + 2 seg / ciclo	72 °C / 1 min.
Termociclador	ThermoHybaid y PTC – 100 indistintamente		

La mayoría de los productos de la PCR fueron filtrados con placas “manifold” conectadas a una bomba de succión, lo que eliminó los productos inespecíficos de bajo peso molecular sin afectar ni la secuencia de nucleótidos ni la longitud del fragmento. Estas son placas con 96 pozos independientes donde se colocó el fragmento amplificado más 200 µl de agua, se succionó y se agregaron otros 100 µl de agua nuevamente. Una vez que se observó que los filtros de cada pozo estaban secos se agregó 30 µl de agua y se dejó en agitación a 400 rpm durante 20 min. para recuperar los productos.

4. Secuenciación de los genes de cloroplasto y citocromo-*b*

Tanto para la reacción de amplificación PCR como para su secuenciación se utilizaron los mismos primers a excepción de trnT-trnD, que requirió primers específicos (Shaw et al., 2005). Para las reacciones de secuenciación de todos los fragmentos se utilizaron 2 µl de BDT, 1.6 µl de primer (realizando de manera independiente el F=forward y el R=reverse de cada uno) y de 7 – 11.4 µl de ADN

dependiendo de la intensidad de la banda; agregando el volumen necesario de agua para llevar el volumen total a 15 μ l. Los ciclos utilizados para la reacción de secuenciación que se muestran en la Tabla 7 son los universales y se realizaron en los termocicladores GeneAmp PCR system 2700, ThermoHybaid y PTC-100 indistintamente. Sin embargo, para la secuenciación del citocromo b de *L. nivalis* fue necesario utilizar el mismo ciclo que para su PCR (con 45 ciclos en vez de 35).

Tabla 7. Ciclos para Secuenciación	
Desnaturalización inicial	95 °C / 5 min.
Número de ciclos	45
Desnaturalización	95 °C / 10 seg.
Alineación	50 °C / 10 seg.
Extensión	60 °C / 4 min.

Posteriormente se limpiaron siguiendo el protocolo de etanol 70%, se dejaron secar a temperatura ambiente y se agregó 16 μ l de formamida para colocarlos en la placa, se desnaturalizaron 2 min. y se paró la reacción en hielo 2 min., para finalmente introducirse al secuenciado ABI Prism 3100-Avant Genetic Analyzer.

5. Edición y alineación de las secuencias de ADN

Una vez obtenidas todas las secuencias de los fragmentos de interés se evaluó la calidad de la secuencias en 3100-Avant Data Collection 2.0, el programa del secuenciador, revisando cuidadosamente los electroferogramas donde la calidad de la secuencia no fuera azul (excelente) y asignando donde era posible de manera manual la base correcta y una N cuando no se podía distinguir. Las secuencias de baja calidad se eliminaron y repitieron. Posteriormente se procedió a hacer una búsqueda (BLAST) en GenBank, lo cual nos sugiere a que se parece más nuestra secuencia de todas las contenidas en esa base de datos; de esta manera es posible

saber si amplificamos al organismo y el fragmento deseados. Las secuencias se alinearon en BIOEDIT n7.0.0 (Hall, 2005) utilizando Clustal W todas las especies por primer, primero el “forward” y luego el “reverse”. Se buscaban todos los sitios que fueran distintos en el electroferograma correspondiente para corroborar si la base asignada era la correcta. Una vez obtenidas las dos matrices, se unieron los dos fragmentos construyendo construir así una sola matriz de ADN para cada espaciador de cloroplasto.

6. Selección del Modelo de Evolución Molecular

Para seleccionar el modelo de sustitución molecular en Agavaceae se valoró el ajuste de cada uno de los genes de cloroplasto, así como de la matriz de los 4 concatenados, a todos los modelos disponibles en el programa, comparándolos con una prueba de verosimilitud LRT y el criterio de Información de Akaike AIC utilizando MODELTEST (Posada y Crandall, 1998). Se procedió de la misma manera para las secuencias de citocromo *b* de Phyllostomidae.

7. Estimación de las Filogenias

La filogenia se estimó mediante Inferencia Bayesiana utilizando MRBAYES (Huelsenbeck et al., 2001; Ronquist et al., 2003) con el modelo de sustitución obtenido para la matriz concatenada de 2191 pb, pidiéndole que explorara tanto las topologías como los demás parámetros del modelo y que generara el consenso de mayoría con las longitudes de rama promedio para cada terminal. Se hicieron 800,000 generaciones muestreando un árbol cada 200 con un “burn-in” del 28.5 % del total de caracteres (625 árboles). Una vez terminado el análisis se generan 2 archivos (dos corridas paralelas) tanto de árboles como de parámetros con su verosimilitud asociada, así como el consenso de mayoría con longitudes de ramas. La estimación filogenética de la filogenia de Phyllostomidae se realizó de la misma

manera.

La convergencia se evaluó en 2 etapas, durante el análisis y posteriormente. Previamente a que se detenga la estimación mediante inferencia bayesiana, MRBAYES te muestra la desviación estándar promedio de las frecuencias de división (average standard deviation of the split frequencies) así como los valores de PSRF (potential scale reduction factor) y en el momento en que la primera se aproxima a 0 y los segundos a 1 se detuvo el análisis. Posteriormente se analizó el comportamiento tanto de la verosimilitud global como de cada uno de los parámetros estimados.

8. Prueba de la Hipótesis de Reloj Molecular

La prueba de la hipótesis del reloj molecular consiste en comparar la verosimilitud de una filogenia, forzando un reloj molecular (hipótesis nula, que es un caso particular de la hipótesis alternativa) y sin forzarlo (hipótesis alternativa) mediante una prueba de cociente de verosimilitudes LRT, donde $\ln L_0$ = verosimilitud con reloj molecular y $\ln L_1$ = sin reloj molecular (Felsenstein 1983).

$$LRT = 2 (\ln L_0 - \ln L_1)$$

En un árbol en el que se supone un reloj molecular el número de longitudes de rama a estimar sería $n - 1$ donde n = número de taxa, mientras que si no se supone reloj es $2n - 3$ (Lewis, 1998). Una manera sencilla de visualizarlo es imaginar el árbol más pequeño (3 terminales), si se asume reloj molecular se requerirá estimar únicamente 2 longitudes de rama, una del grupo externo y otra de cualquiera de las otras dos terminales hermanas ya que se asume que su longitud de rama es la misma. Por otro lado si en el mismo árbol no se asume reloj molecular se tendrán que estimar 3 distintas.

La LRT es una prueba estadística diseñada para comparar dos modelos anidados que en este caso los parámetros limitados son las longitudes de rama (Lewis, 1998). La verosimilitud de $\ln L_0$ necesariamente es la misma o menor que $\ln L_1$. Si $\ln L_0$ es mucho menor que $\ln L_1$ la hipótesis nula (con reloj) se debe rechazar

debido a que, asumir un reloj molecular no nos permite explicar los datos tan bien como lo hace el relajamiento de esta hipótesis. En caso de que la verosimilitud sea muy semejante para saber si la diferencia es significativa, se hace uso del hecho que $LRT = 2*(\ln L_0 - \ln L_1)$ se distribuye de manera muy similar a una variable aleatoria de χ^2 con ν grados de libertad. En este caso los grados de libertad son $\nu = n - 2$ porque hay $n - 2$ menos ramas que necesitan ser estimadas en el modelo limitado en comparación con el alternativo (Felsenstein, 1981). Esta prueba se realizó tanto para la filogenia de Agavaceae que fue construida con 51 taxa como para Phyllostomidae con 34 taxa, por lo que los grados de libertad son 49 y 32 respectivamente.

9. Estimación del origen de clados y sus tiempos de divergencia

Una vez obtenido el estimado puntual de la filogenia con longitudes de ramas se realizó la fechación mediante el método de Verosimilitud Penalizada (PL) de Sanderson (2002), que es un método semiparamétrico. Éste permite diferentes tasas de sustitución entre ramas penalizando los cambios muy rápidos al igual que el NPRS de Sanderson (1997), pero que a diferencia de éste regula la contribución relativa del modelo paramétrico y la penalización mediante un "parámetro suavizante" λ (Sanderson, 2003). Lambda es un factor determinante para la estimación de las tasas y tiempo de divergencia, por lo que resulta de crucial importancia seleccionar un valor que ajuste bien a los datos. La magnitud óptima para este parámetro se obtiene implementando una validación cruzada en los datos que consiste en eliminar una a una las ramas terminales de la filogenia y estimar los parámetros en las ramas restantes mediante PL para posteriormente utilizarlos para predecir la longitud de las ramas eliminadas. La diferencia entre las longitudes predichas y las observadas constituirá el error, que es utilizado como un índice del poder de predicción y se deberá seleccionar el valor de λ asociado al conjunto de parámetros que resulten en el menor error (Magallón, 2004).

Por lo general los valores de λ explorados van de 3 a 1000 (equivalente a un rango de 0.5 a $3 \log \lambda$), sin embargo si con éstos no se logra determinar el valor de λ sin ambigüedad (e.g., el error estándar asociado sigue bajando) se deben explorar otros valores a distintos intervalos. Mientras para Agavaceae el valor de λ cayó dentro de el rango anteriormente mencionado, para la cv de Phyllostomidae se requirió explorar valores entre 1×10^3 y 1×10^8 . La validación cruzada requiere de la calibración del árbol mediante la fijación al menos de uno de los nodos en un punto temporal absoluto. En este caso fijó la fecha del origen del género *Yucca* a 14 MA (Tidwell y Parker, 1990) ya que es la única fecha fósil disponible. Asimismo se eliminó al taxón más externo de la filogenia en este caso *Chlorophytum* (que fue utilizado para enraizar la topología) debido a que la longitud de su rama es un artefacto (Sanderson, r8s manual 2006). Una vez obtenida la magnitud de λ se estimaron las fechas de todos los nodos utilizando como calibración secundaria el rango temporal de entre 13-19 ma para el origen de *Yucca*, dentro del que queda contenida la edad fósil. Este rango es un estimado molecular obtenido por Good-Avila et al. (2006), utilizando fósiles de monocotiledóneas para su calibración.

En la validación cruzada de Phyllostomidae se utilizó la edad de la divergencia entre *Pteronotus* y la familia Phyllostomidae (nodo NOC en la Fig. 4) a 30 ma, que es un estimado molecular utilizando varias edades fósiles (Teeling et al., 2005) para estimar λ . Para la fechación se utilizaron los intervalos fósiles de 30-42 ma para NOC y de 37- 47 ma para NVP y de 50 - 60 ma para la divergencia entre *Natalus* y *Myotis* (Teeling et al., 2005).

10. Análisis de la tendencia de las tasas de diversificación en

Agave sensu lato

Para la evaluación de las tasas de diversificación se utilizó la topología con el valor de verosimilitud más elevada estimada por MRBAYES con longitudes de rama estimadas con máxima verosimilitud, previamente fechada. Nos interesaba saber si la tasa de diversificación había sido constante a lo largo del tiempo y de no ser así a

que modelo de tasas variables se ajustaba mejor, así como cuantos cambios habían sucedido (incrementos o decrementos) y cuando se habían presentado. Todo esto se estimó con LASER (Rabosky, 2006) utilizando el árbol ultramétrico de *Agave sensu lato* (filogenia fechada con r8s). Para determinar el valor crítico de 13.5 con un $\alpha \leq 0.05$ se construyó un histograma de la distribución nula de los ΔAIC de 500 filogenias que fueron simuladas muestreando 15 especies de un total de 208. Una vez obtenido éste valor se corrió LASER con el árbol ultramétrico evaluando dos modelos de tasas constantes (RC) y cinco de tasas variables (RV). Asimismo se obtuvo la gráfica del surgimiento de linajes en el tiempo LTTP y se señalaron los incrementos únicamente para hacer más visual el resultado.

VI. RESULTADOS

1. Amplificación y secuenciación de los genes de cloroplasto

En la Tabla 1 se muestran los genes de cloroplasto para los cuales se logró obtener la secuencia para construir la matriz de datos en la que se basaron todos los análisis de Agavaceae. En total se analizaron 2191 pares de bases de 51 taxa, ya que se eliminaron las especies para las cuales no se logró obtener la secuencia de al menos 2 fragmentos (50%). Los primeros dos fragmentos pertenecen al gen *matK* mientras que los otros dos son regiones no codificantes. De la mayoría de las especies se obtuvieron al menos tres fragmentos completos. El asterisco al lado del nombre de la especie indica que el ADN se extrajo de material herborizado tomado del Herbario Nacional, (Instituto de Biología, UNAM) y la "x" que contamos con una secuencia de buena calidad.

2. Selección del modelo de sustitución molecular

En la Tabla 4 se muestran los modelos que mejor se ajustaron a las secuencias de los espaciadores por separado, así como al conjunto de datos construido por la concatenación de todas las secuencias para cada especie identificado con ModelTest (Posada y Crandall, 1998). Para todo el segmento *trnK-matK* así como para *trnL-trnF* se eligió el mismo modelo tanto por HLRT como por AIC, mientras que para *trnD-trnT* y para la matriz concatenada se seleccionaron unos ligeramente distintos. Lo que sucede es que el AIC (Akaike Information Criterion) penaliza la adición de parámetros, mientras que HLRT (Hierarchical Likelihood Ratio Test) no lo hace, por lo que el primer método generalmente escoge un modelo con mejor ajuste pero con mayor número de parámetros. La diferencia fundamental entre los criterios de selección del modelo se encontró a nivel de la proporción de sitios invariables y la distribución gamma (Tabla 5); sin embargo para la matriz concatenada ambos criterios coinciden.

Especie	<i>matK</i>₁	<i>matK</i>₂	<i>trnL-trnF</i>	<i>trnD-trnT</i>
1. <i>Manfreda guttata</i> *	x	x	x	x
2. <i>M. revoluta</i> *	x	x	x	x
3. <i>M. fusca</i> *	x	x	x	-
4. <i>M. maculata</i> *	x	x	x	x
5. <i>M. virginica</i> *	x	x	x	-
6. <i>M. jaliscana</i> *	x	x	x	x
7. <i>M. pubscens</i> *	x	x	x	x
8. <i>M. pringlei</i> *	x	x	x	x
9. <i>Polianthes densiflora</i>	x	-	x	-
10. <i>P. graminifolia</i> *	x	x	x	x
11. <i>P. geminiflora</i> *	x	x	x	x
12. <i>P. tuberosa</i>	x	x	x	x
13. <i>P. howardii</i> *	x	x	-	x
14. <i>P. longiflora</i> *	x	x	x	x
15. <i>Prochnyanthes mexicanana</i> *	x	x	x	x
16. <i>Agave angustifolia</i>	x	-	-	-
17. <i>A. deserti</i>	x	x	x	x
18. <i>A. garciae-mendozae</i>	x	x	x	x

19. <i>A. guiengola</i>	x	x	x	-
20. <i>A. schidigera</i>	x	x	x	x
21. <i>A. vilmoriniana</i>	x	x	x	x
22. <i>A. victoriareginae</i>	x	x	x	x
23. <i>A. lechuguilla</i>	x	x	x	x
24. <i>A. petrophila</i>	x	x	x	x
25. <i>A. fourcroydes</i>	x	x	x	x
26. <i>A. cupreata</i>	x	x	x	x
27. <i>A. inaequidens</i>	x	x	x	x
28. <i>A. celsii</i>	x	x	x	x
29. <i>A. potatorum</i>	-	x	x	x
30. <i>A. striata s1</i>	x	x	x	x
31. <i>A. striata s3</i>	x	x	x	x
32. <i>A. striata s2</i>	x	x	-	x
33. <i>Furcraea longaeava*</i>	x	x	x	x
34. <i>F. guerrerensis*</i>	x	x	x	x
35. <i>F. guatemalensis*</i>	x	x	x	x
36. <i>F. macdughallii*</i>	x	-	x	x
37. <i>F. bedinghausii</i>	x	x	-	x
38. <i>F. parmentieri*</i>	x	x	x	x
39. <i>F. cahum*</i>	x	x	-	x
40. <i>Beschorneria calcicola*</i>	x	x	x	-
41. <i>B. rigida*</i>	x	x	x	x
42. <i>B. tubiflora*</i>	x	x	x	x
43. <i>B. septentrionalis*</i>	x	-	x	-
44. <i>Hesperoyucca whippleii</i>	x	x	x	x
45. <i>Hesperaloe Nocturna</i>	x	x	x	x
46. <i>H. funifera</i>	x	x	x	x
47. <i>Yucca queretaroensis</i>	x	x	x	x
48. <i>Y. filamentosa</i>	x	x	-	-
49. <i>Y. glauca</i>	-	-	x	x
50. <i>Hosta fortunei</i>	x	-	x	x
51. <i>Chlorophytum comosum</i>	x	x	x	x

Tabla 4. Evaluación de diversos modelos de sustitución nucleotídica y elección del que presentó mejor ajuste de acuerdo a HLRT y AIC

GEN	MODELO	
	Hierarchical Likelihood Ratio Test (HLRT)	Akaike Information Criterion (AIC)
<i>matK</i> ₁ (480bp)	K81 Kimura 3 parámetros	K81 Kimura 3 parámetros
<i>matK</i> ₂ (1000bp)	K81 Kimura 3 parámetros	K81 Kimura 3 parámetros
<i>trnL-trnF</i> (480pb)	Tr N Tamura-Nei + G	Tr N Tamura-Nei + I
<i>trnD-trnT</i> (673pb)	F81 Felsenstein 81	HKY Hasegawa Kishino Yano
Concatenados	K81uf + I + G	TIM + I + G

Tabla 5. Proporción de sitios invariables y valores gamma asociados al modelo de sustitución elegido

GEN	Proporción de sitios invariables		Gamma	
	HLRT	AIC	HLRT	AIC
<i>matK</i> ₁ (480bp)	-	0	0.2464	0.2464
<i>matK</i> ₂ (1000bp)	-	0.6951	0.1735	-
<i>trnL-trnF</i> (480pb)	-	0.8399	0.0157	-
<i>trnD-trnT</i> (673pb)	-	0.7039	-	-
Concatenados	0.7964	0.7982	0.8451	0.8977

3. Estimación de las Filogenias

La filogenia de Agavaceae se obtuvo con base en la base de datos concatenada mediante un análisis bayesiano con un modelo de sustitución molecular "tipo GTR", ya que considera 6 valores distintos de frecuencias de sustitución, que fue identificado como de mejor ajuste a los datos tanto por el AIC como por el LRT. Sin embargo no se le proporcionaron a MrBayes los valores de éstas ni los de los parámetros gamma y proporción de sitios invariables, sino que se solicitó que los estimara. Las probabilidades posteriores asociadas a cada bipartición se muestran en la Figura 1. Para su obtención se eliminaron las topologías en las cuales el valor de verosimilitud asociado aún no se estabilizaba; a éste conjunto se le conoce como "burn in". Cabe destacar que los valores de las longitudes de rama en este caso son un promedio de la obtenida en todas las filogenias estimadas.

Asimismo es posible elegir entre todas las topología la que tenga asociado el valor más alto de verosimilitud; con esto obtenemos una filogenia más resuelta con longitudes de rama estimados en ella específicamente. Si aunado a esto nos interesan particularmente las longitudes de rama es posible re-estimarlas mediante ML (máxima verosimilitud) sobre esta topología o sobre la que tuvo el valor de verosimilitud asociado más alto y que por lo general esta más resulta, la cual se muestra en la Figura 2.

Respecto a la filogenia de Phyllostomidae, se siguió la misma metodología: el modelo de sustitución que mejor se ajustó fue el GTR y la filogenia se estimó mediante Inferencia Bayesiana, obteniendo un consenso con longitudes de rama promedio y sus probabilidades posteriores asociadas a cada nodo Figura 3. Al igual que en el caso de Agavaceae se puede seleccionar la topología que presentó el valor de verosimilitud más elevado y sobre esa re-estimar las longitudes de rama mediante máxima verosimilitud, la cual se muestra en la Figura 4.

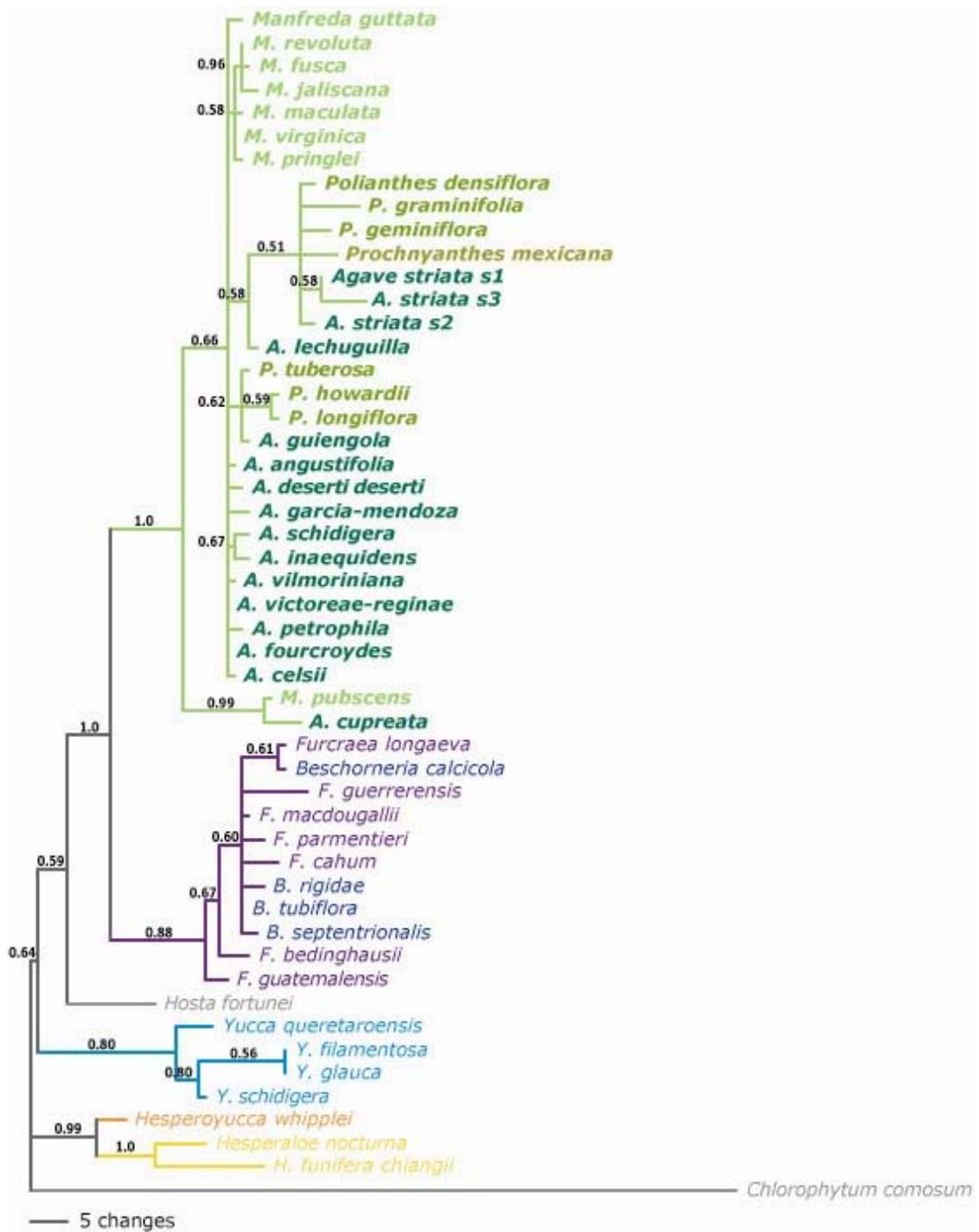


Figura 1. Topología Bayesiana resultante del consenso de mayoría de Agavaceae. Filogenia construida con la matriz de los 4 fragmentos de ADN de cloroplasto concatenados: *matK₁*, *matK₂*, *trnL-trnF* y *trnD-trnT*. La topología es el consenso de los 3500 árboles muestreados y la longitud de ramas es el promedio en todos los árboles para cada terminal. Los números en los nodos indican las probabilidades posteriores bayesianas.

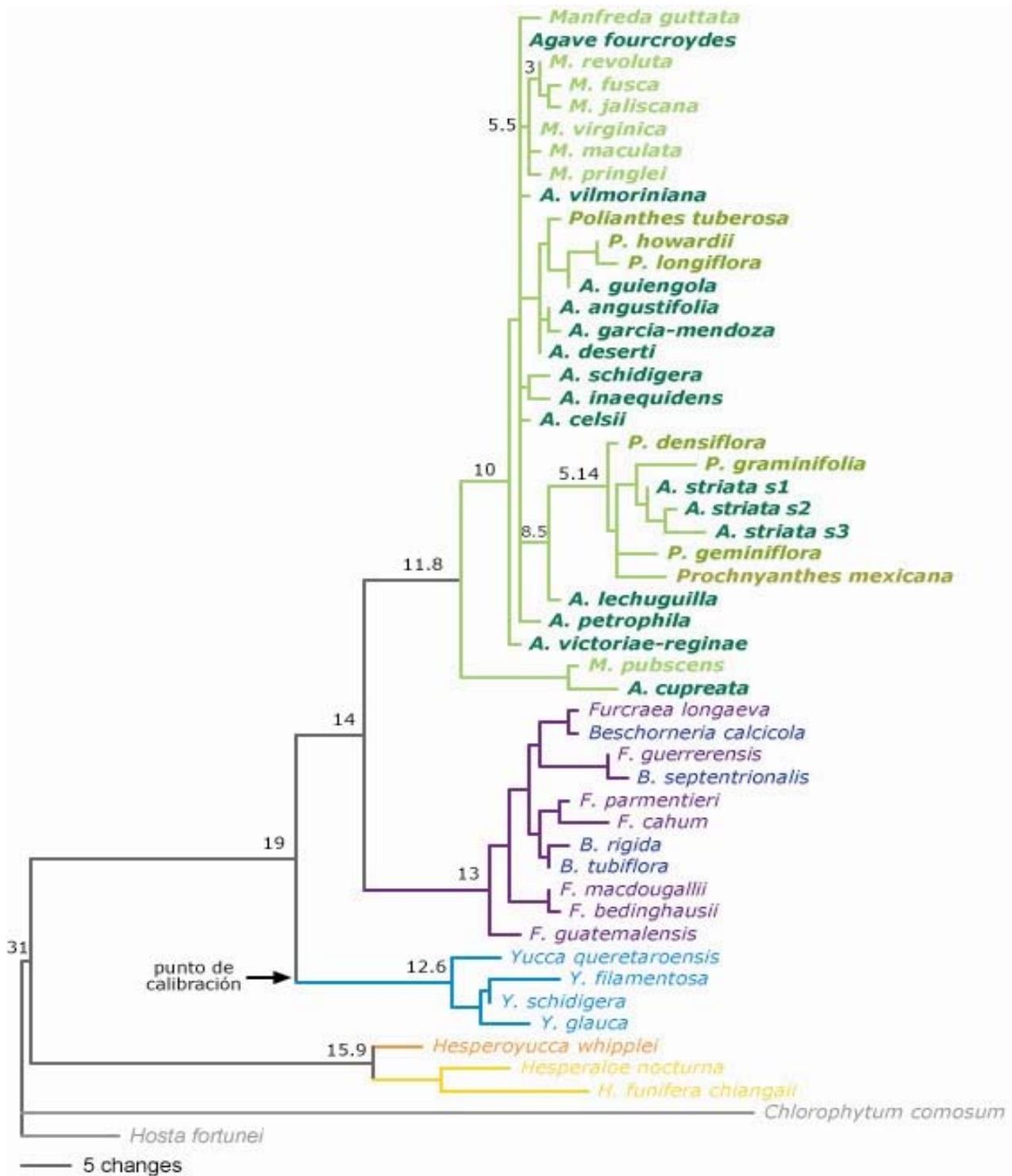


Figura 2. Filogenia puntual indicando las fechas de Agavaceae. Topología bayesiana con mayor valor de verosimilitud asociado en la cual se re-estimaron las longitudes de rama mediante Máxima Verosimilitud. Los números asociados a los nodos indican las edades en millones de años. El punto de calibración se fijó en el origen de *Yucca* entre 13–19 ma.

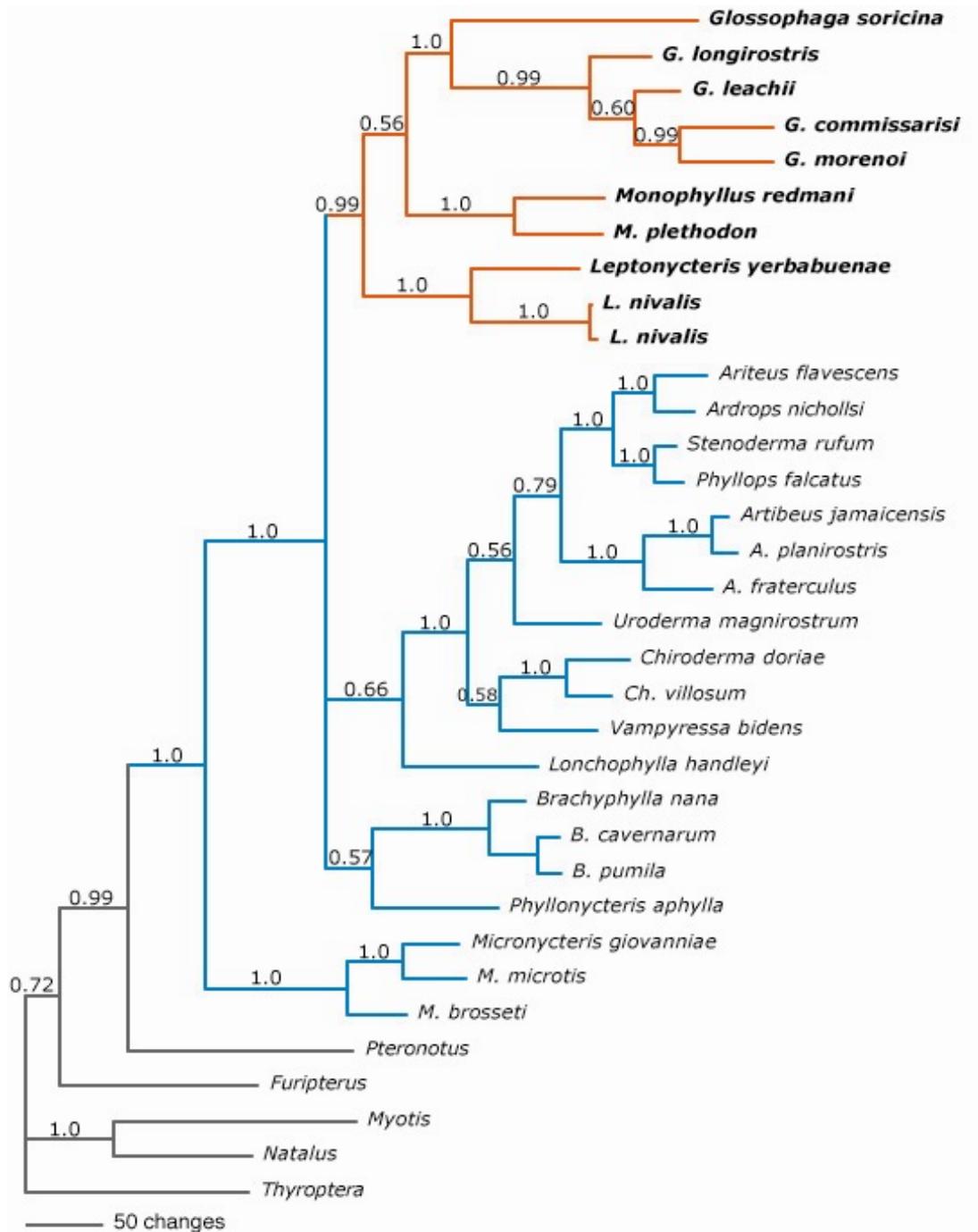


Figura 3. Topología Bayesiana resultante del consenso de mayoría de Phyllostomidae. La filogenia fue construida utilizando las secuencias de citocromo *b* y las longitudes de rama son el promedio en todos los árboles para cada terminal. Los números asociados a los nodos indican las probabilidades posteriores bayesianas.

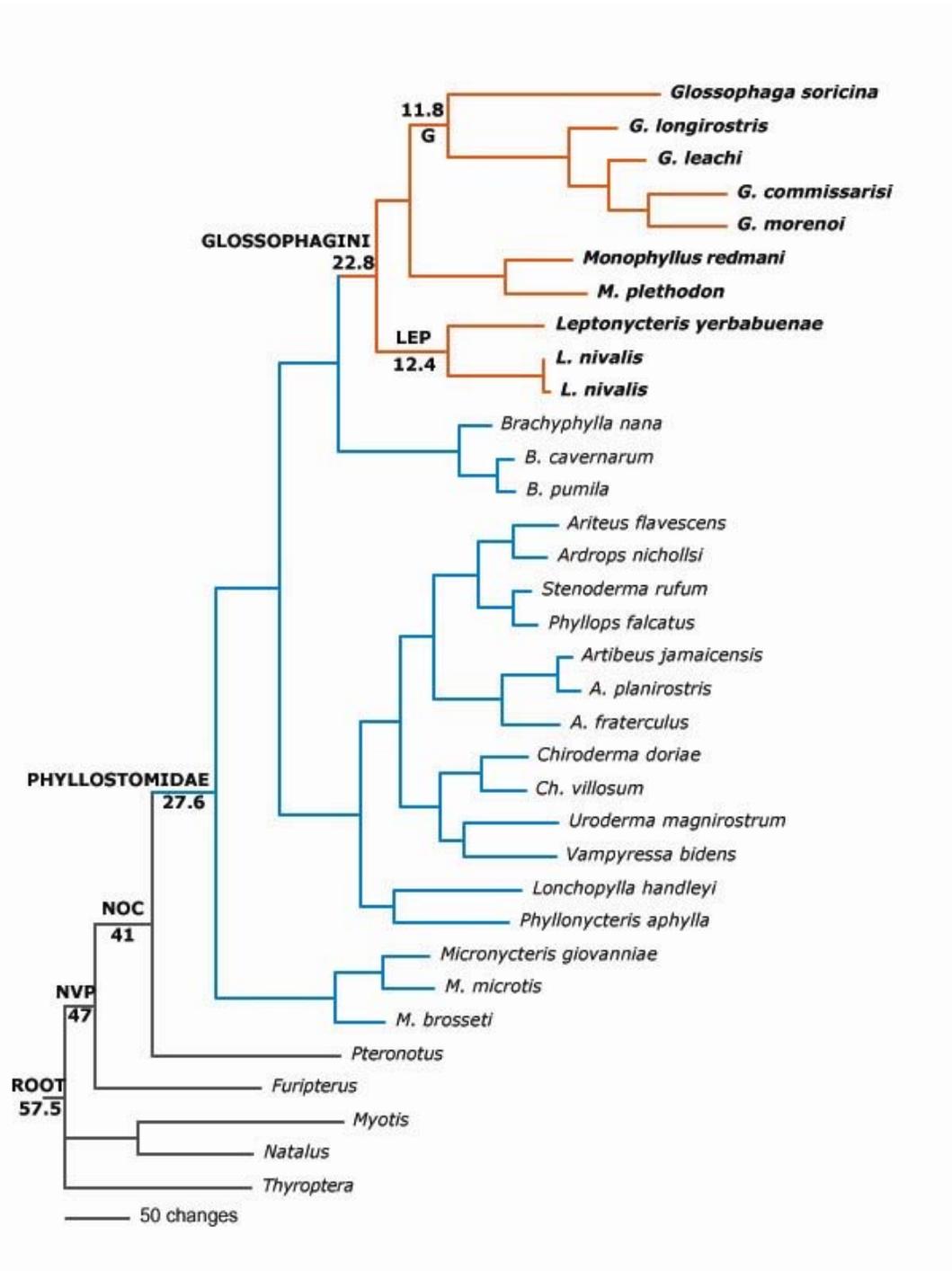


Figura 4. Filogenia puntual indicando las fechas de Phyllostomidae. La topología es uno de los árboles utilizados para construir el consenso de la Fig. 3, elegido por tener el valor de verosimilitud mayor y re-estimándose las longitudes de rama con Máxima Verosimilitud. Los números asociados a los nodos indican las edades estimadas con Verosimilitud Penalizada. Como puntos de calibración se utilizaron las edades de NOC entre 30-42, NVP entre 37-47y NV entre 50-60.

4. Prueba de la Hipótesis del Reloj Molecular

El valor de verosimilitud asociado de la filogenia consenso de Agavaceae (Fig. 1) sin reloj es $-\ln L_1 = 5168.4$, mientras que considerando una tasa constante en todas as ramas, es decir suponiendo un reloj molecular en esta misma topología es de $-\ln L_0 = 5496$. Sustituyendo en:

$$LRT = 2 (\ln L_0 - \ln L_1) = 2(5496.7 - 5168.4) = 656$$

De esta manera se rechaza la hipótesis del reloj molecular para esta hipótesis filogenia con una significancia de 99%, debido a que 656 es mayor que i.e., 85 valor tablas de χ^2 con $P = 0.001$ y para 49 grados de libertad, con un valor de $p \leq 0.0001$. De igual forma, para la filogenia puntual con el mayor valor de verosimilitud, la cual se utilizó para la fechación (Fig. 2) se rechaza la hipótesis del reloj molecular con 99% de significancia por presentar los siguientes valores: $-\ln L_0 = 5127.3$ y $-\ln L_1 = 5331.4$ da un valor de $LRT = 408.2$ que también es mayor a 85.

Respecto a las filogenias de Phyllostomidae, la verosimilitud de la filogenia consenso (Fig.3) el valor de verosimilitud asociado es de $-\ln L_1 = 12693.3$ y asumiendo un reloj molecular sobre esta es $-\ln L_0 = 12891.3$ de ahí que $LRT = 396$. Por su parte en la filogenia con valor de verosimilitud mayor asociado, la utilizada para la fechación (Fig.4) $-\ln L_1 = 12696.4$ y $-\ln L_0 = 12730.6$ y un valor de $LRT = 68.4$. De esta manera se rechaza la hipótesis del reloj molecular en el primer caso con un 99% ($p \leq 0.0001$) y en el segundo con un 95% con $P = 0.05$ y para 32 grados de libertad.

5. Estimación de las fechas en las filogenias de Agavaceae y Phyllostomidae

Las edades y los tiempos de divergencia de los clados de la Familia Agavaceae se muestran en la Figura 2. Para esto primero se obtuvo el valor del parámetro suavizante ($\lambda=32$) mediante una validación cruzada fijando únicamente el

origen de *Yucca* a 15MA. Posteriormente la estimación de las fechas se realizó utilizando el consenso de mayoría con longitudes promedio calculado con Inferencia Bayesiana, un rango de 13-19MA para el origen de *Yucca* (Good-Avila et al., 2006), $\lambda = 32$, el algoritmo de búsqueda TN (truncated newton) y el método de verosimilitud penalizada PL (Sanderson, 2003) eliminando a *Chlorophytum comosum* como se sugiere en el manual de r8s, debido a que la longitud de la rama que lo une con el resto del árbol es una artefacto. La Tabla 6 contiene las fechas estimadas tanto para el árbol consenso como para el de máxima verosimilitud.

Agavaceae			Phyllostomidae			
Clado	Puntual (MV)	Consenso	Puntual (MV)	Consenso	Nodo	Clado
			47 ma	46.11 ma	NVP	
			40.97 ma	37 ma	NOC	
<i>Agavaceae sensu stricto</i>	31.62 ma		27.61 ma	21.51 ma	PH	Phyllostomidae
<i>Hesperoyucca / Hesperaloe</i>	15.89 ma	15.28ma	22.79 ma	17.82 ma	GLO	Glossophagini
<i>Furcraea / Beschorneria</i>	13.05 ma	7.74 ma	12.43 ma	8.04 ma	LEP	<i>Leptonycteris</i>
<i>Agave sensu lato</i>	11.8 ma	7.05 ma	11.82 ma	8.23 ma	G	<i>Glossophaga</i>
<i>Polianthes, Prochnyanthes, A. striata</i>	8.52 ma	3.87 ma				
<i>Manfreda</i>	5.46 ma	2.66 ma				

Para calcular la tasa se especiación promedio se ha propuesto una formula muy sencilla (Bailey, 1964):

$$D = (\ln n_1 - \ln n_0) / t$$

donde n_1 = No. spp existentes (en este caso las utilizadas) , n_0 =diversidad inicial (que es 1 porque todas tienen un ancestro común) y t =tiempo en ma. Sustituyendo $n_1= 208$ en ambos casos y $t=11.08$ ma y $t=7.05$ nos da una tasa de especiación de 0.75 especies por millón de años. Si aunado a esta, consideramos las fechas del árbol consenso obtendríamos un rango de 0.45-0.75 sp/ma.

Respecto a la fechación de la filogenia de Phyllostomidae se llevó a cabo el mismo procedimiento, fijando la edad de la divergencia entre *Pteronotus* y la familia

Phyllostomidae (nodo NOC) a 30 ma para estimar el parámetro suavizante, $\lambda = 1000,000$. Mientras que para la obtención de la estimación de las fechas se utilizaron los intervalos fósiles de la siguiente manera: NOC 30 - 42 ma, NVP 37 - 47 ma y NV 50 - 60 ma (Teeling, 2005). En la Tabla 6 se incluyeron las fechas obtenidas para ambas filogenias de los Phyllostomidae, tanto la consenso como la puntual con mayor verosimilitud MV (Figura 4) para una comparación más sencillas con las obtenidas para los clados de Agavaceae.

6. Tendencia de las tasas de especiación en *Agave sensu lato*

Para analizar el surgimiento de las especies de agave en el tiempo, se evaluó con LASER (Rabosky, 2006b) el modelo de especiación que mejor se ajustaba a la sección de *Agave sensu lato* del árbol fechado. De esta forma se seleccionó el modelo "yule-3 rate variable", que como se puede observar en la Tabla 5 al comparar sus valores de ΔAIC presenta un ajuste significativamente mejor a los demás modelos evaluados. Cualquier modelo con una diferencia en su valor de ΔAIC mayor a 13.5 (valor crítico determinado mediante el histograma de frecuencias de los valores de ΔAIC_{RV} en las filogenias simuladas) deber ser rechazado, por lo que el modelo "yule-2 shifts" que sería el siguiente con mejor ajuste al presentar una diferencia de 91 unidades, se rechaza. El modelo "Yule-3 rates" tiene 5 parámetros ($r1$, $r2$ y $r3$ son las tres distintas tasas y $st1$ y $st2$ que son los tiempos en que éstos cambios de tasa ocurren "shift times").

Esto mismo se puede observar en la gráfica del surgimiento de los linajes en el tiempo LTTP (Figura 5), que es otro de los resultados generados por LASER generada a partir del árbol ultramétrico fechado. En ésta se señalan las dos fechas a las cuales ocurren los dos cambios en la tasa de diversificación así como los valores de las pendientes que equivalen a las tres distintas tasas registradas.

Tabla 7. Selección del modelo de especiación mediante LASER														
Modelo	Parámetros	NP	Tipo	LH	R1	R2	A	Xp	K	St	AIC	St2	R3	Δ AIC
1. pureBirth	r1	1	RC	-14.068	0.128	NA	NA	NA	NA	NA	30.136	NA	NA	45.635
2. BD	r1, a	2	RC	-14.068	0.128	NA	0	NA	NA	NA	32.136	NA	NA	47.635
3. DDL	r1, k	2	RV	-1.106	0.525	NA	NA	NA	31.1	NA	6.213	NA	NA	21.712
4. DDX	r1, x	2	RV	-2.068	5.322	NA	NA	1.29	NA	NA	8.137	NA	NA	23.636
5. yule2 rates	r1, r2, ts	3	RV	7.311	3.042	8.91e-002	NA	NA	NA	10.68	-8.623	NA	NA	6.876
6. yule 3 rates	r1, r2, r3, st1, st2	5	RV	12.749	2.967	1.33e-001	NA	NA	NA	10.76	-15.499	2.66	0.0122	0

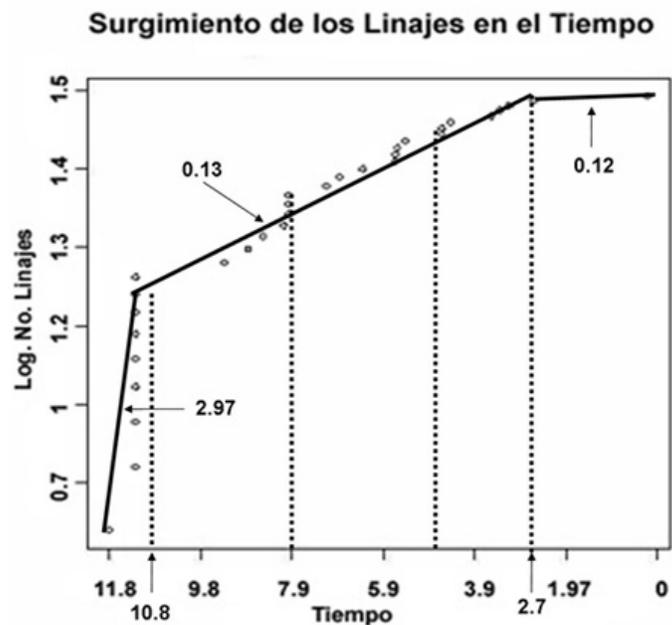


Figura 5. Surgimiento de especies en el tiempo (LTTP), en escala semilogarítmica. Esta gráfica se construyó a partir la sección de *Agave sensu lato* del árbol ultramétrico fechado de Agavaceae. Las

pendientes muestran las tres tasas de diversificación estimadas para “Yule3” (r_1 2.97, r_2 0.13 y r_3 0.012). Asimismo se señalan con flechas las fechas en que estos cambios en las tasas ocurrieron (10.8 ma y 2.7 ma). Las líneas punteadas indican otros dos cambios en las tasas (uno hace 7.9 ma y 4.7 ma aprox.) que se observan de manera cualitativa.

VII. DISCUSIÓN

1. FILOGENIA

1.1 Muestreo Taxonómico

La relevancia del muestreo en éste tipo de estudios radica en que se sabe que tiene un efecto tanto en la estimación filogenética como en la fechación y en el análisis de sus tasas de diversificación. En éste estudio no se incluyeron todas las especies de *Agave sensu lato*, como es el caso de la mayoría de los trabajos similares, debido en primer lugar a que no fue posible conseguirlas, extraer el ADN, amplificarlo o secuenciar todos los fragmentos de interés y debido que nuestro interés principal no se centraba en conocer las relaciones filogenéticas entre cada una de las especies del género sino construir una idea general lo suficientemente robusta para permitirnos fecharla y obtener las edades de los nodos críticos en relación a una posible coevolución con sus murciélagos polinizadores. Debido a esto, entre otras razones se hizo un muestro muy cuidadoso incluyendo todos los géneros de *Agavaceae sensu lato*, buscando incluir la mayor diversidad morfológica, ecológica y geográfica (dentro de México) así como de los géneros *Furcraea* y *Beschorneria* que juntos constituyen su grupo hermano. La importancia del muestreo de los demás géneros de la familia *Agavaceae* radica en el interés de poner en un contexto evolutivo a *Agave sensu lato* pero sobre todo en obtener una fechación lo más precisa posible mediante la disminución de la distancia entre el punto de calibración y el resto de las especies.

Por su parte el muestreo de sus murciélagos polinizadores tuvo un objetivo sutilmente distinto. En éste caso la principal motivación de la reconstrucción filogenética era poder obtener fechas confiables sobretodo para los géneros que potencialmente pudieran haber desempeñado un papel relevante en la diversificación de *Agave sensu lato*, lo que implica que tengan una dieta basada en polen y néctar y que compartan la distribución geográfica. De ésta manera decidimos incluir todos los representantes que fuera posible de la subfamilia Glossophagini así como miembros de Phyllostomidae de los que se tuviera información temporal.

1.2 Reconstrucción filogenética

Se eligieron genes de cloroplasto para la reconstrucción filogenética de Agavaceae debido a que por ser de herencia materna no recombinan. Dentro del ADN del cloroplasto elegimos el gen *matk* así como fragmentos no codificantes (*trnL-trnF*, *trnD-trnT*) debido a que su baja presión de selección incrementaba la probabilidad de que presentaran una alta tasa de substitución. De esta manera se esperaba tener secuencias capaces de resolver al máximo las relaciones tanto al interior de *Agave sensu lato* como a nivel de la familia. De haberse utilizado genes nucleares, nos habríamos enfrentado muy probablemente a genes parálogos, ya que varias de las especies de *Agave* son poliploides (Pinkava y Baker, 1985). El bajo número de sitios variables encontrado en los cuatro espaciadores utilizados aún a nivel de la familia sugiere, que puede tratarse de una diversificación reciente y es muy probable que de haberse utilizado regiones codificantes la resolución habría sido menor.

Por su parte, para Phyllostomidae se utilizó el citocromo *b* ya que se ha reportado que este gen es un buen marcador para resolver las relaciones filogenéticas a este nivel en otros grupos de mamíferos y a que las secuencias de la mayoría de las especies de interés se encontraban disponibles.

Respecto al método de reconstrucción filogenética decidimos utilizar Inferencia Bayesiana (MRBAYES) debido a que permite el uso de diversos modelos de substitución (a pesar de que finalmente no fue necesario utilizar distintos modelos

para cada fragmento, pero si se hubiera requerido es sencillo y eficiente computacionalmente) conservando la nube de probabilidades tanto de la topología como de los demás parámetros, así como elegir un árbol en base a un criterio objetivo (mayor valor de verosimilitud) para análisis particulares (Nylander et al., 2004). Con este método es posible detectar de manera sencilla cuando se estabiliza cada uno de los parámetros así como la verosimilitud de estos y dependiendo del interés del usuario, elegir uno o hacer un consenso que refleje toda la nube de probabilidades. Una ventaja de las aproximaciones probabilísticas es que el uso de modelos permite la exploración de los datos de manera explícita, el cálculo de longitudes de ramas aunado a que la selección del árbol no depende de una combinación particular de estados de carácter en los nodos internos (como en Máxima Parsimonia) debido a que cada estado tiene una probabilidad asociada (Lewis, 1998).

Una vez elegida la topología se decidió re-estimar sobre esta las longitudes de ramas mediante máxima verosimilitud, ya que es una manera más precisa de hacerlo (debido a que en un análisis bayesiano la estimación de las longitudes de rama es tan solo uno más de los parámetros mientras que en un análisis de MV en el que se proporciona la topología se concentra todo el esfuerzo en su estimación) y éste es el parámetro (junto con la topología) en el que se basa tanto la fechación y análisis de las tasas de diversificación (Sanderson, 2003).

1.3 Interpretación de la Filogenia de Agavaceae

Este estudio concuerda con la evidencia molecular y morfológica en que *Agave sensu stricto* es polifilético. El linaje que en éste trabajo llamamos *Agave sensu lato* incluye *Agave s.s.*, *Manfreda*, *Polianthes* y *Prochnyanthes* y si constituye un grupo monofilético con un soporte de 1.0 de probabilidad posterior, sin embargo de manera independiente cada uno de éstos géneros es polifilético. Asimismo los

grupos morfológicos propuestos por Gentry en 1982 tampoco forman grupos naturales (ej: *A. lechuguilla* y *A. victoria-reginae* pertenecen a Marginatae, *A. inaequidens* y *A. cupreata* a Crenatae, a pesar de esto ninguno de estos pares se agrupan) de ahí que las especies que pertenecen al mismo grupo se ubiquen en clados distintos. Sin embargo, sí se forma un clado integrado por la mayoría de las especies de *Manfreda* con un soporte de 0.58 (excepto *M. guttata* la cual no queda resuelta y *M. pubscens* que se agrupa con *A. cupreata*) y otro conformado por varios representantes de varios *Polianthes* y *Prochnyanthes mexicana* con los tres individuos de *A. striata* así como con *A. lechuguilla*. Sin embargo otro grupo de *P. howardii*, *P. tuberosa* y *P. longiflora* se agrupan con *A. guiengola*. Este resultado sugiere que probablemente *Manfreda* constituye un clado monofilético anidado dentro de *Agave sensu lato*, mientras que *Polianthes* y *Prochnyanthes* si serían polifiléticos.

En la filogenia de Agavaceae se muestra de manera contundente con una probabilidad posterior de 1.0 que el grupo hermano de *Agave sensu lato* es *Furcraea/Beschorneria*, clado monofilético formado por dos géneros polifiléticos. La parte más basal de la filogenia no presenta resultados contundentes ni probabilidades posteriores tan altas. Mientras en la filogenia puntual con el mayor valor de verosimilitud el grupo hermano de *Agave sensu lato* + *Furcraea/Beschorneria* es el genero *Yucca*, (dentro del cual *Y. queretaroensis*, especie mexicana queda más alejada del resto), en el consenso de mayoría el grupo hermano es el género asiático *Hosta*. El análisis sugiere que *Hesperoyucca* + *Hesperaloe* es el grupo más tempranamente divergente de todos, con un apoyo es de 0.64 de probabilidad posterior. Cómo ya se mencionó el status de *Hosta* no está claro, ya que mientras que en el consenso queda como grupo hermano del clado *Agave sensu lato* + *Furcraea/Beschorneria* con una probabilidad posterior de 0.59, en la topología puntual con el valor de máxima verosimilitud más elevado, la familia Agavaceae *sensu stricto* es completamente americana y monofilética.

1.4 Interpretación de la Filogenia de Phyllostomidae

La Familia Phyllostomidae constituye un clado monofilético con un apoyo de 1.0 de probabilidad posterior, al igual que la tribu Glossophagini con un apoyo de 0.99. En la filogenia puntual bayesiana con mayor verosimilitud Glossophagini es el grupo hermano de *Brachyphylla*, género principalmente nectarívoro. Ese grupo nectarívoro queda como hermano de diferentes géneros pertenecientes en su mayoría a la subfamilia Stenodermatinae (grupo de murciélagos frugívoros) a excepción de *Lonchophylla handleyi* y *Phyllonycteris aphylla*, especies nectarívoras. Por su parte el consenso de mayoría de las topologías bayesianas no conserva todas estas relaciones filogenéticas debido a la pérdida de resolución de algunos clados, sin embargo se conserva la monofilia de Phyllostomidae, Glossophagini y Stenodermatinae. En ambos estimados filogenéticos ese gran clado que depende de recursos vegetales queda como hermano de *Micronycteris*, grupo insectívoro de bosques húmedos neotropicales. Las especies que constituyen el grupo hermano de Phyllostomidae pertenecen a géneros (*Thyroptera*, *Myotis*, *Natalus*, *Furipterus* y *Pteronotus*) insectívoros, al igual que los grupos más tempranamente divergentes de la familia. De entre éstos el género más cercano a Phyllostomidae es *Pteronotus* con un apoyo de 0.99 de probabilidad posterior, seguido de *Furipterus* con un apoyo de 0.72.

2. ESTIMACIÓN DE LAS EDADES EN LAS FILOGENIAS

Se sabe que el muestreo taxonómico tiene un importante efecto en la estimación de las filogenias (Felsenstein, 1978; Graybel, 1998; Poe 1998;), asimismo se ha demostrado su influencia determinante en la estimación de las tasas y edades de los clados (Sanderson y Doyle, 2001; Linder et al., 2005). En lo que se refiere a la estimación de las fechas y el análisis de sus tasas de diversificación sensibilidad a un muestreo deficiente varía mucho entre los diferentes métodos. NPRS es sumamente sensible, al grado que un muestreo del 10% genera un estimado de la mitad de la

magnitud de la edad estimada incluyendo el 100% (Linder et al., 2005). El método bayesiano tiene una baja sensibilidad al muestreo, pero no a la distancia al punto de calibración, mientras que la Verosimilitud Penalizada PL (que fue precisamente el método que utilizamos) es el más resiliente tanto a un bajo muestreo (ambas filogenias de éste estudio) como a la distancia al punto de calibración (Linder et al., 2005). Podríamos pensar que si se tiene un muestreo completo, el mismo punto de calibración y el mismo fragmento de ADN los estimados temporales con distintos métodos podrían llegar a convergir en valores similares pero no es así, de ahí la importancia en evaluar si los datos se ajustan a un reloj molecular, porque de ser así lo más conveniente es utilizar éste método de fechación ya que es el menos sensible al muestreo y a la distancia al punto de calibración. Debido a que muchas veces la hipótesis del reloj molecular se rechaza, el método más recomendable es PL (Linder et al., 2005).

Evidencias empíricas también han mostrado que las estimaciones de las tasas y edades derivadas de genes y particiones de genes distintos suelen generar resultados diferentes. En nuestro caso resulta sorprendente que con un muestreo de especies, genes y métodos tanto de estimación filogenética como de fechación distintos encontremos fechas similares (entre 7 y 12ma) para el origen de *Agave sensu lato* a los obtenidos por Good-Avila et al. (2006).

En este trabajo tanto para Agavaceae (a pesar de ser regiones no codificantes) como para Phyllostomidae, se rechazó la hipótesis del reloj molecular, por lo que se eligió el método de Verosimilitud Penalizada (PL). Las fuentes de error recurrentes respecto a la fechación son la calibración de la filogenia y la estimación de las longitudes de rama. Respecto a la asignación de la *Protuyucca*, por las características morfológicas del fósil (Tidwell y Parker 1990) se considera cercana al origen de *Yucca* y para minimizar el error en la estimación de las longitudes de rama a utilizar se re-estimaron mediante máxima verosimilitud. Por su parte para Phyllostomidae se utilizaron tres puntos de calibración, lo cual protege contra errores que pueda presentar un único punto (Lee, 1999), ya sea por la edad asignada al fósil en cuestión como por la ubicación de éste en la filogenia. Tanto la fechación como el análisis de la tasa de diversificación son altamente confiables dada la estrategia de

muestreo y los métodos utilizados para su estimación.

Es probable que existan diferencias utilizando genes nucleares, en parte debido a que refleja la historia evolutiva biparental y a que su tasa evolutiva puede ser más alta que la de los genes neutros, por lo que sería interesante incluir al menos un gen para el estudio Agavaceae. Sin embargo se complicaría su interpretación aún clonando, debido a que muchas especies son poliploides.

2.1 Comparación de fechas estimadas entre árboles

Las edades estimadas para el origen de los clados y sus tiempos de divergencia son invariablemente más recientes en el árbol consenso con longitudes de rama promedio que en el árbol bayesiano con el valor asociado de verosimilitud más alto, tanto para Agavaceae como para Phyllostomidae. A pesar de esto en la filogenia de Agavaceae las fechas estimadas tanto para el origen de la familia, como para los grupos más tempranamente divergentes dentro de ésta (*Hesperoyucca*, *Hesperaloe* y *Yucca*) son muy similares en ambas filogenias, las diferencias significativas se encuentran en los grupos recientes dentro de los cuales se encuentra *Agave sensu lato* y su grupo hermano. Sabemos que estas diferencias no radican en el muestreo, en los genes utilizados, ni en el método de fechación (o punto de calibración) debido a que es el mismo en ambos casos, por lo que resulta posible concluir que se debe a las diferencias en la topología (pérdida de resolución en *Agave sensu lato* en la filogenia consenso) y sobre todo al método de estimación de las longitudes de ramas. Considerando que el estimado con MV es más certero, decidimos utilizar ese filograma para el análisis de las tasas de diversificación.

Comenzando por la edad para el origen de Agavaceae, nuestro estimado de 32 ma es más antiguo que el estimado por Eguiarte (1995) mediante una metodología más básica en 14 ma, así como del más reciente estimado por Good-Avila et al. (2006) entre 19 y 29 ma dependiendo el método y marcador utilizado. Sin embargo es más reciente que el propuesto por Pellmyr y Leebens-Mack (1999) que

estimaron que la colonización de *Yucca* por parte de sus polillas polinizadoras (*Tegeticula*) se dio hace 41.7 ma mediante la calibración (con evidencia biogeográfica) de un reloj molecular a las secuencias de ADN mitocondrial de *Tegeticula*. Ellos infieren que dada la rápida diversificación de los géneros polinizadores de polillas, la diversificación se dio simultánea o previamente. Cabe destacar que el fósil más antiguo reportado para Asparagales, grupo al que pertenece la familia Agavaceae es de hace 37.5 ma (Couper 1960; Muller 1981; Herendeen y Crane 1995), lo cual sugiere que 42 ma es un estimado demasiado antiguo, ya que Agavaceae no constituye el grupo más tempranamente divergente dentro de las Asparagales. Respecto a *Agave sensu lato* nuestro estimado en 11.8 ma también es un poco más antiguo que el de Eguiarte et al. (2000) que obtuvo 8 ma y los de Good-Avila et al. (2006) que van de 6 a 12 ma dependiendo del método de fechación y del marcador, dentro de los cuales el más cercano (9.8 ± 3.3 ma) fue el estimado con el espaciador de cloroplasto *trnL-trnF* mediante NPRS.

3. ANÁLISIS DE LAS TASAS DE DIVERSIFICACIÓN DE *AGAVE SENSU LATO*

La alta tasa de diversificación obtenida para *Agave sensu lato* indica que la gran cantidad de especies que contiene en comparación con otros géneros de Agavaceae (ej: *Yucca* el género que le sigue en diversidad y *Furcraea/Beschorneria*, su grupo hermano) es resultado de una radiación y no de una acumulación de especies en un largo periodo de tiempo. Los resultados señalan que *Agave sensu lato* se originó hace aproximadamente 11.8ma y tuvo su mayor diversificación hace 10.7ma, cuya tasa de diversificación promedio es de 0.3-0.5 sp/ma considerando únicamente las especies utilizadas en este trabajo y de 0.48-0.75 sp/ma incluyendo todas. Estos valores coinciden relativamente con los estimadores de tasas absolutas de diversificación $S = 0.32$ (que utiliza información de las longitudes de ramas, considerando un grado de extinción) y $D = 0.51$ (suponiendo que no hubo extinción), siendo este último el estimador utilizado en este estudio (Rocha et al., 2006).

Mientras que la tasa de diversificación de *Furcraea/Beschorneria* es de 0.26-0.45 sp/ma, mucho menor que la de su grupo hermano. El rango de la tasa de diversificación obtenido en ambas circunstancias (0.3-0.75) es considerablemente mayor a los dos estimados promedio reportados para las angiospermas: 0.077- 0.089 (Magallón y Sanderson, 2001) y 0.12 - 0.39 (Bremer, 1992). Aún comparado con grupos con tasas particularmente elevadas como son: la familia Asteraceae con un valor de 0.27 - 0.33 (Magallón y Sanderson, 2001) y la radiación de las "Silversword Alliance" en Hawai de 0.56 ± 0.17 (Baldwin y Sanderson, 1998) sigue siendo muy elevada y más considerando que la radiación de *Agave* es continental. Por su parte comparada con una radiación de peces (Goodeidae) mexicanos con una tasa con $D=0.217$ es bastante alta (Webb et al., 2004).

Nos interesa evaluar si durante la evolución de *Agave sensu lato* han existido incrementos en las tasas de diversificación en el tiempo, para así poder correlacionarlas ya sea con el surgimiento de algún carácter o estado de carácter particular, con características ecológicas y/o con el surgimiento de algún grupo con el que tenga una interacción importante, en este caso sus murciélagos polinizadores. Nosotros esperamos cambios en su tasa de diversificación, los cuales se observaron gráficamente como variaciones en la pendiente de la curva en distintos tiempos. El problema de un muestreo incompleto se puede abordar de dos maneras: construir intervalos de confianza simulando muestreos aleatorios de 40 spp de 208 spp o, como decidimos hacerlo, mediante la evaluación del ajuste de diversos modelos de diversificación en nuestra hipótesis filogenética. Una vez valorado el ajuste de varios modelos (con tasas constantes y variables, al igual que con y sin extinción y parámetros semejantes a la K implicaría denso-dependencia) se calcula tanto su verosimilitud como su AIC. Primero se determina si se trata de un modelo de tasa constante o variables mediante el ΔAIC , que por ser positivo nos indica que se trata de un caso con tasas variables. Posteriormente para evaluar si el modelo con mejor ajuste (en este caso Yule3 con tres tasas) es estadísticamente significativo se requiere construir la distribución de ΔAIC para obtener la magnitud que debe tener la diferencia entre modelos para tener 95% de confianza (Rabosky, 2006).

Dentro de las fechas sugerentes se encuentran: 10.7 ma en la cual ocurre un fuerte incremento en la tasa de diversificación que va de 3 a 0.1 sp/ma aproximadamente (en la cual coinciden los ajustes a los modelos Yule2 y 3). Esta es la edad de la mayor diversificación dentro del género *Agave sensu lato*. En segundo lugar destaca (detectado únicamente por Yule 3) la de 3 ma aproximadamente, edad de diversificación de las Manfredas recientes. Finalmente las otras fechas que sólo es posible detectar cualitativamente coinciden en cierto grado con la diversificación de un grupo de miembros de *Polygonanthes* incluyendo a *Prochnyanthes mexicana*.

4. CORRELACIÓN CON MURCIÉLAGOS POLINIZADORES

4.1 Correlaciones temporales

Las fechas estimadas para las filogenias de la familia Agavaceae y la de sus polinizadores (Phyllostomidae) concuerdan en gran medida, su origen data de 31.62ma y 34.6ma respectivamente. En Agavaceae esta fecha representa el momento en que se separa del género *Hosta*, perteneciente a Agavaceae *sensu lato*, que incluye a sus representantes asiáticos. Por su parte para Phyllostomidae constituye el origen de esta familia tan diversa en todos sentidos (hábitos alimenticios, hábitat, comportamiento etc.) y su separación de *Pteronotus* y todos las otras especies utilizados como grupos externos hace 40.97ma. *Pteronotus* es un género insectívoro al igual que los clados ancestrales al interior de Phyllostomidae y todas las otras especies utilizadas como grupos externos.

El origen de la Familia Phyllostomidae hace 34.61ma correlaciona con el origen de Agavaceae hace 31.62ma. *Agave sensu lato*, se originó hace 11.8ma (y hace 10.7ma tuvo su mayor diversificación) fecha que concuerda con el origen del género *Glossophaga* hace 11.8ma y la divergencia al interior de *Leptonycteris* en *L. nivalis* y *L. curasoae*, las especies más especializadas a la alimentación de polen y néctar hace 12.43ma. Esta fecha difiere drásticamente de los 200,000 años

estimados por Wilkinson y Fleming (1996), lo cual podría deberse a que utilizaron tanto genes como métodos de fechación distintos. Ellos utilizaron las distancias estimadas en un árbol de D-loop (un fragmento no codificante de ADN mitocondrial), asumiendo reloj molecular y sin utilizar ninguna calibración fósil. Los tiempos de divergencia entre las especies de *Leptonycteris* se basaron en distancias corregidas, asumiendo una tasa de diversificación del 10% por millón de año tomada de la región control entre ratones del género *Mus*, método sumamente cuestionado aún en esa época, de ahí que la extrema discrepancia no resulte sorprendente.

4.2 Tipos de polinización en cactáceas columnares y agaves

Se ha propuesto que la relación que existe entre los murciélagos del género *Leptonycteris* y las plantas de las que se alimentan (agaves y plantas columnares en zonas áridas) es asimétrica (Slauson 2000) ya que mientras ellos dependen del néctar y polen (Arita y Humphrey, 1988; Rojas-Martínez et al., 1999) de éstas, los agaves se benefician de su polinización, pero no les es indispensable. Sin embargo en bosques secos se alimentan principalmente de Bombacáceas árboles tropicales como *Ceiba* y *Pseudobombax* (Álvarez y González-Quintero, 1979; Arita y Ceballos, 1997), por lo que la dependencia de murciélagos polinizadores a cactáceas y agaves columnares presenta gran variación poblacional al interior de las especies involucradas.

Existen varias semejanzas entre los agaves y las cactáceas columnares, desde la gran abundancia y diversidad que presentan en ambientes áridos neotropicales (relacionada muy probablemente con la fotosíntesis CAM) hasta el grado de dependencia por parte de sus murciélagos polinizadores, la cual en ambos casos es mayor mientras más al norte de su distribución se encuentren. Otro ejemplo es el caso de *Yucca* y *Pachycereus schottii* (senita), ambos polinizados por polillas específicas, *Tegeticula* "yucca-moth" y *Upiga virescens* "senita-moth" respectivamente.

Sin embargo también existen diferencias importantes entre estos grupos; mientras

los murciélagos desempeñan el papel tanto de polinizadores como de dispersores de semillas de cactáceas (debido a que también se alimentan de sus frutos) para agaves sólo fungen como polinizadores. Asimismo mientras las fenologías de las especies simpátricas de cactáceas en los sitios de mayor diversidad como es Tehuacán -Cuicatlán, coinciden sugiriendo un bajo o nulo nivel de competencia (Valiente-Baunet et al., 1996,1997), en agaves sucede lo contrario, por ejemplo Meztitlán (Rocha et al., 2006).

Santos y Arita (2002) determinaron áreas prioritarias complementarias (basándose en los criterios de riqueza de especies y endemismos) para los murciélagos polinizadores en América encuentran que el Eje Neovolcánico transversal y la cuenca del balsas es de suma importancia (la segunda en importancia por diversidad y la primera tomando en cuenta el número de endemismos). Esta región cuenta con una alta riqueza de especies con distribuciones restringidas incluyendo 4 endémicas de Centroamérica: *G. leachii*, *G. morenoi*, *Hylonycteris underwoodi* y *Musonycteris harrisoni*. En el análisis de distribución de las especies de *Agave sensu lato* utilizadas en este trabajo esa región coincide con la de mayor diversidad (NV y SMS para nosotros), que es donde se encuentra la Barraca de Meztitlán y la reserva de Tehuacán-Cuicatlán, que es precisamente el área de mayor diversidad de cactáceas columnares. Esta es parte de una zona transición entre el neoártico y el neotrópico e incluye la mayoría de los biomas de México (Toledo y Ordóñez, 1998).

Las especies de murciélagos asociadas a bosque tropical tienden a presentar distribuciones amplias (Emmons, 1997), en contraste las de zonas áridas presentan distribuciones restringidas induciendo la formación de poblaciones aisladas de especies endémicas (Santos y Arita, 2002), lo mismo pasa con la mayoría de los agaves. García-Mendoza (1995) y Tambutti (2002) reportan que la mayoría de las especies de agaves se encuentran en un área de menos de 3 cuadros (cada uno de alrededor de 12,1000 km²) de un grado de latitud por uno de longitud; lo que implica

que la distribución total promedio por especie es de menos de 36,100km², equivalente a 190X190km.

Algunas especies de murciélagos polinizadores están consideradas en peligro de extinción debido a sus dietas especializadas, distribuciones restringidas y baja densidad poblacional. Asimismo tanto la presencia como la abundancia de los murciélagos está altamente correlacionada con la disponibilidad de plantas en floración, básicamente *Pachycereae* y *Agave* s.s. Por lo anterior, considerando especies migratorias (*Leptonycteris yerbabuena*) las siguientes áreas en orden de importancia serían: la Sierra Madre Oriental y Sierra Madre Occidental (más desierto de Sonora) las cuales contienen una gran diversidad tanto de agaves y como de cactáceas columnares (Santos y Arita, 2002).

Se han documentado cambios sutiles en la polinización de ambos grupos de plantas, mientras más al norte se encuentren menor es la dependencia a murciélagos polinizadores (el extremo de su distribución) y una mayor grado de polinización diurna, especialmente de aves aunque algunas veces de abejas, como es el caso de *A. lechuguilla*. Estos cambios se ven reflejados en su síndrome de polinización, en agaves se observan cambios en la coloración de las flores, se recorre el horario del pico de producción del néctar, así como la concentración de azúcares y proteínas en néctar y polen respectivamente. Por su parte en cactáceas el mayor cambio se da en el horario de apertura de las flores, como sucede en las especies de Baja California y el suroeste de Arizona (Fleming, 2002).

El que los murciélagos sean polinizadores impredecibles se ha planteado como una de las mayores fuerzas ecológicas en la evolución de un síndrome de polinización generalista de cactus columnares (Valiente-Baunet, 2002) y lo mismo pudo haber ocurrido en los agaves de zonas desérticas, constituyendo potencialmente un caso de coevolución entre los tres linajes. Sería interesante incluir las demás especies polen y nectarívoras mexicanas, pero especialmente a *Choeronycteris mexicana* y a *L. yerbabuena*.

IX. CONCLUSIÓN

En conclusión este estudio concuerda con evidencia morfológica y molecular en que *Agave sensu stricto* es polifilético y que el grupo natural monofilético incluye a los representantes herbáceos: *Manfreda*, *Polianthes* y *Prochnyanthes*. Asimismo ninguno de los 2 subgéneros de *Agave sensu stricto* (*Littaea* y *Agave*) es monofilético; de hecho se agrupan indistintamente. De igual manera tampoco se agrupan las especies pertenecientes al mismo grupo morfológico, de manera que éstos podrían estar más relacionados a su ecología que a su origen evolutivo.

La estimación de las edades de los clados y sus tiempos de divergencia dependen en gran medida del estimado de las longitudes de rama y en el método de fechación usado. Sin embargo también influye el muestro, el método de reconstrucción filogenética, de fechación y el fragmento de ADN utilizado. En este trabajo (controlando éstas variables al máximo) obtenemos un origen para el género *Agave sensu lato* de entre 11.8-10.7 ma la cual correlaciona con el de los géneros *Glossophaga* 11.8 y *Leptonycteris* 12.43 ma, lo cual apoya la hipótesis de una coevolución difusa entre estos linajes. El prolongado periodo pre-reproductivo de los agaves (entre 6-55 años dependiendo de la especie) permite que se acumule agua y nutrientes que serán utilizados posteriormente para la reproducción (producción de flores, frutos y semillas) de manera masiva (Slauson, 2000) y a la translocación del 68% aprox. de agua y nutrientes, en comparación con el 10% del promedio de otras plantas perennes (Nobel, 1977) causa la muerte de la roseta desde el punto de vista fisiológico. Este tipo de reproducción constituye la estrategia monocárpica presente en muchas radiaciones de plantas en ambientes extremos como son las lobelias africanas (Lobeliaceae), las silverswords de Hawai (Asteraceae), dendrosenecio (Asteraceae) y las puyas andinas (Bromeliaceae). Se ha documentado que a pesar de que esta estrategia no es muy común si se encuentra ampliamente distribuida taxonómicamente y por lo general los clados que la presentan tienen un mayor éxito reproductivo que sus hermanos iteróparos (Young y Augspurger, 1991). La estrategia monocárpica en *Agave sensu lato* puede constituir una innovación clave

en el contexto del surgimiento de unos eficientes polinizadores (debido a su alta dependencia en estas plantas y a que recorren grandes distancias) lo que favorece la ampliación de rangos de distribución de una alta heterogeneidad ambiental como es el territorio mexicano.

Perspectivas

El siguiente paso en el estudio de la radiación de *Agave sensu lato* implica el análisis de la evolución de sus áreas de distribución en el cual ya estamos trabajando. Para esto sería interesante aumentar el muestreo en zonas de la República Mexicana que no se hayan incluido (o que tengan un muestreo pobre respecto a su diversidad), más que buscar representar los grupos morfológicos de Gentry (1982) dado que nuestros resultados indican que éstos no forman clados.

Respecto a la evolución de la familia Agavaceae sería interesante incluir un mayor número de representantes del género *Yucca*. Específicamente a *Y. brevifolia* para contar con toda la diversidad morfológica, sin embargo independientemente de eso sería recomendable aumentar el porcentaje de representantes muestreados de éste género. En primer lugar porque es el género que se utilizó como punto de calibración, así como por ser el siguiente género con mayor número de especies dentro de la familia Agavaceae.

Otro aspecto de interés es el de la evolución de la semelparidad en *Agave*. Sin embargo este es un aspecto sumamente complejo conceptualmente, ya que primero habría que definir los diferentes grados de semelparidad debido a que muchas veces a pesar de que el rameto muere el geneto no lo hace. Asimismo mientras algunas especies sólo se reproducen sexualmente otras lo hacen únicamente de manera vegetativa. Una vez definidos los niveles de semelparidad habría que asignar a cada una de las especies a alguno de ellos, para lo cuál aún hacen falta estudios de historia natural, ya que para muchas especies se desconoce de manera certera su estrategia reproductiva. Una vez generada toda esta información, posiblemente se podría determinar el estado ancestral de la estrategia reproductiva de *Agave sensu*

lato y analizar cómo es que este se ha ido modificando correlacionándolo con distintos aspectos ecológicos. Uno de los aspectos ecológicos a valorar sería el tipo de polinización.

Por su parte respecto al papel de sus murciélagos polinizadores definitivamente deberíamos incluir al menos al resto de las especies pertenecientes a la tribu Glossophagini presentes en México. Al tener una filogenia fechada más detallada podríamos hacer correlaciones más finas respecto de la influencia del origen de grupos específicos de estos murciélagos sobre la diversificación de *Agave sensu lato*, su estrategia reproductiva y la evolución de sus áreas de distribución.

Apéndice de distribución de *Agave sensu lato*

Distribución de las especies utilizadas en el presente estudio de <i>Agave sensu stricto</i> en México				
Especie	Autor	Hábitat	Estados	Regiones
<i>A. angustifolia</i>	Haworth, 1812 <i>A. vivipara</i>	Savana tropical y bosque espinoso, Bosque tropical deciduo-seco	Casi todo México hasta Centroamerica (Panamá)	OCA, CP, NV, AM, SMO, SMC, SMS, YUC,
<i>A. deserti</i>	Engelmann, 1875	Desierto	California EUA, BCN y Sonora	BS
<i>A. cupreata</i>	Trealease y Berger, 1915	Cimas de montañas no heladas. Trópico de Cancer Larga estacion de secas	Michocán y Guerrero	NV, SMS
<i>A. inaequidens</i>	Koch, 1960	Pendientes de bosque de pino y encino zonas rocosas abiertas	Dgo., Jal., Hgo., Mich., DF, Mex., Mor., Pue.	NV, SMC, SMO
<i>A. potatorum</i>	Zuccarini, 1832	Zona semi-árida montañosa	Puebla y Oaxaca	NV, SMS
<i>A. fourcroydes</i>	Lemaire, 1864	Cultivado	Cultivada	No silvestre
<i>A. guiengola</i>	Gentry, 1960	En sombra ligera, climas templados a seco. En paredes de feldespató 90° y al pie montaña	Oaxaca (microendémica)	SMS
<i>A. vilmoriniana</i>	Berger, 1913	Acantilados a más de 1250 m. No resiste heladas.	Son. sur, Sin., Dgo., Jal., Ags.	SMC, AM
<i>A. schidigera</i>	Lemaire, 1861 <i>A. filifera</i> var. <i>schidigera</i>	Pendientes y crecimientos rocosos	Chih., Sin., Dgo., Zac., SLP, Nay., Jal., Gto., Ags., Mich., Gro.	SMC, NV, SMS, AM
<i>A. lechuguilla</i>	Torrey, 1858	Crece en caliche, ausente en zonas volcánicas	EUA: Sur de Nuevo México y Texas. México: Chih., Coah., NL, SLP, Tamps., Dgo., Zac., Qro., Hgo., Mex., DF.	SMO, NV, SMC, AM,
<i>A. petrophila</i>	García-Mendoza y Martínez 1998	Rocky slopes on calcareous soil	Guerrero y Oaxaca	SMS
<i>A. celsii</i>	Jacobi, 1865	Valles y planicies secas	Barraca Meztlán Hgo.	SMO
<i>A. striata falcata</i>	Zuccarini, 1832	Limitada a valles secos y planicies con precipitación anual <500mm	Coahuila (s3)	SMO
<i>A. striata</i>			Hidalgo, Zimapán (s1)	
<i>A. striata</i>			San Luis Potosí (s2)	
<i>A. garcia-mendoza</i>	Galván y Hernández, 2002	Matorral xerófilo	Hidalgo y Querétaro	SMO
<i>A. victoriae-reginae</i>	Moore, 1875	Climas secos, Matorral xerófilo, Afloramientos de carbonato clacio, paredes verticales	Sur de Coahuila, Centro de Durango, Noreste de Nuevo Leon	SMO

Distribución de las especies utilizadas de la Tribu Poliantheae: <i>Agave sensu lato</i> en México				
Especie	Autor	Habitat	Estados	Regiones
<i>Manfreda guttata</i>	Rose, 1903	Pastizales, sitios abiertos o campos rocosos, cumbres de montañas	Ags., Chih., Dro., Jal., Qro., SLP, Zac.	NV AM
<i>M. revoluta</i>	Klotzch, 1840	Sobre suelo arcilloso	Estado de México	NV
<i>M. fusca</i>	Ravenna, 1987	Bosque de pino-encino	Guatemala	OCA
<i>M. maculata</i>	(Martius) Rose, 1903	Meseta neovolcanica, pendientes rocosas, bosque encino, areas humedas sombreadas	Toluca, DF, Mex., y Taxo Gro., y Oax.	NV, SMS
<i>M. virginica</i>	Linné, 1753	Bosque y suelos rocosos y arenosos	Sureste EUA (de Missouri y Texas al Atlántico)	EUA
<i>M. jaliscana</i>	Rose, 1903	Rocoso, bosques de pino-encino y en pendientes de pastizal	Sonora Sur a Michoacan cerca de Jalisco	SMC, NV, CP
<i>M. pubscens</i>	Regel y Ortgies, 1874	Montañas, pendientes rocosas	Montañas Mor., Oax. y Chiapas	SMS, OCA, NV
<i>M. pringlei</i>	Verhoek, 1976	Bosque de pino y pino-encino	D.F., Hgo., Jal., Mex., Mich., Mor., Oax., Pue.	NV, SMS
<i>Polianthes densiflora</i>	Verhoek, 1976	Sitios abiertos del bosque de pino, sobre suelo calcáreo, en lugares húmedos, en depresiones arenosas	Chihuahua este (microendémica)	SMC
<i>P. graminifolia</i>	Verhoek, 1976	Bosque de pino-encino	Ags., Gto., Jal., Zac.	AM, NV
<i>P. tuberosa</i>	Linné, 1753	Nardo: sólo se conoce cultivada, ancestro <i>P. longiflora</i>	No hay poblaciones silvestres	-
<i>P. geminiflora</i>	Verhoek-Williams 1975	Bosque de pino-encino	Oax., Gro., DF, Mex., Mor., Hgo., Gto., Jal., Mich., Nay.	SMS, NV, SMO
<i>P. howardii</i>	Verhoek-Williams 1976	Suelos bien drenados en sombra parcial, bosque de encino o tropical deciduo	Colima y Jalisco	NV
<i>P. longiflora</i>	Rose, 1903	Bosque de pino-encino	Jalisco y Michoacán (poco)	NV
<i>Prochnyanthes mexicana</i>	(Zuccarini) Rose, 1903	Pendientes secas y rocosas, pino-encino, pastizales, zonas sombreadas y húmedas	Durango hasta Michoacan	NV, SMC

Datos de herbario de todas las especies utilizadas			
Especie	Colector	No. colecta	Localización
<i>Manfreda guttata</i>	Abisaí García Mendoza	6325	Municipio Batopilas, Chihuahua. 1 km al Oeste de Repuchinare.
<i>M. revoluta</i>	Abisaí García Mendoza	6543	Barranca de Malinaltenango, Mpio. Ixtapan de la Sal, Estado de México.
<i>M. fusca</i>	Abisaí García Mendoza	6266	9 km al Noroeste de Zaragoza camino a Comalapa, Mpio. Santa Cruz Balayna. Depto. Chimaltenango, Guatemala. 14° 41 ' 43" N 90° 53 ' 47" W
<i>M. maculata</i>	Abisaí García Mendoza	6087	Mpio. Zacualpan, 7 km al O de Zacualpan camino a Mamatla.
<i>M. virginica</i>	V.E. Mc Nelius	819	Tennessee, Loudon County
<i>M. jaliscana</i>	Calzada J.I., Flores G. y Solís A.	18737	Municipio San Pedro Lagunillas 1 km al S del entronque carretera Tepic-Chapalilla, Nayarit. 21.21 N 104.44 W
<i>M. pubscens</i>	Abisaí García Mendoza	6650	Rincón del Manguito, hacia Loma de Paxtle, Mpio. Lachixonace. Depto. Tehuantepec, Oaxaca
<i>M. pringlei</i>	Abisaí García Mendoza	6858	Mpio. Tlanepantla. Localizado a 1km el Norte de la desviación a San Felipe Neri, carretera Xochimilco-Oaxtepec. 19 2' N 98 56' W.
<i>Polianthes howardii</i>	Eloy Solano	868	Mpio. Ticuicítan Loc. 3 km al O sobre cerro de microondas de TV "Cerro Picila" 50 m antes de llegar al km 213. Altitud 1100 msnm
<i>P. graminifolia</i>	Eloy Solano Camacho	1114	Aguascalientes. Mpio. Jesús María. 1.5 km antes de llegar a la desviación a Milpillas. 21° 55' 09" N 120° 33' 43" W
<i>P. geminiflora</i>	V.W. Y P.I. Steinmann	2625	Michoacán municipio de Morelia a 2.5km SE de San Miguel del Monte doble la carretera a Tumbisca. 19 36' 30" N y 101 07' 30" W
<i>P. tuberosa</i>	Eloy Solano	1177	Mpio. Tantoyuca. Loc. El Manantial, Veracruz. 4.5 km aprox al NO de Ixcanelco. 21° 08' 50" N 98° 08' 49" W
<i>P. longiflora</i>	E. García	2933	Localidad Llano de Zinziro, Municipio Erongarícuaro, Michoacán.
<i>Prochnyanthes mexicana</i>	Gabriel Flores Franco	4079	Xalisco en el camino de terracería a el Carrizal. 21 23' 18 N, 104 57 22 W.
<i>Furcraea longaeva</i>	Abisaí García Mendoza y L. de la Rosa	6161	Falda de la honduras entre Cerro Oroije y Cerro Viborón Municipio San Pedro Nopala, Estado. Oaxaca. 17° 50' 18" N 97° 32' 19" W
<i>F. guerrerensis</i>	Abisaí García Mendoza y L. de la Rosa	6520	20 km al S de Chilpancingo, carretera a Tierra Colorada, Mpio. Mochitlán. Edo. Guerrero
<i>F. guatemalensis</i>	T. Wendt y A. Villalobos	4473	Oaxaca. Mpio. San Miguel Chimalapa. Rancho Quemado, al N del Cerro Pecho Blanco.
<i>F. macdoughallii</i>	Abisaí García Mendoza	6426	Jardín Botánico. Cultivada.
<i>F. parmentieri</i>	Abisaí García Mendoza	6235	3 km al N de Nahuatzen. Mpio. Nahuatzen. Michoacán
<i>F. cahum</i>	E. Martínez S.	27055	Municipio de Calakmul a 12 km al sur de Xan-ha camino a Xpujil 19° 0' 10" N, 89° 17' 37" W.
<i>Beschorneria calcicula</i>	Abisaí García Mendoza	2311	6 km al O de Tamazulapan camino a Chilapa, distrito de Teposcolula. Oaxaca.
<i>B. rigida</i>	Rzedowski	25644	Cerro del Agujón, cerca de El Zapote, aprox. 30 km al SSW de Río Verde. San Luis Potosí.
<i>B. tubiflora</i>	Abisaí García Mendoza	3199	Localidad La Palcita, 5 km al N de Minas Viejas, Mpio. Jacala, Hidalgo.
<i>B. septentrionalis</i>	Medrano	17381	Tamaulipas. Mpio. Hidalgo 3 km al E de Puerto Purificación, porción norte del área quemada de bosque de pino-encino.

Datos de herbario de todas las especies utilizadas (continuación)			
Especie	Colector	No. colecta	Localización
<i>Manfreda guttata</i>	Abisaí García Mendoza	6325	Municipio Batopilas, Chihuahua. 1 km al Oeste de Repuchinare.
<i>M. revoluta</i>	Abisaí García Mendoza	6543	Barranca de Malinaltenango, Mpio. Ixtapan de la Sal, Estado de México.
<i>M. fusca</i>	Abisaí García Mendoza	6266	9 km al Noroeste de Zaragoza camino a Comalapa, Mpio. Santa Cruz Balayna. Depto. Chimaltenango, Guatemala. 14° 41' 43" N 90° 53' 47" W
<i>M. maculata</i>	Abisaí García Mendoza	6087	Mpio. Zacualpan, 7 km al O de Zacualpan camino a Mamatla.
<i>M. virginica</i>	V.E. Mc Nelius	819	Tennessee, Loudon County
<i>M. jaliscana</i>	Calzada J.I., Flores G. y Solís A.	18737	Municipio San Pedro Lagunillas 1 km al S del entronque carretera Tepic-Chapalilla, Nayarit. 21.21 N 104.44 W
<i>M. pubescens</i>	Abisaí García Mendoza	6650	Rincón del Manguito, hacia Loma de Paxtle, Mpio. Lachixonace. Depto. Tehuantepec, Oaxaca
<i>M. pringlei</i>	Abisaí García Mendoza	6858	Mpio. Tlanepantla. Localizado a 1km el Norte de la desviación a San Felipe Neri, carretera Xochimilco-Oaxtepec. 19 2' N 98 56' W.
<i>Polianthes howardii</i>	Eloy Solano	868	Mpio. Ticuicítan Loc. 3 km al O sobre cerro de microondas de TV "Cerro Picila" 50 m antes de llegar al km 213. Altitud 1100 msnm
<i>P. graminifolia</i>	Eloy Solano Camacho	1114	Aguascalientes. Mpio. Jesús María. 1.5 km antes de llegar a la desviación a Milpillas. 21° 55' 09" N 120° 33' 43" W
<i>P. geminiflora</i>	V.W. Y P.I. Steinmann	2625	Michoacán municipio de Morelia a 2.5km SE de San Miguel del Monte doble la carretera a Tumbisca. 19 36' 30" N y 101 07' 30" W
<i>P. tuberosa</i>	Eloy Solano	1177	Mpio. Tantoyuca. Loc. El Manantial, Veracruz. 4.5 km aprox al NO de Ixcanelco. 21° 08' 50" N 98° 08' 49" W
<i>P. longiflora</i>	E. García	2933	Localidad Llano de Zinziro, Municipio Erongarícuaro, Michoacán.
<i>Prochnyanthes mexicanana</i>	Gabriel Flores Franco	4079	Xalisco en el camino de terracería a el Carrizal. 21 23' 18 N, 104 57 22 W.
<i>Furcraea longaeva</i>	Abisaí García Mendoza y L. de la Rosa	6161	Falda de la honduras entre Cerro Oroije y Cerro Viborón Municipio San Pedro Nopala, Estado. Oaxaca. 17° 50' 18" N 97° 32' 19" W
<i>F. guerrensis</i>	Abisaí García Mendoza y L. de la Rosa	6520	20 km al S de Chilpancingo, carretera a Tierra Colorada, Mpio. Mochitlán. Edo. Guerrero
<i>F. guatemalensis</i>	T. Wendt y A. Villalobos	4473	Oaxaca. Mpio. San Miguel Chimalapa. Rancho Quemado, al N del Cerro Pecho Blanco.
<i>F. macdougallii</i>	Abisaí García Mendoza	6426	Jardín Botánico. Cultivada.
<i>F. parmentieri</i>	Abisaí García Mendoza	6235	3 km al N de Nahuatzen. Mpio. Nahuatzen. Michoacán
<i>F. cahum</i>	E. Martínez S.	27055	Municipio de Calakmul a 12 km al sur de Xan-ha camino a Xpujil 19° 0' 10" N, 89° 17' 37" W.
<i>Beschorneria calcicula</i>	Abisaí García Mendoza	2311	6 km al O de Tamazulapan camino a Chilapa, distrito de Teposcolula. Oaxaca.
<i>B. rigida</i>	Rzedowski	25644	Cerro del Agujón, cerca de El Zapote, aprox. 30 km al SSW de Río Verde. San Luis Potosí.
<i>B. tubiflora</i>	Abisaí García Mendoza	3199	Localidad La Palcita, 5 km al N de Minas Viejas, Mpio. Jacala, Hidalgo.
<i>B. septentrionalis</i>	Medrano	17381	Tamaulipas. Mpio. Hidalgo 3 km al E de Puerto Purificación, porción norte del área quemada de bosque de pino-encino.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Arita H.T. and S. R. Humphrey. (1988) Revisión taxonómica de los murciélagos magueyeros del genero *Leptonycteris* (Chiroptera:Phyllostomidae). **Acta Zoológica Mexicana** **29**:60-1
2. Arita H.T. y C. Martínez del Río. (1990) Interacciones flor-murciélago: un enfoque zoocéntrico. **Publicaciones especiales del Instituto de Biología, UNAM, México, D.F. 4**: 1-35.
3. Arita H.T. y G. Ceballos. (1997) Los mamíferos de México: Distribución y estado de conservación. **Revista Mexicana de Mastozoología: vol. 2** 33-71..
4. Arizaga, S. (2000) Pollination ecology of *Agave macroacantha* (Agavaceae) in a mexican tropical desert. II The role of pollinators. **American Journal of Botany** **87**:1011-1017
5. Arizmendi M., Valiente-Banuet A., Rojas-Martínez A. y P. Dávila-Aranda (2002) Columnar Cacti and the diets of nectar-feeding bats, pp. 246-282. In T.H. Fleming and Valiente-Banuet (Eds.). **Columnar cacti and their mutualists**. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona, USA.
6. Avise, J.C. (2000) **Phylogeography: the History and Formation of Species**. Harvard University Press.
7. Axerold, D.I. (1979) Age and origin of the Sonoran Desert. *Occas. Pap. Calif. Acad. Sci.* 132:1-74.
8. Baldwin, B. and M.J. Sanderson (1998) Age and rate of diversification of the Hawaiian silversword alliance. **Proceedings of the National Academy of Science U.S.A.** **95**: 9402- 9406.
9. Barraclough, T.G., Vogler A.T.and P.H. Harvey(1998) Revealing the factors that promote speciation. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B** **353**: 241-240
10. Barraclough, T.G., Harvey P.H. and S.Nee (1996) Rate of rbcL sequence evolution and species diversification in flowering plants (angiosperms). **Proceedings of the Royal Society of London, Series B** **263**: 589-591

11. Barraclough, T.G. and S. Nee (2001) Phylogenetics and Speciation. **Trends in Ecology and Evolution** 16: 391-399
12. Berlocher, S.H. (1998) Can sympatric speciation be proven from phylogenetic and biogeographic evidence? In Howard, D.J. and S. H. Berlocher (Eds.) **Endless Forms: Species and Speciation**. Oxford University Press
13. Bogler D., J.C. Pires and J. Frenacisco-Ortega (2006) Phylogeny of Agavaceae based ndhF, rbcL and ITS sequences: implications of molecular data for classification. pp. 313-328. In J.T. Columbus, E.A.Friar, J.M. Porter, L.M. Prince, and M.G. Simpson (Eds.). **Monocots: comparative biology and evolution (excluding Poales)**. Rancho Santa Ana Botanic Garden, Claremont, California. USA.
14. Bolger, D J., and B.B. Simpson. (1996). Phylogeny of Agavaceae based on ITS rADN sequence variation. **American Journal of Botany** 83: 1225-1235.
15. Brooks, D.R. and D. A. McLennan. (1991) **Phylogeny, Ecology and Behaviuor: a Research Program in Comparative Biology**. Chicago University Press.
16. Cadaval-Narezo, A. (1999) Estudio evolutivo de los azúcares del néctar de Agave lechuguilla en el desierto de Chihuahua. Tesis de Licenciatura, UNAM, México D.F. 61p
17. Cole R.F. and D.E. Wilson (2006) *Leptonycteris yerbabuenae*. **Mammalian Species** 797:1-7
18. Couper, R. A. 1960. New Zealand Mesozoic and Cainozoic plant microfossils. New Zealand **Geol. Surv. Palaeontol. Bull.** 32:1–87.
19. De Queiroz A. (2002) Contingent Predictability in the Evolution: Key Traits and Diversification. **Systematic Biology** 51: 917-929.
20. Donoghue M.J. and B. Moore (2003) Toward an Integrative Historical Biogeography. **Integrative and Comparative Biology** 43: 261-270.
21. Eguiarte, L.E. (1995) Hutchinson (Agavales) vs. Huber y Dahlgren: análisis moleculares sobre la filogenia y evolución de la familia Agavaceae sensu Hutchinson dentro de las monocotiledóneas. **Boletín de la Sociedad Botánica de México** 56: 45-56.

22. Eguiarte, L.E. y A. Bórquez (1987) Reproductive ecology of *Manfreda Brachystachya* an iteroparous species of Agavaceae. S.W. **Naturalist** **32**: 169-179.
23. Eguiarte, L.E. y A. Bórquez (1988) Reducción en la fecundidad de *Manfreda Brachystachya* (Cav.) Rose, una agavacea polinizada por murciélagos: los riesgos de la especialización en la polinización. **Boletín de la Sociedad Botánica de México** **48**: 147-149.
24. Eguiarte, L.E., Souza V. y A. Silva-Montellano (2000) Evolución de la Familia Agavaceae: filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. **Boletín de la Sociedad Botánica de México** **66**: 131-150.
25. Emmons, L.H. (1997) **Neotropical rainforest mammals. A field guide 2ed.** Chicago:University of Chicago Press.
26. Faegri, K. and Van der Pijl (1979) **The principles of pollination ecology.** Pergammon Press Ltd, Oxford.
27. Felsenstein J. (1973) Maximum likelihood and minimum steps methods for estimating evolutionary trees from data on discrete characters. **Systematic Zoology** **22**: 240-249.
28. Felsenstein J. (1978) Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. **Systematic Zoology** **27**: 401-410
29. Felsenstein J. (1983) Statistical inference of phylogenies. **Journal of the Royal Statistical Society, Series A.** **146**: 246-272.
30. Fleming T.H. (2000) Pollination biology of four species of sonoran desert columnar cacti, pp. 207-223. In T.H. Fleming and Valiente-Baunet (Eds). **Columnar cacti and their mutualists.** The University of Arizona Press, Tucson, Arizona, USA.
31. Fleming T.H. (2000) Population biology of the lesser long-nosed bat *Leptonycteris curasoae* in Mexico and Northern South America, pp. 283-305. In T.H. Fleming and Valiente-Baunet (Eds.) **Columnar cacti and their mutualists.** The University of Arizona Press, Tucson, Arizona, USA.
32. Fulton, R.E. (1983) **Reproductive ecology of *Agave deserti* Engelm. (Agavaceae) in the absence of co-evolved bat pollinators.** M.S. Thesis,

California State University, Fullerton.

33. Good-Avila, S., Souza V., Gaut B. and L. Eguiarte (2004) Timing and rate of speciation in Agave (Agavaceae) **Proceedings of the National Academy of Science U.S.A. 103**: 9124-9129.
34. García-Mendoza, A. (1995) Riqueza y endemismos de la familia Agavaceae en México, pp.59-83 en E. Linares, P. Dávila, F. Ching, R. Bye y T. Elias (Eds.) **Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques**. UNAM. México D.F.
35. García-Mendoza, A. (1998) **Con Sabor a Maguey**. UNAM Pp.114
36. García-Mendoza, A. (2002) Distribution of Agave in Mexico. **Journal of Cactus and Succulent of the Society of America 74**: 177-186
37. Gentry, H.S. (1982) **Agaves of continental North America**. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona, USA. 670 p.
38. Givinish, J. and J. Systma (1997) **Molecular Evolution and Adaptive Radiation**.
39. Gillette, D.D. (1975) Evolution of feeding strategies in bats. **Tebiwa 18**: 39-48.
40. Goldman, N. (1993) Statistical tests of models of nucleotide substitution. **Journal of Molecular Evolution. 36**: 182-198.
41. Gonzáles, A. (2004) **Biología reproductiva y genética de poblaciones del Agave garcia-mendozae**. Tesis de Licenciatura, UNAM, México D.F. 88p.
42. Graybel, A. (1998) It is better to add taxa or characters to a difficult phylogenetic problem? **Systematic Biology 47**: 9-17
43. Hall, T. (2001) <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
44. Harvey, P.H. and M. Pagel (1991) **The comparative method in evolutionary biology**. Oxford University Press.
45. Herendeen, P. S., and P. R. Crane.1995. The fossil history of the monocotyledons. Pp. 1–21 in P. J. Rudall, P. J. Cribb, D. F. Cutler, and C. J. Humphries, eds. **Monocotyledons: systematics and evolution**. Royal Botanic Gardens, Kew, U.K.
46. Hernández, L. (1995) Análisis cladístico de la familia Agavaceae. **Boletín de la Sociedad Botánica de México 56** :57-68
47. Hillis, D.M. (1996) Applications of molecular systematics: the state of the field and

- a look to the future. In *Molecular Systematics*, eds. Hillis, D.M., Mortiz C., and B.K. Mable, pp. 515-543. **Sinauer Associates, Sutherland Massachusetts.**
48. Howell, D.J. (1972). **Physiological adaptations in the syndrome of chiropterophily with emphasis on the bat *Leptonycteris Lydekker***. Ph.D. dissertation, University of Arizona, Tucson.
 49. Howell, D.J. (1974) Bats and Pollen: Physiological aspects of the syndrome of chiropterophily. **Comparative Biochemistry and Physiology** 48 A: 263-276.
 50. Howell, D. and Roth B.S. (1981) Sexual reproduction in agaves: the benefits of bats; the cost of semelparous advertising. **Ecology** 62: 1-7.
 51. Huelsenbeck, J. P. and F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. **Bioinformatics** 17:754-755.
 52. Hughes C. and R. Eastwood (2006) Island radiation on a continental scale: Exceptional rates of plant diversification after uplift of the Andes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** vol.103 no.27 pp. 10334-1339.
 53. Johnson S.D. y Steiner K.E. (2000) Generalization versus specialization in plant pollination systems. **Trends in Ecology and Evolution** 15: 140-143.
 54. Kendall DG (1948) On the generalized birth-death process. **Annals of Mathematical Statistics** 19: 1-15.
 55. Kimura M. (1969) The rate of molecular evolution considered from the standpoint of populaion genetics. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 63(4): 1181-1188.
 56. Klark C. (2004) Unmatched tempo of evolution in the Southern African semi-desert ice plants. **Nautre** vol. 427:63-65.
 57. Koopman, K.F., (1993) Order Chiroptera. In *Mammal Species of the world. A Taxonomic and Geographic referenc.* 2ed., eds. D.E. Wilson and D.M. Reeder. Washington, D.C.: **Smithsonian Institution Press.**
 58. Kuban, J.F. (1989) The pollination biology of two populations of the Big Bend century plant, *Agave havardiana* Trel: a multiple pollinator syndrome with floral specialization for vertebrate pollinators. **Ph. D. dissertation, Syracuse University, Syracuse.**

59. Knox E.B. and Palmer J.D.(1995) Chloroplast DNA variation and the recent radiation of the giant senecios (Asteraceae) on the tall mountains of eastern Africa. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** Vol. 92 pp. 10349-10353
60. Lack D. (1947) Darwin's Finches. **Cambridge University Press.**
61. Lewis O.P. (1998) Maximum Likelihood as an alternative to Parsimony for inferring phylogeny using nucleotide sequence data. Pp. 132-163 in Slotis P., Slotis D. and Doyle J. eds. Molecular systematics in Plants. **Kluwer Academic, Boston.**
62. Lee, M.S.Y.(1999) Molecular clock calibrations and metazoan divergence dates. **Journal of Molecular Evolution.** 49, 385-391:
63. Linder H.P. et al., (2004) Taxon sampling effects in molecular clock dating: An example from African Restionaceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 35 569-582
64. Lutzoni et al (2000) Integrating ambiguous aligned regions of ADN sequences in phylogenetic analyses without violating positional homology. **Systematic Biology** 49(4):628-651
65. Magallón, S. and M. Sanderson (2000) Absolute diversification rates in angiosperm clades. **Evolution** 55 (9) 1762-1780.
66. Magallón, S. (2004) Dating Lineages: Molecular and Paleontological Approaches to the temporal framework of clades. **International Journal of Plant Sciences** 165 (4):7-21
67. Molina-Freaner, F. and L. Eguiarte (2003) The pollination biology of two paniculate agaves (Agavaceae) from northwestern Mexico: contrasting roles of bats as pollinators. **American Journal Botany** 90(7): 1016-1024
68. Moore, B.R., Chan K.M.A. and M.J. Donoghue (2004) Detecting diversification rate variation in supertrees. Pp. 487-533 in O.R.P. Bininda-Emons ed. **Phylogenetic supertrees: combining information to reveal the tree of life. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands.**
69. Muller, J. (1981) Fossil pollen of extant angiosperms. **Botanical Reviews** 47: 1–142.

70. Nee, S., Mooers, A.O., and P.H. Harvey (1992) Tempo and mode of evolution revealed from molecular phylogenies. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 89: 8322-8326
71. Nee, S., Holmes E.C., May R.M., and P.H. Harvey (1994) Extinction rates can be estimated from molecular phylogenies. **Philosophical Transactions: Biological Sciences** 344, 77-82
72. Nee, S. (2001) Inferring speciation rates from phylogenies. **Evolution** 55: 661-668
73. Nobel, P.S. (1988) Environmental biology of agaves and cacti. **Cambridge University Press, New York USA**. 270p.
74. Nylander, J.A.A., Ronquist F., Huelsenbeck J.P., and J.L., Nieves-Aldrey (2004) Bayesian Phylogenetic Analysis of Combined Data. **Systematic Biology** 53 (1): 47-67
75. Ornelas, J.F., Ordano M. and A. Hernández (2002) Nectar oasis produced by *Agave marmorata* Roezl. (Agavaceae) lead to spatial and temporal segregation among nectarivores in the Tehuacan Valley, Mexico **Journal of Arid Environment**. 52: 37-51
76. Pellmyr, O. (2003) Yuccas, yucca moths, and coevolution: a review. **Annual Missouri Botanical Garden** 90: 35-55.
77. Penny, D., P.J. Lockhart, M.A. Steel and M.D. Hendy (1994) The role of models in reconstructing evolutionary trees. In **Models in Phylogeny reconstruction** eds. Scotland, Siebert and Williams, pp. 211-230. **Clarendon Press, Oxford**.
78. Pinkava, D.J., and M.A., Baker (1985) Chromosome and Hybridation studies of agaves. **Desert Plants** 8 (2): 93-100
79. Poe, S. (1998) Sensitivity of phylogeny estimation to taxonomic sampling. **Systematic Biology** 47: 18-31
80. Posada D. and K.A. Crandall (1998) Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics** 14:817-818
81. Pybus, O.G. and P.H. Harvey (2000) Testing macroevolutionary models using incomplete molecular phylogenies. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences** 267, 2267-2272
82. Rabosky D.L.(2006) Likelihood methods for detecting temporal shifts in

- diversification rates. **Evolution** 60 (6) pp. 1152-1164.
83. Rauscher J.T. (2002) Molecular phylogenetics of the Espeletia complex (asteraceae): evidence from NRDNA ITS sequences on the closest relatives of an Andean adaptive radiation. **American Journal of Botany** 89 (7): 1074-1084.
 84. Rzedowski, J. (1993) Diversity and origins of the phanerogamic flora of Mexico, pp. 129-144. en: T.P. Ramamoorthy, R Bye, A. Lot y J. Fa [eds.] **Biological Diversity of Mexico. Oxford University Press. New York, USA.**
 85. Ree, R., B.R. Moore, C.O. Webb and M.J. Donoghue (2005) A likelihood framework for inferring the evolution of geographic range on phylogenetic trees. **Evolution**, 59 (11) pp. 2299-2311.
 86. Rhode, K. et al. (1996) Robust phylogenies and adaptive radiations—a critical re-examination of methods used to identify key innovations. **American Naturalist** 148:481-500.
 87. Rocha, M., Good-Ávila S.V., F. Molina-Freaner, H.T. Artia, A. Castillo, A. García-Mendoza, A. Silva-Montellano, B. Gaut, V. Souza and L.E., Eguiarte (2006) Pollination biology and adaptive radiation of Agavaceae, with special emphasis on Agave genus. **Aliso** 22, pp. 329-344
 88. Rojas-Martinez, A., Valiente-Banuet, A., Arizmendi, M. C., Alcantara-Eguren, A. & Arita, H. T. (1999) **Journal of Biogeography** 26, 1065–1077.
 89. Ronquist, F. (1997) Dispersal-vicariance analysis: A new approach to the quantification of historical biogeography. **Systematic Biology** 46: 193-201
 90. Ronquist, F. and J. P. Huelsenbeck. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics** 19:1572-1574.
 91. Sanderson, M. and M.F., Wojciechowski (1996) Diversification rates in a temperate legume clade: Are there "so many species" of Astragalus? **American Journal of Botany** 83:1488-1502.
 92. Sanderson, M.J. (1997) A nonparametric approach to estimating divergence times in the absence of rate constancy. **Molecular Biology and Evolution** 19, 101-109.
 93. Sanderson, M.J. (1998) Estimating rate and time in molecular phylogenies:

- beyond the molecular clock? Pp. 242-264 in Slotis P., Slotis D. and Doyle J. eds. **Plant molecular systematics. Chapman and Hall, London.**
94. Sanderson, M.J. and Donoghue, M.J. (1996) Reconstructing shifts in diversification rates on phylogenetic trees. **Trends in Ecology and Evolution** 11:15-20
 95. Sanderson, M.J. and Doyle (2001) Sources of error and confidence intervals in estimating the age of angiosperms from rbcL and 18S rDNA data. **American Journal of Botany** 88:1499-1516.
 96. Sanderson, M. (2002) PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), 4.0 edn, **Sinauer, Sunderland, MA.**
 97. Sanderson, M. (2003) r8s: inferring absolute rates of molecular evolution and divergence times in the absence of a Molecular Clock. **Bioinformatics** Vol. 19 No.2 301-302
 98. Santos, M. and H.T. Arita (2002) Priority areas for the conservation of new world nectar-feeding bats, pp. 342-363. In T.H. Fleming and Valiente-Baunet eds., **Columnar cacti and their mutualists. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona, USA.**
 99. Sauve, R.J. and S. Zhou (2005) Randomly amplified polymorphic DNA analysis in the genus *Hosta*. **Hortscience** 40 (5): 1243-1245.
 100. Shaw, et al (2005) The tortoise and the hare II. **American Journal of Botany** 92 (1):142-166.
 101. Simmons and Ochoterena (2000) Characters as sequence-based phylogenetic analyses. **Systematic Biology** 49 (2) : 369-381.
 102. Simpson G.G. (1953) **The Major Features of Evolution.** New York: Columbia Univ. Press.
 103. Silva-Montellano, A. (2001) Ecología reproductiva y genética de poblaciones de *Agave lechiguilla* (Torr.) en un gradiente latitudinal. **Ph.D.dissertation. UNAM, México D.F.** 142p.
 104. Silva-Montellano, A. and Eguiarte L.E. (2003) Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechiguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. I: Floral characteristics, visitors, and fecundity. **American Journal of**

Botany 90: 377-387

105. Silva-Montellano, A. and Eguiarte L.E. (2003) Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert.II: Genetic variation, differentiation, and inbreeding estimates. **American Journal of Botany** 90: 700-706
106. Schluter, D. (2000) The ecology of adaptive radiation. **Oxford University Press, Oxford UK**. 288P
107. Slauson, L. A. (2000) Pollination biology of two chiropterous agaves in Arizona. **American Journal of Botany** 87: 825-836
108. Slauson, L. A. (2001) Insights on the pollination biology of *Agave* (Agavaceae). **Haseltonia** 8: 10-23.
109. Sutherland, S.D. (1987) Why hermaphroditic plants produce many more flowers than fruits: experimental test with *Agave mckelveyana*. **Evolution** 41: 750-759.
110. Tambutti, M. (2002) Diversidad del Género *Agave* en México: Una síntesis para su conservación. **Tesis de Licenciatura. UNAM. México D.F.** 53p.
111. Teeling, E. (2005) A Molecular Phylogeny for Bats Illuminates Biogeography and the Fossil Record. **Science** Vol.307 pp.580-584
112. Tidwell, W.D. and L.R. Parker (1990) *Protopuccia Shadishii* gen. Et sp. Nov., An Arborescent Monocotyledon with Secondary Growth from the Middle Miocene of Northwestern Nevada, USA. **Review of Paleobotany and Palynology**, 62 pp.79-95
113. Toledo, V.M. y Ordóñez M. (1998) El Panorama de la biodiversidad de México: Una revisión de los hábitats terrestres. **En Diversidad Biológica de México: Orígenes y distribución**, eds. T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa México: **Instituto de Biología , Universidad Nacional Autónoma de México**.
114. Trejo, R. E. (2007) Dinámica de la polinización en *Agave difformis*, *A. garciae-mendozae* y *A. striata* (Agavaceae) en la Barraca de Mezitlán, Hidalgo. **Tesis de Licenciatura UNAM**
115. Van der Pijl, (1936) **Fledermaus und Blumen Flora** 131: 1-40
116. Verhoek, S. (1975) A study of the tribe Polianthae (including *Manfreda*) and revisions of *Manfreda* and *Prochnyanthes* (Agavaceae). **Ph.D.dissertation**,

Cornell University, Ithaca, New York, USA.401p.

117. Waser, N. and J. Ollerton (2006) From Specialization to Generalization. **University Chicago Press.**
118. Webb, S.A., J.A. Graves, C. Macias-Garcia, A.E. Magurran, D.O. Foighil and M.G. Ritchie (2004) Molecular phylogeny of the livebearing Goodeidae (Cyprinodontiformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution** 30 (3): 527-44.
119. Wetterer, A.L., M.V. Rockman, and N.B. Simmons. (2000) Phylogeny of Phyllostomid Bats (Mammalia: Chiroptera): Data From diverse morphological systems, sex chromosomes and restriction sites. **Bulletin of the American Museum of Natural History.** no. 248 200p.
120. Wiens, J. J. and M. J. Donoghue, (2004) Historical biogeography, ecology, and species richness. **Trends in Ecology and Evolution** 19: 639-644
121. Wilkinson, G.S. and Fleming T.H. (1996) Migration and evolution of the lesser long-nosed bats *Leptonycteris curasoae*, inferred from mitochondrial DNA. **Molecular Ecology** 5: 329-339
122. Wollenberg, K., J. Arnold and J.C. Avise (1996) Recognizing the forest for the trees: testing temporal patterns of cladogenesis using a null model of stochastic diversification. **Molecular Biology and Evolution** 13: 833-49
123. Yang Z. et al. (1994) Comparison of models for nucleotide substitution used in maximum-likelihood phylogenetic estimation. **Journal of Molecular Evolution** 11: 316-324.
124. Young and Aupurberg (1991) Ecology and Evolution of Long-Lived Semelparous Plants. **Trends in Ecology and Evolution** vol. 6 no. 9 Pp. 285-289
125. Zharkikh, A. (1994) Estimation of evolutionary distances between nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution** 39: 315-329