



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“BIOLOGIA REPRODUCTIVA Y GENETICA DE POBLACIONES DEL Agave garciae-mendozae”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A

ANDREA GONZALEZ GONZALEZ



FACULTAD DE CIENCIAS UNAM

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNZ



2004

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MEXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Andrea González González
FECHA: 15 abril 2004
FIRMA: Andrea G

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Biología Reproductiva y Genética de Poblaciones del
Agave garciae-mendozae"

realizado por Andrea González González

con número de cuenta 09955057-4 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns

Propietario M. en C. Martha Graciela Rocha Munive

Propietario Dr. Juan Servando Núñez Farfán

Suplente Dr. Eduardo Morales Guillaumin

Suplente Dr. Abisai Josué García Mendoza

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGIA

El presente proyecto se realizó en el laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología, UNAM, bajo la dirección del Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns y la M. en C. Martha Graciela Rocha Munive con apoyo del proyecto CONACYT-SEMARNAT COI-0246/A-1.

Conté con la beca Probetel de enero a junio del 2003 otorgada por la Dirección General de Evaluación Educativa así como también gocé de una beca por parte de la Fundación Telmex durante el mismo periodo.

Parte de éste trabajo se realizó en la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán contando con el apoyo tanto de las autoridades de dicha reserva la directora, Ing. Alejandra Rodríguez y el subdirector Ing. Salvador Montes, como con el del cuerpo de brigadistas.

*A mi familia, con todo mi cariño:
por el apoyo incondicional, gracias.*

A mis padres, por la fortaleza y resistencia para seguir juntos desde siempre,

A Abe y Emilio, por los inolvidables momentos,

A Cruz, por el apoyo y la compañía de hace años,

A Rufino, Blas, Nicolás y por supuesto a Tito, por su alegría y fidelidad.

“La vida no es un ensayo, aunque tratemos muchas cosas; no es un cuento, aunque inventemos muchas otras; no es un poema, aunque soñemos muchas cosas. El ensayo del cuento del poema de la vida es un movimiento perpetuo; eso, eso, un movimiento perpetuo”

Augusto Monterroso

Agradecimientos:

A lo largo del tiempo transcurrido entre el principio y final de éste trabajo han aparecido y desaparecido momentos de felicidad y desesperación, ya sea porque todo marcha de maravilla o porque las cosas no salen como uno quisiera. En estos ires y venires han estado presentes varios personajes que, de una forma u otra, han convivido conmigo, es por esto que quiero agradecerles.

Al Dr. Luis Eguiarte por la formación, apoyo y confianza brindados durante la elaboración de ésta tesis.

A Martha, por la vigilia, ayuda y paciencia permanentes con todo lo relacionado al proyecto, a mi formación y sobre todo, gracias por la amistad.

A los sinodales, por las buenas observaciones hechas al trabajo.

A Juan Fornoni por ayudarme a despejar las dudas de tipo estadístico y a César Abarca por los valiosos comentarios al trabajo, gracias por las pláticas también.

A Aldo Valera, Martha Rocha, Jaime Gasca, Ricardo Colín y Erasto Badillo; sin su apoyo y trabajo hubiera sido imposible obtener los datos de la parte de la Biología Reproductiva. ¡Qué equipazo!

Especialmente quiero agradecer al Sr. Erasto Badillo su ayuda invaluable, su comedimiento, siempre abriendo caminos, de día y de noche sin él hubiera sido aún más dolorosa y espinosa mi estancia en los cerros de Metztitlán. Gracias también a su familia por la hospitalidad y la amistad brindadas.

A Aldo Valera por la disposición incondicional para resolver los problemas técnicos de la parte “laboralesca” del proyecto, así como también por sus críticas, contribuciones y valiosos comentarios al proyecto, además, gracias por la amistad.

A todos los que le dan vida al Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental: a Valeria, por el apoyo brindado, por rescatarme de morir cada 15 minutos y por demostrarme que se puede hacer ciencia y ser una madre feliz al mismo tiempo. A Laura por los sabios consejos de cómo domar al PCR y a los geles, a Xitlali por su apoyo, críticas y discusiones permanentes al trabajo. A Ana (no solo por la silla),

René (por su excelente humor), Amanda, Jaime, Ricardo, Toño, Rodrigo, Tobías, doña Silvia y Arturo, por la compañía, las porras y ánimos que me dieron en todo momento.

A todo lo que implica la gloriosa Facultad de Ciencias, por todo lo que me dio. A los amigos y compañeros que hice y conocí durante la carrera: a Xitlali, por tu incondicional compañía, tu fortaleza y decisión ante la vida, gracias por respetarme, comprenderme y por enseñarme a aterrizar; a Mariana por las largas pláticas y el tiempo compartido, por tu valentía de explorar otros mundos; a Pablo por tu admiración ante lo azaroso, por tu intrincado pensamiento y andar; a Esteban por ser el menor y el más confiado de todos; a Vania por tu apoyo, las pláticas y la amistad sincera, porque la vida da vueltas y me alegra que estés cerca de mí; a Etzel, Amparo, Sandra, Kim, Suzete, Vanesa, Fernanda, Eva, Leticia; por las horas compartidas dentro y fuera de la facultad.

A los integrantes del laboratorio “304 Oriente” del Instituto de Fisiología Celular: El Dr. Ruy, Nallely, Gloria, María Elena, Marcela, Lino y Santiago; por aquellos tiempos, por haberme apoyado y motivado cuando apenas comenzaba a andar por los pasillos de los institutos.

A Alejandro, por su tiempo, por escuchar mis confusos pensamientos, por su ejemplo y sobre todo, por haber recuperado el cariño por la música.

Al laboratorio 301 oriente del Instituto de Fisiología Celular, por considerarme la amiga heredada (gracias a Alicia por el nombramiento y a Cristina, Víctor, Lina y Carlos, por respetarlo).

A Alexander de Luna, Luis Delaye y Eréndira, por todos los buenos, divertidos e inolvidables momentos, los académicos y los no tanto.

A Lev (por su compromiso ante lo que le gusta), a Miroslava (por compartir algunas penas del laboratorio), a Rodolfo (por su fanatismo por la música) y a León (por su paciente escuchar).

A Gabriel Moreno, por su buen humor desde tan lejos.

A Luis y Magali, por todos éstos años y los que nos faltan.

Al Sr. Francisco Escamilla, por demostrarme que en ésta vida, nada es imposible.

Resumen	1
Abstract	2
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Genética de Poblaciones	3
1.2. Los ISSR's	12
1.3. El género Agave	14
1.4. Biología de la polinización	19
1.5. Polinizadores y estructura genética	24
2. OBJETIVO	
2.1. Objetivos particulares	26
2.2. Predicciones o hipótesis	26
3. MATERIAL Y METODOS	
3.1. Biología reproductiva	28
3.2. Genética de poblaciones	35
4. RESULTADOS	
4.1. Biología reproductiva	42
4.2. Genética de Poblaciones	49
5. DISCUSIÓN	
5.1. Biología reproductiva	55
5.2. Genética de Poblaciones	63
6. CONCLUSIONES	72
Apéndice 1	73
Apéndice 2	74
Apéndice 3	74
Apéndice 4	76
Apéndice 5	78
7. BIBLIOGRAFÍA	80

RESUMEN:

Agave garciae-mendozae es una especie descrita recientemente (Galván y Hernández, 2002), pertenece al subgénero *Littaea* y que se distribuye en los estados de Hidalgo, Querétaro y San Luis Potosí. En éste trabajo se describen la biología reproductiva y la genética de poblaciones de *A. garciae-mendozae*, con el fin de entender cómo interactúan sus atributos florales con las fuerzas evolutivas que moldean su estructura genética. El trabajo correspondiente a la biología reproductiva se llevó a cabo en la población de Santa Mónica, ubicada en el estado de Hidalgo, México durante los años 2002 y 2003. Tanto la cuantificación temporal de la morfometría floral como la producción del néctar nos indican que las flores de esta especie presentan características asociadas a un síndrome quiropterofílico: la liberación del polen, la receptividad del estigma y la producción del néctar son nocturnos, los valores de concentración y de volumen son similares a los reportados en otras especies polinizadas principalmente por murciélagos. La observación de visitas florales llevada a cabo durante los dos años indica que el 55% de las visitas es realizado por dos especies de murciélagos (*Leptonycteris curasoae* y *Choeronycteris mexicana*) y el 45% restante por abejas y abejorros. Por otra parte, experimentos de polinización controlada sugieren que existe cierta preferencia por la heterocruza como sistema de polinización, aunque la especie es auto-compatible. Asimismo, los experimentos de exclusión de polinizadores señalan que el éxito reproductivo de la especie no depende totalmente de los polinizadores nocturnos aunque éstos sean los polinizadores coadaptados. Utilizando ISSR's (Inter-Simple Sequence Repeats) como marcador molecular, se analizaron 4 poblaciones de esta especie. Se encontraron niveles de variación genética y valores de flujo génico relativamente altos ($H_{esp} = 0.27$; $Nm = 1.3$) así como una diferenciación genética moderada ($\theta = 0.098$). También se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA), el cual indica que el 85% de la variación genética de la especie se encuentra dentro de cada una de las poblaciones. La relación entre las distancias geográficas y las genéticas calculadas nos indica que esta especie sigue un modelo de aislamiento por distancia. En síntesis, el hecho de que la especie presente altos niveles de heterocigosis se explica gracias a la presencia de un sistema de fertilización cruzada principalmente, la cual en condiciones naturales es efectuada por murciélagos. Gracias a estos polinizadores, el nivel de flujo génico entre las poblaciones es suficiente como para evitar que exista una fuerte diferenciación poblacional, explicando así el hecho de que la mayor parte de la variación genética de la especie se encuentre al interior de las poblaciones.

ABSTRACT:

Agave garciae-mendozae is a spicate agave species recently described (Galván and Hernández, 2002). It is native to the central Mexico to the states of Hidalgo, Querétaro and San Luis Potosí. In this work we describe the reproductive biology and populations genetics of *A. garciae-mendozae* in order to understand the interaction of its floral traits and the evolutive forces that shape its genetic structure. The reproductive biology work was carried out at the Santa Monica's population, in the Hidalgo state during 2002 y 2003. Both the cuantification of the morphometric floral characters and the nectar production suggest bat pollination (chiropterophily): the anthers dehiscence, the stigma receptivity and the nectar production occur at night; the concentration and volume nectar values are similar to those from other bat-pollinated *Agave* species. Floral visitor observations in the two years pointed out that the 55% of the total visitors are two bat species (*Leptonycteris curasoae* and *Choeronycteris mexicana*) and the other 45% are bees and bumblebees. On the other hand, pollination controled experiments suggest that cross-pollination is the most effective treatment although the species is autocompatible. Likewise, the pollinator exclusion experiments reveal that reproductive success of the species, does not depend totally of the nocturnal pollinators even though these are the coadapted pollinators. Using ISSR's (Inter-Simple Sequence Repeats) as the molecular marker, we analized four populations of this species. We found relatively high levels of genetic variation and gene flow ($H_s= 0.27$; $N_m= 1.3$) as well as a moderated genetic diferentiation ($\theta = 0.098$). The analysis of molecular variance point out that the 85% of the genetic variation is within each population. The relationship among the geographic a genetic distances suggest an isolation by distance model for this species. The high heterocigosis levels of the species is due by the presence of outbreeding system carried out by the bat species *Leptonycteris curasoae* and *Choeronycteris mexicana*. Because of these pollinators, the gene flow levels among populations is enough to mantain a weak population diferentiation, explaining the fact that the main part of the genetic variation is within the populations.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Genética de Poblaciones

Definición y objeto de estudio

A principios del siglo XX la gran pregunta que permeaba el ambiente científico era si las leyes de Mendel sobre la herencia podían reconciliarse con la Teoría de la Evolución propuesta por Darwin (Provine, 1971). Es entre los años de 1920 y 1930 cuando R. Fisher, J.B.S. Haldane y S. Wright demuestran que ambas teorías eran compatibles, dando origen a la disciplina que hoy conocemos como Genética de Poblaciones (Eguiarte, 1999), la cual se encarga de estudiar las bases genéticas de la evolución (Gillespie, 1998).

Además de tratar de entender las bases de la adaptación en las poblaciones naturales, los genetistas de poblaciones buscan analizar y predecir los efectos que tienen sobre una población fenómenos genéticos, tales como la segregación, la recombinación, la transposición y la mutación. Al mismo tiempo toman en cuenta los factores ecológicos y evolutivos que las afectan como por ejemplo su tamaño, sus patrones de apareamiento, su distribución geográfica, entre otros. En resumen, la Genética de Poblaciones se refiere al estudio de los procesos y mecanismos por medio de los cuales ocurre la evolución en las poblaciones naturales, entendido como el cambio en sus frecuencias alélicas a través del tiempo. Para esto, determina cuánta variación genética existe en dichas poblaciones, cuál es el origen de dicha variación, cómo se mantiene y distribuye y cuál es su importancia evolutiva (Hartl y Clark, 1989).

Los objetos de estudio de la Genética de Poblaciones son las frecuencias alélicas y la adecuación de los genotipos de las poblaciones naturales. Mientras las frecuencias alélicas son relativamente fáciles de medir, sus cambios no lo son, pues la escala temporal de cambio de la mayoría de las variantes genéticas es muy grande, del orden de millones de años (Gillespie, 1998). Por otra parte, la mayoría de las diferencias en la adecuación entre genotipos (las cuales pueden ser las responsables de algunos cambios en las frecuencias) son muy pequeñas, probablemente menos de 0.01%, lo cual es imposible medir directamente (Gillespie, 1998). Por lo tanto, esta disciplina hace uso extensivo de conceptos matemáticos y estadísticos los cuales le permiten describir y entender a los organismos, ya

que representan una serie de hipótesis que especifican las relaciones matemáticas entre las cantidades medidas y medibles (parámetros) en el proceso evolutivo, con el fin de simplificarlos y así poder entenderlos y predecirlos (Hartl y Clark, 1989).

Por lo general las poblaciones naturales no son simples es decir, la mayoría de las poblaciones son dinámicas temporal y espacialmente: conforme pasa el tiempo cambian de tamaño, de densidad, de localidad, y con respecto al espacio pueden fragmentarse en varias poblaciones o unirse con otras. Es por ésta razón que los estudios de genética evolutiva se centran en poblaciones “ideales”, las cuales presentan las siguientes características: son muy grandes, los organismos que las conforman son diploides, con reproducción sexual, sus generaciones no se sobrelapan y presentan apareamientos azarosos (Hartl y Clark, 1989; Hedrick, 2000). Por otro lado, los genetistas de poblaciones han elaborado modelos en donde los estudios evolutivos se enfocan a un locus con dos alelos, es así como nace la Ley del Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW), la cual no es más que un modelo que describe la relación que hay entre las frecuencias alélicas y genotípicas en un estado de equilibrio de un sólo locus, en una población diploide que se entrecruza aleatoriamente (Gillespie, 1998).

De los supuestos anteriores se espera que las frecuencias alélicas (y por lo tanto, la composición genotípica) de la próxima generación sean exactamente iguales a las de una anterior (no hay evolución) (Hartl y Clark, 1997). Éste fenómeno es la implicación más importante del principio del EHW y se da gracias a la ausencia de las fuerzas evolutivas:

- *Migración o flujo génico*

Tiene fuertes efectos homogeneizadores entre distintas poblaciones; si continúa mucho tiempo, eventualmente las dos poblaciones serán idénticas. Asimismo, puede aumentar la variabilidad genética existente de una población en un momento dado, variación sobre la cual puede operar la selección natural y conducir a la adaptación. Por otro lado, pueden migrar individuos con genes adaptados a otras condiciones y, en consecuencia, disminuir la adecuación promedio (adaptación) de la población a la cual llegan dichos genes (Eguiarte et al., 2000).

- *Mutación*

Toda novedad y variación genética se origina a partir de ella. Es la fuente primaria del material de la evolución. Dentro del modelo, las mutaciones que se consideran, son aquellas

que dan origen a un nuevo alelo o a una nueva secuencia nucleotídica. Sin embargo, la magnitud de las tasas de mutación en la naturaleza es muy baja, del orden de 10^{-5} a 10^{-8} (es decir, para un gen dado tenemos un mutante cada 10^5 a 10^8 gametos o células), y esto hace a la mutación un mecanismo muy lento; se requieren miles de generaciones para obtener un pequeño cambio en las frecuencias alélicas (Eguiarte et al., 2000).

- *Deriva génica*

Se da cuando las poblaciones naturales son pequeñas, cuanto más pequeñas, más importante será la deriva. Esto se debe a que al haber pocos individuos en las poblaciones, se presentan los llamados errores de muestreo: algunos individuos producen mayor número de hijos que otros, sin que la selección intervenga. Entre más chica es la población los errores de muestreo son más relevantes y con mayor rapidez cambian las frecuencias alélicas. Es por esto que la deriva génica promueve cambios en las frecuencias alélicas al azar y eventualmente promoverá que se fije alguno de los alelos (Eguiarte et al., 2000).

- *Endogamia*

Se presenta cuando los apareamientos no son al azar, sino que se cruzan con más frecuencia individuos con un grado de consanguinidad mayor al de dos individuos que se tomaran al azar en la población. Aunque la endogamia no cambia las frecuencias de los alelos, sí cambia la de los genotipos, aumentando así, la frecuencia de los homocigos y reduciendo la de los heterocigos (Hartl y Clark, 1989; Eguiarte et al., 2000; Aguirre, 2004).

- *Selección natural*

Es la supervivencia y reproducción diferencial de organismos diferentes es decir, se da gracias a que los diferentes genotipos no son igual de eficientes para dejar hijos. Esta eficiencia se interpreta en términos de adecuación (denominada w). La adecuación es una medida que indica la eficiencia de un genotipo dado y señala cuántos hijos en promedio deja un portador de ese genotipo. Se considera que la selección natural actúa sobre un "locus" o potencialmente en otros que se encuentren en una región cercana (Eguiarte et al., 2000; Aguirre, 2004).

La acción de estas fuerzas evolutivas se puede visualizar utilizando la topografía adaptativa (o *shifting balance*). Una topografía dada puede tener varios picos y valles. Los picos adaptativos son los lugares con mayor adecuación promedio y la selección nos conduce a alguno de estos picos. Sin embargo, la selección por sí sola no va a guiarnos

hacia el mayor pico adaptativo, sino que nos dirige hacia el pico en cuyo pie nos encontremos inicialmente. Para llegar a otros picos se requiere de la acción de las otras fuerzas evolutivas. La mutación saca un poco en cada generación del lugar en donde se encuentra la población. La migración puede ayudar a la población a llegar a un pico si aumenta la variabilidad genética por la llegada de nuevos alelos que sean seleccionados positivamente, o bien baja a la población en estudio de su pico adaptativo o puede hacer que llegue a los pies de otro si los individuos que llegan tienen genes adaptados a otras condiciones. La deriva génica movería al azar a ésta topografía y con mayor violencia cuánto más pequeña sea la población (Hartl y Clark, 1989; Eguiarte et al., 2000).

Variación genética

A pesar de que el concepto de variación en sentido biológico existe desde los primeros trabajos taxonómicos realizados por los naturalistas, no fue sino hasta los 1930 con el nacimiento de la Teoría Neo-darwiniana de la evolución cuando se comenzó a documentar la variación genética dentro y entre las poblaciones naturales (Hedrick, 2000).

La primera herramienta desarrollada para obtener buenas estimaciones de la variación genética fueron las isoenzimas en los 1960's (Lewontin y Hubby, 1966; Harris, 1966). Posteriormente en los 1970's aparecieron las primeras secuencias de aminoácidos, (Lewontin, 1974) y para los 1980's las secuencias de ADN. Estas herramientas, junto con el desarrollo de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) han servido para obtener suficientes datos concernientes a la variación "escondida" de las poblaciones naturales, encontrando que en efecto, dichas poblaciones tienen altos niveles de variación genética. La PCR amplifica el ADN rápidamente, facilita su secuenciación nucleotídica y también ha permitido el desarrollo de marcadores moleculares con los cuales podemos analizar la variación genética (Wolfe y Liston, 1998). Entre los marcadores más utilizados encontramos a los RAPDs (Random amplified polymorphic DNA) (Williams et al., 1990), a los AFLPs (Amplified fragment length polymorphism) (Vos et al., 1995), a los Microsatélites (Hamada y Kakunaga, 1982) y a los ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats) (Gupta et al., 1994; Zietkiewicz et al., 1994).

La cantidad y el tipo de variación genética en una población es afectada potencialmente por la selección, la depresión por endogamia, la deriva génica, el flujo

génico y la mutación. Estos factores pueden tener efectos generales; por ejemplo, casi siempre se considera que la mutación es la causante de aumentar los niveles de variación, en comparación de la deriva génica y la endogamia las cuales se sabe que la disminuyen. Otros factores como la selección y el flujo génico pueden tanto aumentar como reducir la variación genética, dependiendo de la situación particular. Por ejemplo, la selección natural puede ser promotora de la variación sólo si favorece el establecimiento de los heterócigos (selección balanceadora) (Hedrick, 2000).

Medidas de la variación genética

La medida más común para conocer la variación genética de una población es la cantidad de heterocigosis que ésta presenta (Hedrick, 2000). La heterocigosis esperada (H_E) para un “locus” cualquiera con n alelos cuando una población está en equilibrio Hardy-Weinberg es la probabilidad de que al sacar dos alelos al azar de una población, éstos sean iguales:

$$H_E = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2$$

donde p es la frecuencia del alelo i .

Nei (1978) llamó a ésta medida “diversidad genética” y sugirió que es particularmente útil ya que puede ser aplicable a genes de ploidía diferentes y en organismos con diferentes sistemas reproductivos (Hedrick, 2000). Sin embargo, las propiedades teóricas de la distribución de la heterocigosis son complicadas (Hedrick, 2000), y las medidas que arroja no son muy sensibles a la variación adicional, debido a que el límite superior es la unidad, el cual es el mismo para cualquier número de alelos. Ésta limitante hace difícil establecer diferencias entre poblaciones cuando se tienen “loci” altamente variables tales como los microsátélites, en donde la heterocigosis puede ser de más de 0.8 (Hedrick, 2000).

Otra medida útil para cuantificar la variación genética es la proporción de “loci” polimórficos (P), definiéndose como aquellos “loci” cuya frecuencia del alelo más común es menor a 0.99 o 0.95:

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

donde x es el número de loci polimórficos en una muestra de m loci (Hedrick, 2000).

La medida de 0.99 es utilizada más frecuentemente si el tamaño de la muestra es adecuado (aproximadamente 100 individuos o más) (Hedrick, 2000). Para estimar la proporción de “loci” polimórficos (P) de una población primero es necesario contar el número de “loci” polimórficos y después calcular la proporción que esos “loci” representan de todos los “loci” examinados. Esta medida es apropiada para los “loci” encontrados mediante isoenzimas; en cambio, no es una medida muy confiable para “loci” muy variables, en los cuales una alta proporción de los “loci” son polimórficos para la mayoría de las poblaciones (Hedrick, 2000).

Otra medida es el número de alelos, n , es decir, un conteo de los alelos observados en un locus en una población. Sin embargo esta medida se encuentra fuertemente influenciada por el tamaño de la muestra por lo que una comparación entre poblaciones de diferentes tamaños debe ser hecha con cautela (Hedrick, 2000).

El hecho de que se hayan descrito las ventajas y desventajas de los tres estimados fue con el fin de conocer sus limitaciones y sus alcances para así decidir cuál de ellos utilizar, tomando en cuenta la biología de la especie y el tipo de marcadores utilizados en el estudio.

Estructura poblacional

Muchas especies tienen poblaciones frecuentemente subdividas en unidades pequeñas, debido a factores geográficos, ecológicos o conductuales.

Cuando una población está subdivida geográficamente, generalmente presenta diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas de las diferentes subpoblaciones que la conforman, lo cual dependerá principalmente del flujo génico efectivo que se establezca entre los subgrupos o subpoblaciones. Si los niveles de flujo génico son altos, habrá una tendencia a homogeneizar la variación genética de los grupos. Por el contrario, cuando el flujo génico es bajo, la selección natural, la deriva génica y aún la mutación pueden originar una diferenciación genética mayor entre las subpoblaciones. (Hartl y Clark, 1989; Hedrick, 2000).

Esta diferenciación genética se origina cuando la selección natural favorece diferentes genotipos en diferentes subpoblaciones, o cuando ocurren procesos aleatorios en la transmisión de los alelos de una generación a otra (deriva génica), o por diferencias azarosas en las frecuencias alélicas entre los fundadores iniciales de las subpoblaciones (efecto fundador) (Hartl y Clark, 1997).

En una población subdividida existen tres niveles diferentes de complejidad: los individuos (I), las subpoblaciones (S) y la población total (T), los cuales a su vez presentan sus propios niveles de heterocigosis: H_I (heterocigosis de un individuo en una población); H_S (heterocigosis esperada de un individuo en una subpoblación con apareamientos aleatorios) y H_T (heterocigosis esperada de un individuo en la población total que se aparean aleatoriamente) (Hartl y Clark, 1989). También, \bar{H}_I puede ser interpretada como la heterocigosis promedio de todos los alelos en un individuo, como la probabilidad de heterocigosis en cualquier gen o como la heterocigosis promedio observada entre las subpoblaciones. Por su parte, \bar{H}_S representa el nivel de heterocigosis que podría encontrarse en una subpoblación si ésta tuviese apareamientos aleatorios entre individuos; \bar{H}_S es igual a $2p_iq_i$ para una subpoblación con frecuencia alélica p_i . Finalmente, \bar{H}_T representa qué tanta heterocigosis encontraríamos si todas las subpoblaciones se juntaran y se aparearan aleatoriamente, por lo que si denotamos a la frecuencia alélica promedio entre las subpoblaciones como p_0 , entonces, \bar{H}_T sería igual a $2p_0q_0$ (Hartl y Clark, 1997; Hedrick, 2000).

Para cuantificar el efecto de la endogamia sobre la subestructura poblacional, Wright (1921) definió tres coeficientes F diferentes en términos de un locus con dos alelos, relacionados directamente con los tres niveles que presenta una población subdividida:

F_{ST} , conocido como índice de fijación subpoblacional mide la diferenciación genética sobre las poblaciones. Siempre es positiva debido a que el efecto Wahlund (reducción en los niveles de homocigosis después de una generación cuando se juntan las subpoblaciones y se aparean aleatoriamente) asegura que $\bar{H}_T > \bar{H}_S$ (Hartl y Clark, 1997). Si todas las subpoblaciones están en EHW con las mismas frecuencias alélicas, $F_{ST} = 0$. Este valor también representa la reducción en la heterocigosis de una subpoblación debido a la deriva génica aleatoria (Hartl y Clark, 1989):

$$F_{ST} = \frac{(\overline{H_T} - \overline{H_S})}{\overline{H_T}}$$

Si F_{ST} es igual a cero, significa que la población total está bajo EHW, mientras que si es igual a uno, todas las poblaciones son diferentes entre sí, lo cual se explicaría si da una de las poblaciones está fija para un alelo dado. También puede interpretarse en términos de porcentaje de la variación genética que se encuentra dentro y entre poblaciones: si es de cero, el total de la variación se encuentra en cualquier subpoblación, mientras que si es de uno, quiere decir que para tener el total de la variación se requiere tener a todas las distintas subpoblaciones ya que cada una está fija para un alelo dado. Esta diferenciación puede ser producto de la deriva génica o de la selección natural (Navarro, 1999). En el contexto de loci multialélicos, la F_{ST} es denotada como G_{ST} .

Otro parámetro utilizado para obtener el cálculo de diferenciación entre poblaciones es el llamado coeficiente de coancestría, representado con la letra grieta Theta (θ) (Cockerham, 1969), el cual representa la probabilidad de que dos genes aleatorios provenientes de diferentes individuos sean idénticos por descendencia (Weir, 1996); la coancestría se incrementa con el tiempo de tal manera que indica qué tan diferenciadas están las poblaciones.

F_{IS} también llamado coeficiente de endogamia mide la reducción en la heterocigosis de un individuo debido al apareamiento no azaroso dentro de su subpoblación (Hartl y Clark, 1989):

$$F_{IS} = \frac{(\overline{H_S} - \overline{H_I})}{\overline{H_S}}$$

F_{IT} o coeficiente de endogamia total de un individuo mide la reducción en la heterocigosis de ese individuo con respecto a la población total (Hartl y Clark, 1989):

$$F_{IT} = \frac{(\overline{H_T} - \overline{H_I})}{\overline{H_T}}$$

Flujo génico

Para calcular los valores de flujo génico existen métodos directos e indirectos (Slatkin, 1994). Los métodos directos consisten en estimar el flujo génico a partir de parámetros ecológicos, como la dispersión del polen y de semillas, además de los

parámetros demográficos relacionados con las especies en estudio. En los métodos indirectos, se utilizan marcadores genéticos como las isoenzimas o ADN, los cuales nos permiten evaluar la estructura poblacional como los estadísticos F y otras medidas relacionadas para así conocer el número de migrantes entre subpoblaciones (Hedrick, 2000). Slatkin (1985) sugirió que la frecuencia de los alelos raros podría también ser utilizada como estimador del flujo génico. El uso de diferentes medidas fue evaluado por Slatkin y Barton (1989) y Cockerham y Weir (1993).

Generalmente, la medida indirecta utilizada es el valor de Nm o “número de migrantes efectivos por generación”, en donde N es el número de los individuos por subpoblación y m es la tasa de migración. Nm es la probabilidad de que un alelo escogido al azar en cualquier subpoblación provenga de un migrante (Hartl y Clark, 1997; Hedrick, 2000).

El flujo génico puede restringir la evolución de una especie, evitando la diferenciación poblacional por adaptación a condiciones locales (se dice, entonces, que evita la especiación) o promover la evolución dispersando genes nuevos o combinaciones de genes a lo largo del área de distribución de una especie. Esto depende de si actúan otras fuerzas evolutivas en conjunto, además de la distribución geográfica de la especie (Slatkin, 1987).

Asimismo, existen dos modelos de cómo se puede dar el flujo génico entre poblaciones cuando éstas se encuentran estructuradas geográficamente. El modelo de islas representa el extremo de flujo génico a larga distancia. Los individuos nacidos en cada una de las poblaciones pueden llegar a otra cualquiera con la misma probabilidad. En el extremo opuesto, supongamos que las poblaciones locales se encuentran en un arreglo bidimensional en que el flujo génico ocurre sólo entre las poblaciones adyacentes. Éste es el modelo de migración llamado de piedras de paso o “stepping-stone” que representa el mínimo de las distancias de migración (Hartl y Clark, 1989; Eguiarte et al., 2000).

Distancia genética

La distancia genética es una cantidad proporcional a las diferencias genéticas existentes entre poblaciones ó especies. El número de sustituciones nucleotídicas por sitio o el número de sustituciones genéticas por locus son una medida de la distancia genética. Sin embargo,

históricamente, este valor se refiere a las diferencias genéticas obtenidas en función de las frecuencias genéticas (Nei, 1987).

De otra forma, un número que expresa similitud o distancia genética es aquel que evalúa la cantidad de variación compartida entre diferentes grupos. Si la medida es de 0, generalmente significa que no hay diferencia alguna entre los grupos. Estas similitudes o diferencias en el tipo, cantidad y patrón de variación genética entre poblaciones puede ser resultado de factores tales como que dos poblaciones se hayan separado recientemente, o que haya flujo génico entre ellas, o que sean poblaciones muy grandes (con poco deriva génica) o que las presiones de selección que afectan a los mismos locus sean similares en ambas poblaciones. Por otra parte, si dos poblaciones son diferentes se debe posiblemente a que esas poblaciones se aislaron mucho tiempo atrás y no hay flujo génico entre ellas o que la deriva génica ha generado grandes diferencias o que hay diferentes presiones selectivas en las dos poblaciones (Hedrick, 2000).

El algoritmo más utilizado para calcular la distancia genética es la distancia genética estándar de Nei (1972, 1978). Esta medida tiene la propiedad de que cuando los “loci” en estudio son neutrales, y aparecen nuevas mutaciones en nuevos alelos (modelo de los alelos infinitos), la distancia aumenta linealmente con el tiempo (Hedrick, 2000).

Cuando una especie presenta una distribución geográfica amplia, se espera, que las poblaciones más cercanas geográficamente también sean las más cercanas genéticamente. A este principio se le conoce como “aislamiento por distancia” (Wright, 1943) y nos dice que los individuos tienden a aparearse con aquellos más cercanos geográficamente de lo que se esperaría al azar.

1.2 Los ISSR's

En este trabajo utilizamos ISSR's como marcador molecular para conocer la variación genética de la especie en estudio.

Los ISSRs o Inter-Simple Sequence Repeats (Zietkiewicz et al., 1994), son un tipo de marcadores genéticos que nos permiten obtener los niveles de variación en las regiones microsatélite que se encuentran dispersas en varios genomas, particularmente el nuclear. Los microsatélites son secuencias de ADN muy pequeñas (generalmente de 16 a 25 pares de bases) e hipervariables, se expresan como diferentes variantes en las poblaciones y entre

diferentes especies y se caracterizan por ser repeticiones de mono, di, o trinucleótidos (Wolfe, 1998). En el caso de los ISSRs, generalmente se utilizan los di y trinucleótidos, debido a que son característicos del genoma nuclear mientras que los mononucleótidos se encuentran en el genoma del cloroplasto (www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/ISSR.html).

En los ISSRs se utilizan primers cuya secuencia está formada por di- o trinucleótidos con un nucleótido extra en la terminación 3'. El primer es complementario a una región microsatélite blanco, y el nucleótido extra permite que se de la amplificación solamente si el primer se pega a la terminación 5' del microsatélite con un primer nucleótido disponible en la secuencia flanqueadora. Tales nucleótidos extras juegan el papel de "anclas" y aseguran que la amplificación inicie siempre del extremo 5' del microsatélite. En donde el primer localiza dos regiones microsatélite separadas por una secuencia genómica amplificable del ADN blanco, la reacción de PCR generará una banda de tamaño particular (i.e., su peso molecular en pares de bases) para ese "locus", representando el pedazo de ADN que se encuentra entre los microsatélites (Bornet y Branchard, 2001) (Figura 1).

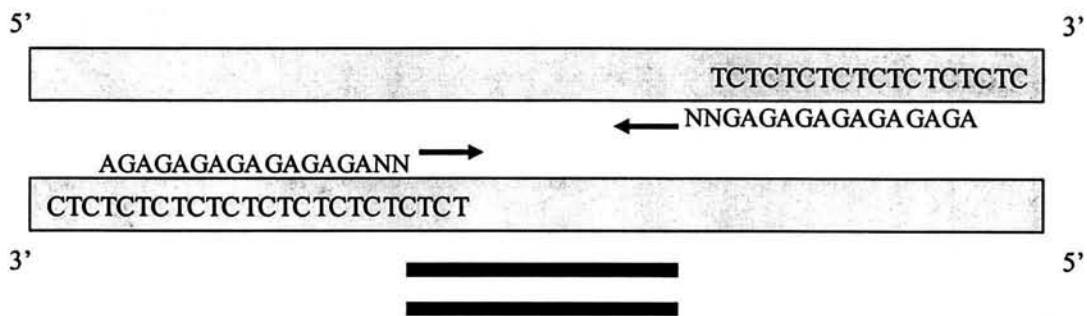


Figura 1. PCR de los ISSRs: representación esquemática de un solo primer (AG)₈ anclado en la terminación 3' con dos nucleótidos (NN), alineado en regiones específicas del ADN templado produciendo bandas claras (Modificado de Pradeep et al., 2002).

Debido a que una muestra particular de ADN presenta varias áreas de microsatélites "pareadas", los ISSR frecuentemente amplifican de 25 a 50 "bandas" en una sola reacción. Los polimorfismos que se obtienen se originan gracias a los cambios en los nucleótidos que sirven como "anclas". Las bandas obtenidas son analizadas como marcadores dominantes,

lo cual significa que cada banda corresponde a un locus. La presencia de la banda representa el genotipo dominante (tanto homócigo, como heterócigo), mientras que un blanco representa el genotipo homócigo recesivo. Esto es válido si se asume que solamente existen dos alelos por locus.

La ausencia de una banda puede deberse a varios factores:

- 1) La no existencia de un sitio de unión completo debido a una mutación.
- 2) Rearreglos estructurales en el cromosoma durante la meiosis.
- 3) Inserciones o deleciones lo suficientemente grandes como para aumentar o disminuir el tamaño de la banda, lo que dificulta identificarlas como un locus separado.

Las ventajas que nos ofrece esta técnica se centran principalmente en la alta variación que detecta, así como en su reproducibilidad, dada principalmente a las altas temperaturas de alineación de la PCR. Además, para diseñar los primers no es necesario conocer secuencias del genoma del organismo en estudio, por lo que se ha utilizado ampliamente en estudios de variación genética entre individuos muy cercanos y en la identificación de variantes con importancia agrícola (Nagaoka y Ogihara, 1997).

Las desventajas que presentan éste tipo de marcadores genéticos son dos principalmente. La primera se refiere a la seguridad que se pueda tener con respecto a si las bandas del mismo tamaño molecular presentes en varios individuos son homólogas, y la segunda se relaciona con la información incompleta que arrojan dichos marcadores dada la naturaleza dominante, ya que los heterócigos no pueden ser distinguidos.

1.3. El género *Agave*

Agave, el género más grande de la familia Agavaceae, es endémico al continente americano. Su distribución se extiende desde el sur de los Estados Unidos hasta Colombia y Venezuela. Se propone que éste género tiene alrededor de 166 especies (García-Mendoza y Galván, 1995) de las cuales 125 se encuentran en México. García-Mendoza (2002) concluye que este género tiene 200 especies aproximadamente más 47 categorías infraespecíficas, dando un total de 247 taxa. De este total, 150 especies o el 75% se encuentran en México convirtiéndolo en el país con mayor diversidad de agaves. Este género presenta una taxonomía muy compleja, la cual ha sido objeto de varios estudios

como los de Trelease (1920) quien describe 170 especies mientras que Berger en 1921 reconoce 256 especies. Más recientemente, Gentry (1982) reconoció 136 especies.

Éste género se divide en dos subgéneros: *Littaea* y *Agave* los cuales se diferencian esencialmente a nivel de la inflorescencia (Gentry, 1982): *Littaea*, que comprende 8 grupos, presenta una inflorescencia de apariencia espigada y flores en pares, mientras que en *Agave*, con 12 grupos, las inflorescencias son paniculadas y las flores se encuentran en grandes agregados umbelados sobre pedúnculos laterales. *Littaea* tiene una distribución más restringida ya que no se encuentra en Baja California ni en Yucatán y se distribuye desde Utah, Nevada y Arizona en los Estados Unidos hasta Guatemala. El subgénero *Agave* se encuentra desde California a Texas y sur de Florida, hasta Perú, Colombia y Venezuela, incluyendo las Antillas y Centroamérica (Eguiarte et al., 2000).

Los agaves son plantas xerófilas suculentas, generalmente acaules, (aunque existen especies que presentan tallos rastreros como *A. stricta*, *A. striata* y *A. petrophila*) con excepción de *A. karwinski*, *A. decipiens*, *A. attenuata*, de formas arborescentes (Gentry, 1982). Presentan una ruta fotosintética de tipo CAM y una baja tasa de crecimiento. Las hojas o pencas tienen forma laceolada con una espina terminal, generalmente son gruesas y suculentas conteniendo parénquima esponjoso lo que permite el almacenamiento de agua y una cubierta cerosa que impide la pérdida de la misma. Los bordes casi siempre están cubiertos por dientes. Las hojas, una vez desenrolladas comienzan a desdoblarse hacia afuera en un arreglo espiral para formar la roseta, la cual es característica de los agaves. Esta disposición de las hojas se ha visto como un mecanismo de defensa contra herbívoros, así como también una forma de captar el agua más eficientemente (Gentry, 1982). Generalmente, las hojas de algunas especies como *A. deserti* viven 5 años durante los cuales son metabólicamente activas (Nobel, 1988) y su color va desde verde lustroso brillante a azul grisáceo opaco (Irish e Irish, 2000).

En todos los agaves el sistema vascular se elonga a través de las hojas creando fibras que corren a lo largo de toda la penca. En algunas especies como *A. sisalana* y *A. fourcroydes*, ésta característica se encuentra muy marcada, haciendo de la fibra un producto de uso económico importante. Estas hojas fibrosas hacen clara la distinción entre los agaves y los aloes parecidos superficialmente. Las hojas de *Aloe* son gelatinosas al interior, nunca con fibras (Irish e Irish, 2000).

Las combinaciones de las características de las hojas pueden ayudar a diferenciar una especie de otra, especialmente cuando no hay disponibilidad de flores. Sin embargo, no hay que olvidar que hojas de una especie cuya distribución es extensa, frecuentemente presentan una variación enorme (Irish e Irish, 2000).

Los agaves son semélparos, viven un solo episodio reproductivo y luego mueren. Desarrollan una inflorescencia terminal después de varios años de crecimiento cuyo tamaño oscila desde unos cuantos decímetros a varios metros de altura según la especie (Gentry, 1982). Esta inflorescencia es polinizada por murciélagos, esfíngidos o abejas.

Se ha sugerido que varias especies de agaves no presentan reproducción sexual, sólo propagación vegetativa la cual puede darse como ramets producidos sobre los rizomas, o por bulbilos, sobre la inflorescencia (Nobel, 1988; Arizaga y Ezcurra, 1995). Lo anterior es posible ya que algunas especies principalmente del subgénero *Agave* del norte de México y sur de los Estados Unidos son poliploides (formando series de $2n$, $3n$, $4n$, $5n$ y $6n$ con un número básico de 30 cromosomas, 5 grandes y 25 pequeños) (Pinkava y Baker, 1985; Eguiarte, et al. 2000), y en especial autopoliploides, característica que promueve las duplicaciones somáticas (Backman, 1944).

Por otro lado, en 1980 Ehrendorfer demostró que los diploides son más comunes en hábitats estables o en los climax de las comunidades mientras que los poliploides recientes abundan en biotas sucesionales. Se sabe además, que la poliploidía y la hibridización promueven la apomixis en los poliploides sexuales dado que existe una gran probabilidad de que éstos tengan combinaciones de genes que favorezcan un cambio en los ciclos reproductivos. A su vez, la apomixis preserva combinaciones de genes altamente adaptativas así como también la heterocogosis presente (Pinkava y Baker, 1985).

Existe una correlación entre la morfología y la poliploidía en *Agave*. En general, el desarrollo vegetativo de los poliploides es mayor que el de los diploides. Por ejemplo, En *A. americana* los diploides tienen hojas flácidas delgadas en cambio, los tetraploides y hexaploides presentan hojas más gruesas y suculentas. El grupo *Rigidae*, la espina terminal de los diploides es pequeña y débil en comparación a la de los tetraploides la cual es larga y pesada. Debido a sus grandes tamaños y desarrollo, los poliploides son los más útiles y vistosos (Backman, 1944).

Las especies de *Agave* en México se encuentran desde altitudes a nivel del mar hasta los 3400 m, aunque más comunmente entre los 1000 y 2000 msnm. Los ambientes en donde habitan la mayoría de las especies de agaves son los bosques tropicales deciduos, los bosques de espinos, los desiertos, el chaparral, el matorral rosetófilo en donde los agaves y otros géneros formadores de rosetas como *Dasyilirion* y *Yucca* dominan. Asimismo, podemos encontrar 44 especies (30%) del total que hay en México en bosque templado de pino-encino. Aunque en menor proporción, algunas especies se encuentran en bosques tropicales siempre verdes, en bosques tropicales subdeciduos y en bosque de niebla (García-Mendoza, 2002). Los tipos de suelo en donde crecen los agaves van desde los formados por rocas ácidas ígneas, hasta los básicamente calcáreos de origen marino (García-Mendoza, 2002).

En México, la región más rica en el número de especies endémicas es el Valle de Tehuacán-Cuicatlán en el área centro-sur del país, con 15 especies de las cuales 8 de ellas son endémicas. Esta riqueza en especies endémicas del género *Agave* en México se debe principalmente a los hábitats tan heterogéneos que presenta el país los cuales difieren en clima, geología, suelos, topografía, altitud, etc., así como a las propiedades intrínsecas de cada taxón tales como la plasticidad genética, la tolerancia ecológica, la capacidad de dispersión, la germinación de sus semillas y las interacciones bióticas con otros organismos incluidos los polinizadores (García-Mendoza, 2002).

Por otra parte, la relación de los humanos con los agaves se ha documentado desde tiempos precolombinos. Los usos que se les han dado son diversos: extracción de fibras para el mercado textil, artículos de jarcia y cordelería, elaboración de diferentes bebidas alcohólicas (pulque, mezcal, tequila, bacanora, entre otros.), en la elaboración de cercas naturales, como alimento (los botones de las inflorescencias) y también por las propiedades medicinales que algunas especies presentan.

Especie de estudio

El *A. garciae-mendozae* fue descrito recientemente, Tabla 1 (Galván y Hernández, 2002). Pertenece al subgénero *Littaea*, grupo Marginatae. Este grupo incluye 21 especies y un total de 27 taxa distribuidos desde Nuevo México hasta Guatemala (Gentry, 1982). El grupo se caracteriza por presentar hojas rígidas con márgenes duros y dientes largos o

pequeños. La inflorescencia es espigada, las flores pequeñas se encuentran en grupos de dos o tres, el tubo es corto, los tépalos son más largos que el tubo, los filamentos se insertan en el segmento basal y las cápsulas son oblongas (Gentry, 1982; Galván y Hernández, 2002).

A. garciae-mendozae muestra afinidades con *A. horrida* Lem. y *A. kerchovei* Lem., sin embargo, hay ciertas características que los distinguen, como son la disposición, el color y tamaño de las hojas, el tamaño del ovario, entre otros (Tabla 1).

Ésta especie se distribuye en los estados de Hidalgo, Querétaro y San Luis Potosí y crece sobre los suelos calcáreos de pendientes rocosas, frecuentemente en el fondo de cañones donde abunda el matorral xerófito, así como también en una zonas de bosque de pino-encino a altitudes desde 1800 a 2350 msnm. Su época de floración va desde junio a agosto y la maduración de los frutos se da a finales de septiembre y principios de octubre (Galván y Hernández, 2002).

Tabla 1. Caracteres morfológicos de *Agave garciae-mendozae* (Galván y Hernández, 2002).

Caracter	<i>A. garciae-mendozae</i>
Rosetas	Abiertas, con 30-80 hojas
Hojas	
• Forma	Lanceolada
• Tamaño (largo x ancho)	48-78 cm x 7-13 cm
• Color	Verde oscuro o verde glauco
• Flexibilidad	Flexible en la parte superior
• Espina terminal	Surcada
Long. del ovario	10 - 12 mm
Long. del tubo	1.5 - 2.5 mm

1.4. Biología de la polinización

Algunos conceptos

La biología de la polinización ha sido utilizada para apoyar el papel de la selección natural como motor evolutivo, tal como lo revelan los trabajos pioneros que hiciera Darwin en su momento (1862, 1877, 1878). Su principal aportación consistió en ver a la historia natural de la polinización con los ojos de la teoría evolutiva. Desde el punto de vista darwiniano, la biología de la polinización se ha caracterizado por la búsqueda del valor adaptativo de los rasgos florales con relación a los agentes polinizadores (Herrera, 1996), lo cual implica que los sistemas de polinización son lábiles y pueden evolucionar muy rápido en respuesta a presiones selectivas producidas por los polinizadores (Ollerton, 1996).

La mayoría de los estudios sobre la ecología evolutiva de las interacciones entre plantas y polinizadores se han gestado al amparo del denominado “principio del polinizador más efectivo” (Herrera, 1996; Armbruster et al. 2000; Johnson y Steiner, 2000). Este principio, formulado originalmente en 1970 por Stebbins propone que una planta se especializa en el polinizador más efectivo y/o abundante cuando la disponibilidad de éste es segura, es decir, postula que la selección natural favorecerá aquellos rasgos morfológicos, fisiológicos o ecológicos de las plantas que sirvan para atraer a aquellos visitantes florales que polinizan más eficientemente. Por el contrario, la generalización se ve favorecida cuando la disponibilidad del polinizador más efectivo es impredecible año con año (Johnson y Steiner, 2000; Gómez, 2002).

Algunas ideas que estructuran el estudio de las relaciones entre las plantas y sus polinizadores son que la coevolución requiere de especialización (Thompson, 1994), que los sistemas de polinización evolucionan rápidamente en respuesta a presiones selectivas producidas por los polinizadores (Ollerton, 1996), y que existe una tendencia histórica hacia la especialización, de tal forma que las plantas más “avanzadas” son más especializadas que las plantas más “primitivas” (Ollerton, 1996). A éste respecto, existen otros factores propios de las plantas que influyen en la evolución de la especialización floral tales como su historia de vida, el status sucesional en el que se encuentran, la abundancia y el sistema de entrecruzamiento (Bond, 1994 ; Feinsinger, 1983).

Por otra parte, la fluctuación temporal en la abundancia y composición del conjunto de visitantes florales es una de las causas más aceptada de la existencia de sistemas de polinización generalizados (Gómez, 2000). Esta fluctuación provoca la aparición de una incongruencia en las presiones selectivas soportadas por cierta planta, y una dilución del proceso selectivo global ejercido por los polinizadores, lo que reduce la probabilidad de especialización al polinizador más efectivo (Herrera, 1988, 1996; Waser et al., 1996).

Es así como la variación temporal del gremio de polinizadores de una planta de vida larga (como los agaves) provocará que la adecuación relativa de un individuo determinado cambie entre años. De forma similar, en especies anuales lo que cambiará entre años será el número de individuos reclutados dependiendo de los caracteres morfológicos de los padres. En ambos casos, las consecuencias son las mismas, un determinado carácter fenotípico se beneficia unos años y otros no, dependiendo de su efecto sobre los polinizadores (Gómez, 2000).

En general, los caracteres florales son tradicionalmente considerados como atributos adaptativos que han ido evolucionando como resultado de las presiones selectivas por parte de los polinizadores. De esta idea, nació el concepto de “síndromes de polinización” el cual se define como el conjunto de rasgos florales que representan adaptaciones a tipos particulares de polinizadores (Faegri y van der Pijl, 1979). En particular, la morfología y color floral, así como la composición del néctar son interpretados como adaptaciones que hacen más eficiente la visita de los polinizadores, reflejándose en una mayor fecundidad. Estos síndromes conforman un patrón de forma, color, calidad del néctar y antesis correspondientes a determinado tipo de polinizador, siendo convergentes entre especies que incluso pertenecen a diferentes familias (Faegri y van der Pijl, 1979; Baker y Baker, 1983; Proctor y Yeo, 1973).

Por ejemplo, el síndrome de polinización por colibríes generalmente implica flores rojas y tubulares con néctar medianamente diluido, en cambio, el de las abejas está generalmente asociado a flores más pequeñas y abiertas de colores amarillo o azul con néctar concentrado y rico en sacarosa. Las flores polinizadas por esfingidos tienden a ser blancas o glaucas, de forma tubular y antesis nocturna; por su parte, las de los murciélagos tienden a ser similares a las de los esfingidos, pero más grandes y abiertas y en general más gruesas, resistentes, con néctar muy diluido y rico en hexosas (Silva, 2001).

Aunque el concepto de síndromes de polinización resulta intuitivo, algunos autores (Herrera, 1996; Waser et al., 1996; Silva-Montellano y Eguiarte, 2003a) han cuestionado su validez como adaptaciones, ya que está basado en comparaciones interespecíficas, que sólo sugieren patrones cualitativos generales. Tomando en cuenta el concepto de adaptación propuesto por Gould y Vrba (1982), las adaptaciones florales verdaderas conllevan características que promueven la adecuación las cuales fueron construidas por la selección ejercida por los polinizadores actuales. En contraste, las exaptaciones florales son caracteres que, aunque contribuyen a la adecuación, no evolucionaron como consecuencia de la selección por los polinizadores. Estas exaptaciones evolucionaron por interacciones con polinizadores del pasado y los caracteres se mantienen sin modificación, ya sea porque resultan más o menos adecuados para los visitantes presentes o debido a restricciones filogenéticas (Herrera, 1996; Gould y Vbra, 1982).

Sistemas de polinización en agaves

Schaffer y Shaffer (1979) sugirieron que los polinizadores son el factor más importante en la evolución de la biología reproductiva e historia de vida de los agaves, dada su monocarpía. Por otro lado, se ha propuesto una alta dependencia hacia los polinizadores en algunas especies del género (Howell y Roth, 1981; Eguiarte, et al., 2000).

Casi siempre se asume que las especies pertenecientes al subgénero *Agave* (con inflorescencias paniculadas), son polinizadas por murciélagos principalmente de los géneros *Leptonycteris* (Howell, 1972; Gentry, 1982; Arizaga y Ezcurra, 1995), mientras que las especies pertenecientes al subgénero *Littaea* (inflorescencias espigadas o racemosas) son polinizadas predominantemente por insectos. En particular, Arizaga et al. (2000a, b) demostraron que murciélagos de los géneros *Leptonycteris* y *Choeronycteris* polinizaban a *A. macroacantha* (subgénero *Agave*). No obstante, un gran número de especies de insectos y aves también visitan a las flores de *Agave* (Schaffer y Schaffer, 1977; Kuban et al., 1983; Martínez del Río y Eguiarte, 1987; Kuban, 1989; Eguiarte et al., 2000; Slauson, 2000).

Schaffer y Schaffer (1977) encontraron que varias especies del subgénero *Littaea* (*A. schotti*, *A. parviflora* y *A. toumeyana*) en Arizona, presentan características florales y de néctar que sugieren una co-adaptación a ser polinizadas por abejas, de hecho, son

polinizados principalmente por abejas grandes pertenecientes al género *Bombus* y *Xylocopa*. Recientemente, Silva-Montellano y Eguiarte (2003a) encontraron que los principales polinizadores de *A. lechuguilla* (*Littaea*) parecen ser los esfingidos nocturnos (*Hyles lineata*) en la parte sur de su distribución y abejas grandes y diurnas (*Bombus pennsylvanicus* y *Xylocopa californica*) en la parte de norte.

Entre las características que sugieren quiropterofilia (polinización por murciélagos) se encuentran: flores largas, abiertas, desde tubulares profundas hasta en forma de tazón, verticales, con tépalos gruesos los cuales parecieran estar bien “diseñados” para producir y almacenar néctar (Gentry, 1982). Las flores se encuentran a cierta distancia del follaje en grupos expuestos como umbelas conformando inflorescencias de forma candelabroiforme o paniculada, arreglo que facilita el acceso a los murciélagos. La producción del néctar es nocturna y se da en grandes volúmenes y concentraciones frecuentemente bajas (10 a 20%), por lo que los murciélagos deben consumir grandes cantidades del néctar diluido para cubrir sus requerimientos energéticos (Howell, 1972). El contenido de proteínas del polen es mayor (>40%) que el de las flores polinizadas por insectos, lo cual es aparentemente importante para mantener el balance del nitrógeno de los murciélagos (Howell, 1972). El color de las flores generalmente es opaco y amarillento pálido, con tépalos de desde blanquecinos hasta morado o rojizos. El olor es muy característico, parecido al que desprende la fruta madura o en fermentación (Slauson, 2001).

Los rasgos florales asociados a la polinización por insectos incluyen tubos florales pequeños y flores acomodadas lateralmente en inflorescencias espigadas o racemosas. La producción de néctar es diurna (a partir del amanecer hasta medio día) y menos abundante; la concentración de los azúcares es alta (37 a 62%) con relación a las especies quiropterófilas. La producción de polen también es menos abundante así como la concentración de proteínas (< 10%) (Howell, 1972). El color de las flores es más atractivo para los insectos, variando desde el amarillo hasta el amarillo naranja brillante; la fragancia generalmente es dulce (Slauson, 2001; Faegri y van der Pijl, 1979).

Se piensa que en ambientes tropicales los murciélagos nectanívoros tienen una influencia importante en la evolución de los agaves llegando al punto de hablar de una coevolución agave-murciélago, como sugieren estudios realizados en miembros del subgénero *Agave* los cuales poseen caracteres florales asociados a una polinización por

murciélagos (Howell, 1974, 1979; Schaffer y Schaffer, 1977; Howell y Roth, 1981; Fleming et al., 1993). La distribución geográfica de estas especies coincide con la de los murciélagos nectanívoros migratorios. Los primeros ofrecen un “corredor de néctar” predecible espacio-temporalmente y además promueven una especialización estacional en la dieta de los murciélagos glosófagíneos migratorios que en primavera se dirigen hacia el norte y en otoño regresan hacia el sur. Por su parte, los murciélagos aseguran el éxito reproductivo de los agaves cuya inflorescencia visitan para obtener alimento (Gentry, 1982; Fleming et al., 1993).

Waser et al. (1996) sugirieron que plantas con pocos episodios reproductivos, que experimentan una variación espacial y temporal de sus polinizadores probablemente no están especializadas a ciertos polinizadores. A este respecto, Slauson (2000) sugirió que los caracteres florales de los agaves que se encuentran en los límites tanto de su distribución como en la de sus polinizadores, pueden estar sujetos a una selección más intensa gracias a la variación tanto climática como a la de sus polinizadores.

Con relación a los agaves del subgénero *Littaea*, pocos estudios han descrito completamente a sus visitantes, así como la contribución a su éxito reproductivo (Schaffer y Schaffer, 1977; Slauson, 2001; Silva-Montellano y Eguiarte, 2003). Esta tendencia de las especies espigadas a ser polinizadas principalmente por insectos diurnos puede representar un error de muestreo y/o adaptaciones florales que resultaron gracias a las visitas poco constantes por parte de los murciélagos debido a que la distribución de algunas especies de agaves espigados va más allá que la de los propios murciélagos como en el caso de los agaves paniculados del norte (Slauson 2001).

En todo el género la dehiscencia de las anteras se da en la noche, característica que junto con la producción nocturna del néctar pudieran ser la condición primitiva en las primeras especies *Littaea* que evolucionaban en el Centro de México (Eguiarte et al., 2000). Asimismo, el tamaño pequeño de las flores de los agaves *Littaea* permite también a los insectos nocturnos realizar una polinización substancial, como sucede en algunas especies paniculadas (*A. chrysantha*, *A. palmeri* y *A. macroacantha*). Así como sucede en el subgénero *Agave* paniculados, las características florales que promueven la polinización nocturna en *Littaea*, ya sea que se hayan originado o no en respuesta a una polinización por

murciélagos, parecieran ser lo suficientemente generales lo que permite múltiples polinizadores (Slauson, 2001).

1.5. Polinizadores y estructura genética

Las angiospermas es el grupo de plantas más diverso que existe y ésta diversificación ha sido explicada principalmente como el resultado de las interacciones con sus polinizadores, por lo que se piensa que aquellas familias polinizadas y dispersadas por animales tienen tasas de especiación altas, en comparación de otros taxa polinizados y dispersados por factores abióticos (Silva, 2001). Por otro lado, los polinizadores juegan un papel muy importante en procesos evolutivos como la especiación, ya que las diferencias en la composición específica y abundancia de la fauna polinizadora podrían determinar la cantidad de flujo génico al interior y entre las poblaciones de plantas.

La estructura genética y la biología de la polinización de las poblaciones naturales se encuentran fuertemente relacionadas. La estructura genética determina la evolución de los rasgos reproductivos, lo cual depende a su vez de la disponibilidad de variación genética útil y de que haya tamaños poblacionales efectivos grandes. Por otro lado, los polinizadores determinan los niveles de polinización cruzada y autopolinización afectando los niveles de endogamia al interior de las poblaciones naturales. Además, también determinan la distancia a la que se mueve el polen afectando los niveles de flujo génico entre las poblaciones (Hamrick y Godt, 1989; Silva, 2001).

Los polinizadores, al ser los responsables en parte del flujo génico, pueden llegar a determinar la dirección a la que evolucionan los sistemas de cruce de las plantas. A este respecto la depresión por endogamia es una fuerza selectiva sobre los sistemas de cruce, ya que actúa modulando el entrecruzamiento en poblaciones naturales al expresarse genes deletéreos recesivos y reduciendo la adecuación de los individuos endógamos con relación a los exógamos, o bien purgándose dichos genes de la población y evolucionando hacia sistemas de cruzamiento endógamos (Schemske y Lande, 1985; Charlesworth y Charlesworth, 1987). Es por esto que el sistema de cruce de una planta puede interpretarse como una solución adaptativa a las restricciones y variaciones en el tipo y cantidad de polinizadores efectivos, el cual se mide a través de la tasa de entrecruzamiento que expresa la variación o bien la característica terminal de la evolución de un determinado sistema de

cruza, el cual a su vez está relacionado con la expresión de los atributos florales dada la especificidad de los polinizadores en el curso de la evolución de la interacción planta-polinizador (Silva, 2001).

2. OBJETIVO

El propósito de este trabajo es describir la biología reproductiva y la genética de poblaciones de *Agave garciae-mendozae* con el fin de entender cómo interactúan los atributos florales que presenta con las fuerzas evolutivas que moldean a su estructura genética.

2.1. Objetivos particulares

- Analizar las siguientes características de la biología reproductiva de *A. garciae-mendozae*: *i*) el cambio de los caracteres florales en el tiempo, *ii*) la concentración y *iii*) volumen del néctar producido, *iv*) el sistema de polinización predominante.
- Identificar los principales visitantes que llegan a las inflorescencias y al grupo de polinizadores que más aporta al éxito reproductivo de la especie.
- Obtener los patrones de variación genética utilizando el marcador molecular ISSR.
- Encontrar los niveles de variación genética utilizando los estimadores de *Hs* y %P.
- Describir la estructura genética poblacional de *A. garciae-mendozae*, la estructuración jerárquica de la variación, así como las distancias genéticas.
- Estimar los niveles de flujo génico presentes en la especie.

2.2. Predicciones

1.- Si *A. garciae-mendozae* presenta atributos florales característicos de un síndrome de polinización por murciélagos y dado que ésta especie se encuentra dentro del rango de distribución de los murciélagos nectarívoros mexicanos, se esperaría que éstos fueran los polinizadores principales.

2.- Debido a que se ha reportado previamente la protrandría en otras especies de agaves, se espera que el sistema de fertilización predominante en la especie en estudio sea la polinización cruzada.

3.- Tanto el sistema de polinización como las características de *A. garciae-mendozae* de ser monocotiledónea, longeva y perene, explicarían niveles de variación genética mayores y

niveles de diferenciación genética menores a los encontrados en especies anuales, que se autopolinizan, o que presentan un ciclo de vida corto.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. Biología reproductiva

El trabajo de campo se llevó a cabo en la población de Santa Mónica Autempa, Mpo. de Atotonilco, Hidalgo que forma parte de la Reserva de la Biósfera Barranca de Metztitlán (Figura 2). Este trabajo se realizó durante dos años consecutivos (2002 y 2003) en la época de floración de la especie (julio-agosto) (meses en los cuales se cuenta con el horario de verano por lo que se debe considerar una hora menos a las horas señaladas para cada actividad si se quiere establecer una comparación con los datos de la biología reproductiva de otras especies de agaves cuya floración se da en invierno).

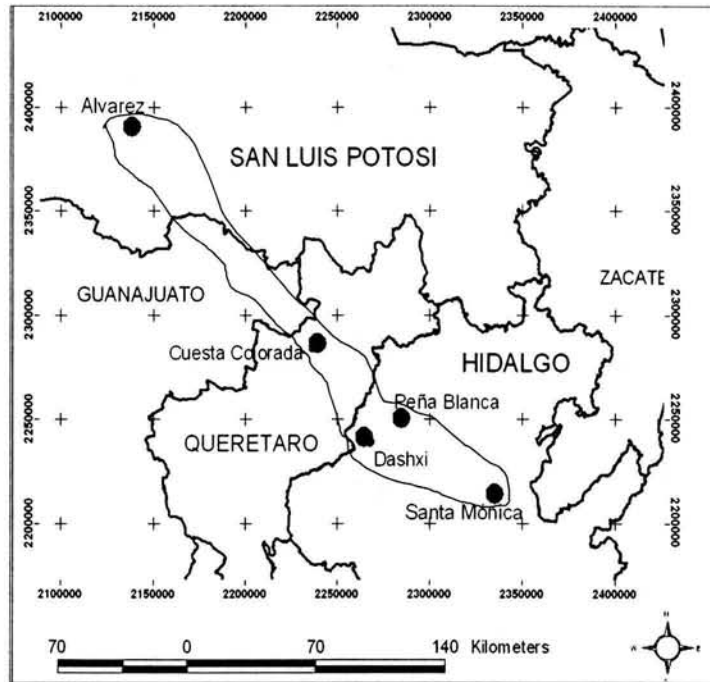


Figura 2. Distribución geográfica de las poblaciones conocidas de *Agave garciae-mendozae* elaborado con el programa ARCVIEW 3.2 a partir de las coordenadas geográficas.

Cambios temporales en los rasgos florales.

Para analizar el cambio morfológico de las flores en el tiempo (i.e., cómo pasan de ser pre-dehiscentes a estaminadas y luego a pistiladas) se marcaron dos flores por estadio en una sola inflorescencia. Los estadios se determinaron según el grado de maduración en

el que se encontraban las flores, desde que eran botones hasta que eran frutos (Tabla 2). Utilizando un vernier se midieron durante 3 días por las mañanas (8:00 hrs.) en cada flor de cada estadio (14 flores en total) los siguientes caracteres florales: el largo del pistilo, de los estambres, de las anteras y la apertura del perianto. La altura del pistilo fue medida como la distancia que hay desde la base de la flor hasta el estigma; las medidas de los estambres se tomaron desde el punto en el cual se inserta el filamento al perianto hasta donde comienza la antera; la apertura del perianto fue medida como el diámetro que forma la parte superior de los tépalos (Figura 3).

Tabla 2. Características de cada uno de los estadios de las flores.

Estadio	Características
1	Botones totalmente cerrados
2	Los tépalos comienzan a abrirse un poco y comienzan a emerger las anteras.
3	Perianto mucho más abierto, los estambres están totalmente exertos, las anteras jóvenes; pistilo muy pequeño.
4	Abertura máxima del perianto, pistilo más grande, anteras dehiscentes.
5	El perianto comienza a marchitarse, los estambres siguen exertos pero las anteras están secas; pistilo receptivo.
6	Perianto completamente seco; estambres marchitos y sin anteras; el pistilo comienza a secarse.
7	Perianto bien cerrado, pistilo totalmente marchito, el ovario comienza a aumentar su volumen; inicia la formación del fruto si la flor fue fertilizada.

Producción de néctar

Para conocer el patrón de producción de néctar, durante 2 años (2002 y 2003) en la época de floración de *A. garciae-mendozae* se realizó una curva de néctar para analizar el volumen y la concentración del néctar que produce. Para esto se marcaron y embolsaron 15 flores de 3 inflorescencias (5 flores por planta) que se encontraban en el estadio 3 (Tabla 5)

para el año 2002 y 25 flores de 5 inflorescencias (5 flores por planta) para el año 2003. Las flores se embolsaron al atardecer, antes de que llegaran los visitantes nocturnos (18:00 hrs.). Se utilizaron capuchones hechos de tul para evitar la remoción de néctar por parte de los diferentes visitantes que llegaron a lo largo de toda la noche.

Las medidas se tomaron cada dos horas empezando a las 21:00 hrs. hasta las 9:00 hrs. (año 2002) y hasta las 7:00 hrs. (año 2003) del día siguiente. También se embolsaron 5 flores por inflorescencia (3 plantas, 15 flores totales) en el año 2002 y 4 flores de 4 inflorescencias (1 por planta) para el año 2003, con el fin de saber cuál es el volumen y la concentración del néctar acumulado durante toda la noche sin remoción alguna. Para medir el volumen de néctar se utilizó una punta de micropipeta para cargar geles de secuenciación graduada cada 10 μ l, ajustada a una jeringa de insulina. La concentración de azúcares se midió como el porcentaje de equivalentes de sacarosa utilizando un refractómetro.

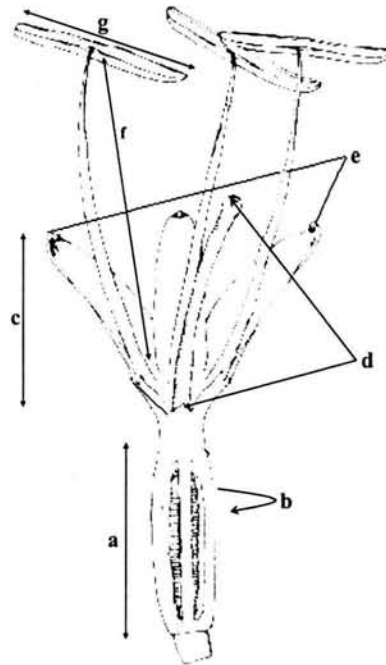


Figura 3. Caracteres florales morfométricos medidos (en milímetros) para *Agave garciae-mendozae* (modificado de Silva-Montellano y Eguiarte, 2003) : **a**) y **b**) largo y ancho del ovario respectivamente ; **c**) largo del perianto ; **e**) abertura del perianto ; **d**) largo del estilo ; **f**) largo de los estambres ; **g**) largo del filamento de las anteras.

Observación de visitas florales

Para determinar los patrones y la frecuencia de las visitas florales y posibles polinizadores, se hizo por dos años (2002 y 2003) la observación de las visitas florales en el campo. En el año 2002 se observaron durante 7 días (4-10 de julio) 19 individuos diferentes y en el 2003, 10 individuos por 6 días (27 julio-1 agosto). Para los dos años se anotó el número de visitas en intervalos de 15 minutos a partir de las 6:00 hrs. hasta las 9:30 hrs. y de las 18:30 hrs. hasta las 1:00 hrs. Para los dos años se realizó una observación nocturna de 12 hrs. solamente durante un 1 día con el fin de saber si llegaban visitas entre la 1:00 hrs. y las 6:30 hrs.

Las observaciones se llevaron a cabo en silencio y a pocos metros alejados del individuo focal con el fin de no alterar la actividad ni el comportamiento de las visitas. Para observar las visitas nocturnas, se buscó la posición en la cual la iluminación natural y el contraste contra el cielo oscuro permitieran tener la visibilidad necesaria y así poder detectarlas. Es importante hacer notar que no todas las inflorescencias fueron observadas todos los días, sino que unos días se observaban unas y otros días otras.

Asimismo se colocaron redes para capturar algunos murciélagos que llegaban a visitar a las inflorescencias con el fin de identificar a las especies utilizando la guía de campo de identificación de murciélagos de Medellín et al. (1997).

Con el fin de evitar el sesgo de que a determinadas inflorescencias llegaran más visitas debido al número de flores activas, o sea aquellas que se encontraban en la fase estaminada y pistilada (ver Tabla 2), se procedió a contar el número de frutos y cicatrices existentes en 30 cm. de 10 inflorescencias, para así estimar el número de flores que potencialmente existen y se midió la longitud de flores activas por inflorescencia. Esta aproximación fue necesaria debido a que eran demasiadas flores y era muy difícil contar el número de flores activas directamente.

Experimentos de polinización

Para estudiar el sistema de cruce que presenta *A. garciae-mendozae*, se realizaron experimentos de polinización controlada. También se hicieron experimentos de exclusión de polinizadores para conocer qué tanto aporta a la fecundidad de la especie el gremio de polinizadores diurnos y el de nocturnos. Los experimentos de polinización controlada se

realizaron en el campo del 11 al 13 de julio del 2002 y los de exclusión de polinizadores del 30 de julio al 3 de agosto del 2003 (a mediados de la temporada de floración de la especie).

Experimentos de polinización controlada.

Se escogieron 6 individuos que se encontraran a mitad de la floración, alejados uno de otro 1500 m aproximadamente. En cada inflorescencia se escogieron 5 flores en estado pre-dehiscente (en donde el pistilo estuviese pequeño e inmaduro para así evitar que ya hubiese tenido contacto con polen previamente) por tratamiento (15 flores por inflorescencia, 30 flores totales por tratamiento). A cada flor se le cubrió el pistilo incipiente con una punta para micropipeta de 1000 μ l. A cada punta se le hicieron unas pequeñas perforaciones de menos de 0.5 mm. con el fin de que el pistilo estuviese ventilado y no se secase, también esos orificios se cubrieron con microporo para evitar que entrara polen de flores aledañas como algún animal polinizador. La parte superior de la punta fue tapada con bolitas de algodón firmemente insertadas. Esta actividad de cubrir los pistilos se hizo durante el día.

Los tratamientos que se aplicaron fueron:

- 1) Heterocruza: consiste en aplicar manualmente al estigma receptivo el polen proveniente de una mezcla de polen de varias inflorescencias alejadas de las focales 2000 m.
- 2) Autocruza: Se aplica manualmente al estigma receptivo polen de otras flores de la misma inflorescencia.
- 3) Sin polinizar: Aquí los pistilos permanecen cubiertos con las puntas durante todo el tiempo hasta que el pistilo se marchita.
- 4) Control: frutos escogidos al azar de cada una de las inflorescencias.

Estos experimentos se llevaron a cabo durante la noche (23:00 a 1:00 hrs.), en cuanto hubiera polen disponible, tanto como para hacer la mezcla de polen para las heterocruzas como para hacer las autocruzas. En el primer día de experimentación se cubrieron los pistilos, al siguiente, se comenzó a polinizar, si es que el estigma estaba aparentemente receptivo (abierto y húmedo). La polinización se hizo durante dos días consecutivos, hasta que los pistilos comenzaban a marchitarse. Terminados los

experimentos, se retiraron las puntas de todas las flores y se dejaron así hasta mediados de septiembre, que fue cuando se recogieron los frutos.

Exclusión de polinizadores

Se escogieron 5 individuos diferentes, procurando que se encontraran a principios o mediados de la floración. De cada inflorescencia se escogieron 5 flores en estado predehiscente para analizar el efecto de los polinizadores diurnos y 5 para ver el de los nocturnos. Los pistilos inmaduros fueron cubiertos con dispositivos plásticos que impedían la entrada de polen. Ésta actividad se realizó durante el día.

Los tratamientos aplicados fueron:

- 1) Polinización diurna: a estas flores se les quitaba la cubierta del estigma al amanecer (5:30 hrs.), antes de que comenzaran a llegar las visitas diurnas y se dejaban descubiertos todo el día hasta que comenzaba a atardecer, evitando así la visita de los polinizadores nocturnos.
- 2) Polinización nocturna: los estigmas de este grupo de flores eran descubiertos al anochecer (20:00 hrs.), se dejaban así toda la noche y se volvían a tapar antes de que amanecía.

Debido a que estos pistilos se cubrieron cuando comenzaban a emerger, pasaron dos días para que estuviesen los suficientemente maduros con estigmas receptivos. Al tercer día comenzó a cubrirse y descubrirse hasta que los pistilos estaban marchitos. Después, a cada flor se le quitó su cilindro y se dejaron libres hasta el día 4 de octubre, cuando se recogieron los frutos. En este caso, como en el de los experimentos de polinización, los frutos no estaban totalmente maduros, para que maduraran se metieron en una incubadora a 70° C durante 5 días. Esto no altera al desarrollo de las semillas, solamente concluye la maduración del fruto, ya que si se esperaba a que estuviesen bien maduros para ir a colectarlos, se corría el riesgo de que se abrieran y por viento o por la visita de alguna ave perchera las semillas fueran liberadas.

Tanto en los experimentos de polinización controlada como en los de exclusión de polinizadores se contaron las semillas de los frutos de cada tratamiento y se distinguieron a las negras como las viables y a las blancas como no viables. Con este conteo se calculó el “fruit-set” como el número de frutos logrados entre el número de flores utilizadas por

tratamiento y el “seed-set”, como el número de semillas viables entre el total de las semillas por fruto.

Análisis de los datos

Para comparar los valores obtenidos de volumen y concentración de néctar en los dos años de estudio se hizo una *t* de Student para muestras independientes.

En el caso de los experimentos de polinización y en la exclusión de polinizadores, los análisis se hicieron a nivel poblacional, no se evaluó el efecto de cada tratamiento por individuo sino en todos los individuos estudiados de la población.

Para analizar si existen diferencias significativas en el efecto de cada uno de los tratamientos sobre el éxito reproductivo de la especie, se realizaron análisis de varianza y la Prueba de Tukey-Kramer *HSD* para determinar si existen diferencias significativas entre los diferentes tratamientos aplicados, esto se hizo utilizando el programa JMP, versión 3.1 (Instituto SAS, 1997).

3.2. Genética de poblaciones

Colecta de campo

De las 5 poblaciones colectadas, 4 fueron reportadas por Galván y Hernández (2002) y una es nueva (para la ciencia) (Tabla 3 y Figura 2). Se colectaron de 50 a 60 individuos por localidad procurando que cada planta estuviese alejada al menos un metro y medio para evitar en principio que fuesen del mismo genet. De cada roseta se cortó una penca de las más jóvenes para que la extracción de ADN fuera más fácil y de mejor calidad (i.e., mayor cantidad, limpio y no degradado). En el laboratorio se recortó un pedazo de tejido de la parte central de la penca de aproximadamente 6 X 3 cm. Estos fragmentos se etiquetaron y se almacenaron a -80°C .

La colecta de todas las poblaciones se realizó en abril del 2003, a excepción de la de Cuesta Colorada, cuya colecta se hizo en agosto del mismo año.

Tabla 3. Nombre y ubicación de las diferentes poblaciones de *A. garciae-mendozae*. Las poblaciones de Santa Mónica, Peña Blanca, Álvarez y Dashxi fueron reportadas por Galván y Hernández (2002), la de Cuesta Colorada es un nuevo registro.

Población	Estado	Municipio	Coord. N	Coord. W	msnm
Santa Mónica	Hidalgo	Atotonilco	20°28'08.22"	98°45'00.5"	1998
Peña Blanca	Hidalgo	Zimapán	20°47'49.8"	99°14'43.8"	2337
Álvarez	San Luis Potosí	Álvarez	22°5' 18.6"	100°39'0.72"	2331
Dashxi	Hidalgo	Zimapán	20°41'37.8"	99°24'43.2"	1972
Cuesta Colorada	Querétaro	Pinal de Amoles	21°06'18"	99°42'24"	2107

Extracción de ADN

Para extraer el ADN de 45 individuos por población fue necesario optimizar el método modificado de Doyle y Doyle (1987). Este método de extracción consiste en solubilizar las membranas y digerir las proteínas utilizando detergentes catiónicos como el SDS (Dodecil sulfato de sodio) o CTAB (Bromuro de cetiltrimetil amonio). Después se eliminan las proteínas por medio de mezclas de cloroformo y algún alcohol aromático

como el fenol, octanol o alcohol isoamílico. Posteriormente, se precipita el ADN con etanol, aunque teóricamente puede utilizarse cualquier alcohol polar (Karp, et al., 1998). El protocolo de extracción utilizado finalmente se muestra en el Apéndice 1.

Cuantificación del ADN

Utilizando un biofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf) se cuantificó la concentración del ADN de cada muestra. Con la mitad del volumen total de ADN se hicieron diluciones a una concentración final de 15 ng/μl, posteriormente se hicieron alicuotas de 40 μl con las cuales se hicieron todas las pruebas de optimización de los ISSRs. La otra mitad del volumen de ADN concentrado se almacenó a -80°C con el fin de tener un respaldo.

Generación de los datos moleculares

Para obtener los polimorfismos utilizando los ISSR's se siguió el protocolo propuesto por Fang y Roose (1997). Se probaron 18 "primers" procedentes de la serie No. 9 elaborados por la Unidad de Servicios de Proteínas y Ácidos Nucléicos de la Universidad de Columbia Británica, Vancouver, B.C., Canadá. De éstos, se escogieron 3, los cuales brindaban la mejor resolución de las bandas. La secuencia de los "primers" utilizados en este estudio es:

841: GAG AGA GAG AGA GAG AYC

842: GAG AGA GAG AGA GAG AYG

846: CAC ACA CAC ACA CAC ART

R = A ó G, Y = C ó T.

Para una reacción de PCR de 25 μl se agregaron 2.5 μl de amortiguador para PCR 10X, 0.5 μl de DNTP's mix (mezcla de los 4 di-deoxinucleótidos a 10 mM Fermentas), 1.25 μl de "primer" cuya concentración inicial era de 10 mM (Invitrogen), 0.2 μl de Taq polimerasa a 5 u/μl, 2 μl de ADN a 15 ng/μl, el volumen del MgCl₂ (concentración inicial de 30 mM) depende de la concentración óptima para cada "primer" y para completar los 25 μl se agregó el volumen de agua ultrapura correspondiente según la optimización de cada primer (Tabla 4).

Como control positivo se preparó una mezcla de reacción a la cual no se le añadió el ADN templado. Si el primer no amplifica indica que los reactivos no estaban contaminados con ADN.

El PCR se hizo en un termociclador Perkin Elmer. El programa utilizado para amplificar cada primer se muestra en la Tabla 5. El paso 3, correspondiente a la alineación, varía tanto en la temperatura como en el tiempo de duración según el primer de que se trate (Tabla 4).

Los productos de PCR se corrieron en electroforesis. Ésta se realizó en geles de agarosa al 2.0%, los cuales se teñían con bromuro de etidio a una concentración de 1.0 mg/ml. Además de las muestras, se corría un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (Nucleic Acid Markers, 100 pb DNA Ladder, Invitrogen). Éste marcador sirve para determinar el peso aproximado de las bandas amplificadas.

Cada gel fue fotografiado utilizando una cámara Polaroid con fotos instantáneas en blanco y negro. Posteriormente se hizo la lectura visual de cada uno de cada uno de ellos con el fin de encontrar los polimorfismos. Con ésta lectura se hizo una matriz de presencia-ausencia de bandas (unos y ceros) para cada locus por individuo.

Tabla 4. Condiciones de amplificación para cada uno de los primers

Primer	Temperatura de alineación	Tiempo de alineación	[MgCl₂] (mM)	No. de ciclos
841	60 ° C	45"	2.1	30
842	60 ° C	35"	2.3	35
846	60 ° C	30"	2.1	35

Tabla 5. Programa de amplificación del PCR.

Paso	Temperatura ° C	Tiempo
1) Desnaturalización inicial	94	4 min
2) Desnaturalización	94	30 seg
3) Alineación	ver Tabla 3	ver Tabla 3
4) Polimerización	72	2 min
5) 30 o 35 ciclos (pasos 2 a 4)		
6) Extensión	72	7 min
7) Final	4	15 min

Análisis de los datos

Frecuencias alélicas

Debido a que los ISSR's son marcadores dominantes, los heterocigotos no pueden ser distinguidos, por lo que para calcular las frecuencias alélicas se estimó la frecuencia de los alelos recesivos (q) a partir de los individuos sin banda, como la raíz cuadrada de la frecuencia de las ausencias, esto es, $x = q^2$, siendo $q = x^{1/2}$. Por otro lado, la frecuencia de los alelos dominantes (p) es igual a $1 - q$.

Sin embargo, este cálculo arroja estimados estadísticamente sesgados. Con el fin de reducir éste sesgo, se implementó la corrección propuesta por Lynch y Milligan (1994) utilizando el programa Tools for Population Genetic Analysis (TFPGA, M. P. Miller, 1997, Northern Arizona University). Esta corrección recomienda ignorar aquellas muestras para las cuales el número de individuos homocigotos nulos no exceda a tres. Asimismo, el algoritmo propone realizar el análisis utilizando las bandas con frecuencias $< 1 - (3/N)$ para evitar seleccionar loci con altas frecuencias de alelos nulos (Lynch y Milligan, 1994).

Para saber si existen diferencias significativas entre las frecuencias alélicas de todas las poblaciones, se realizó un análisis de probabilidad combinada de Fisher (1954). Este análisis también realizó en el programa TFPGA.

Variación genética

La variación genética se estimó utilizando dos índices: la heterocigosis esperada y el % de loci polimórficos.

La heterocigosis esperada promedio en un locus particular para una población se calcula como $H_E = 1 - \sum p_i^2$, donde p_i es la frecuencia promedio del alelo p para todos los loci.

Para calcular el % de loci polimórficos (% P), se utilizó un criterio del 95% esto quiere decir que ese loci se considera polimórfico siempre y cuando el alelo más común presente una frecuencia alélica máxima del 95%. Eguiarte (1990) propone que éste índice es confiable siempre y cuando se haga un muestreo de los loci al azar.

Diferenciación genética

Con el programa TFPGA se calculó el estimador de diferenciación llamado θ , conocido como el coeficiente de coancestría (Cockerham, 1969). El estimador θ se utiliza óptimamente para el caso de dos alelos por locus y considera el número de individuos y de localidades de las cuales se realizó un muestreo explícitamente. θ se calculó utilizando el programa TFPGA el cual a su vez emplea el algoritmo de Weir y Cockerham (1984) en donde se hacen análisis de varianza de las frecuencias alélicas esperadas y su posterior correlación dentro de las poblaciones con respecto al total de la especie. Éste programa realiza los cálculos de θ para cada locus y por medio del remuestreo, o jackknife, estima un intervalo de confianza asimétrico de θ , incluyendo un bootstrap que a su vez calcula la varianza para el conjunto de loci y las poblaciones (Navarro, 1999).

Análisis jerárquico de la variación

Para saber cómo se encuentra repartida la variación genética dentro de la especie se hizo un AMOVA (Analysis of Molecular Variance) (Excoffier et al., 1992) utilizando el programa Arlequín ver. 2.000. (Schneider et al., 2000). Este análisis arroja estimados de los componentes de la varianza y valores análogos a los estadísticos F , designados como estadísticos Φ , reflejando la correlación de la diversidad haplotípica a diferentes niveles de subdivisión jerárquica. Este método es lo suficientemente flexible como para permitir analizar varios tipos de matrices de entrada correspondientes a diferentes tipos de datos moleculares, así como también diversas suposiciones evolutivas sin modificar la estructura básica del análisis. La significancia de los componentes de la varianza y los estadísticos Φ es probada utilizando una aproximación permutacional, eliminando la suposición de normalidad, la cual es convencional para los análisis de varianza pero inapropiado para los datos moleculares (Excoffier et al. 1992).

El AMOVA puede ser considerado como una extensión del análisis de varianza de Cockerham de las frecuencias génicas (1969), en donde los coeficientes de correlación intraclase dependen de un proceso mutacional (Excoffier, 2001).

Flujo génico

Para estimar el flujo génico se utilizó un método indirecto. Mediante el valor de θ estimado previamente, se calculó el valor de Nm para las 4 poblaciones estudiadas. Slatkin (1989) propone que θ es un buen estimador, ya que no introduce sesgo en los datos.

El flujo génico se calculó según la fórmula del modelo de islas (Wright, 1951) con la corrección de Crow y Aoki (1984):

$$\theta = 1 / (4 \alpha Nm + 1)$$

donde $\alpha = (n/n-1)^2$ y n es el número de subpoblaciones. Si n es muy grande la fórmula corregida converge con la original. En el modelo de islas de Wright se menciona que si Nm es mayor que uno se debe esperar muy poca diferenciación, ya que el flujo génico evita la deriva (Hedrick, 2000).

Distancias genéticas

Se considera que a nivel genético, cualquier diferencia alélica en la presencia o ausencia de los “loci” es originada gracias a que un codón (o una base nucleotídica en el caso de los ISSRs) es distinto. Por lo tanto, a partir de datos de frecuencias alélicas, es posible calcular estadísticamente el número promedio de las diferencias en los codones o en las bases nucleotídicas por locus. Dado que éste número es una medida directa de las diferencias genéticas entre dos poblaciones, se le considera como una medida de distancia genética (Nei, 1987).

Nei (1987) propone tres medidas de distancia genética diferentes:

- 1) La distancia genética mínima (D_m) estima el número mínimo neto de diferencias de codones o bases nucleotídicas entre dos poblaciones.
- 2) La distancia genética estándar (D) la cual mide el número de cambios individuales que ocurren independientemente en las dos poblaciones.
- 3) La distancia genética máxima (D') es similar a la distancia genética estándar. La diferencia es que en este caso, se asume que las tasas de sustitución no son iguales en todos los loci.

En éste trabajo se utilizó el algoritmo propuesto por Nei (1978) para estimar la distancia genética estándar:

$$D = - \ln(I)$$

donde I es la identidad genética, calculada como:

$$I = J_{xy} / (J_x J_y)^{1/2}$$

donde $J_x = \sum x_i^2$ y es llamada la identidad genética de la población X, siendo x_i la frecuencia promedio del alelo p para todos los loci de esa subpoblación, J_y es la identidad genética de la subpoblación Y calculada como $J_y = \sum y_i^2$, siendo y_i la frecuencia promedio del alelo p para todos los loci de esa subpoblación. J_{xy} es la identidad genética promedio de las subpoblaciones calculada como $J_{xy} = \sum x_i y_i$, siendo $x_i y_i$ el producto de las frecuencias promedio del alelo p para todos los loci en las poblaciones X y Y.

A partir de la matriz de distancia genética, el programa TFPGA construyó un árbol de distancias genéticas utilizando el algoritmo UPGMA (Unweighted pair-group method with arithmetic means)

Aislamiento por distancia

Con el fin de saber si ésta especie sigue un modelo de aislamiento por distancia, es decir sea, si existe una correlación entre la distancia geográfica y la genética, se hizo la prueba de Mantel (1967) para lo cual fue necesario tener tanto la matriz de distancias genéticas entre las diferentes poblaciones como la matriz de distancias geográficas, las cuales fueron calculadas a partir de las coordenadas geográficas mediante el programa ARCVIEW 3.2.

Este análisis se llevó a cabo en el programa TFPGA, el cual utiliza el método de aleatorización de las matrices para obtener la significancia estadística de Z (10 000 permutaciones) (Navarro, 1999).

4. RESULTADOS

4.1. BIOLOGÍA REPRODUCTIVA

Cambios temporales en los rasgos florales.

Agave garciae-mendozae es una especie protrándrica. Se requieren de 7 a 8 días aproximadamente para que los botones de la inflorescencia inicien su desarrollo como frutos. Es decir, 7 u 8 días es el tiempo durante el cual las flores pasan de la fase pre-dehiscente a la estaminada y finalmente a la pistilada (Figura 4 y 5).

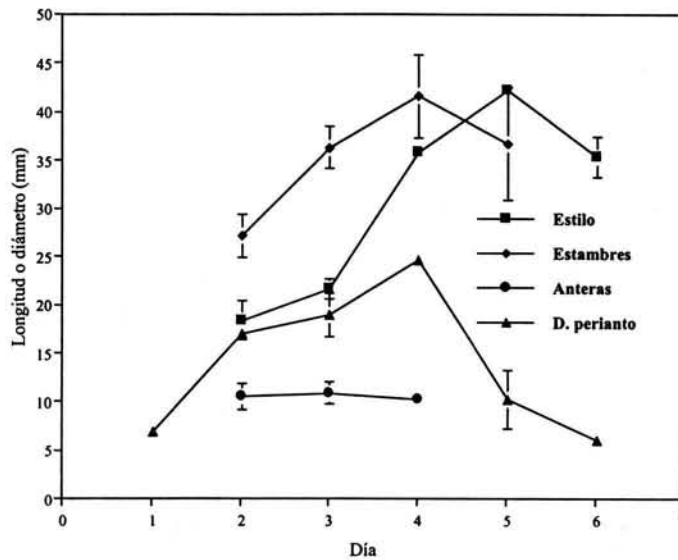


Figura 4. Cambios temporales en algunos caracteres florales (pistilo, estambres, anteras y perianto) de *A. garciae-mendozae* medidos en 20 flores de un solo individuo.

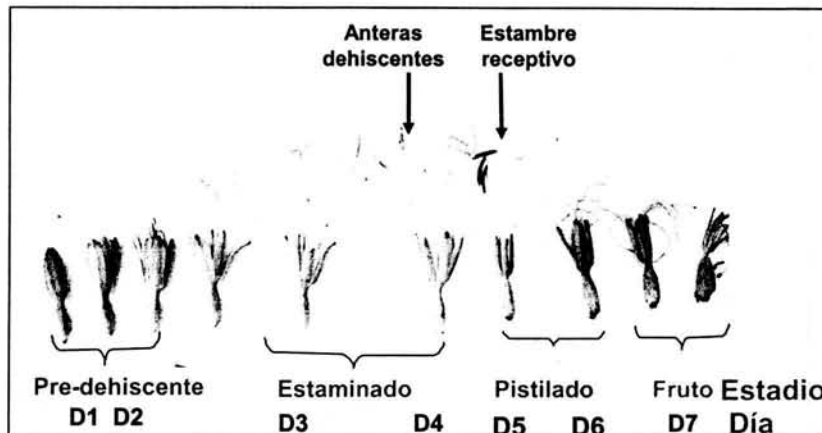


Figura 5. Principales estadios de las flores de *A. garciae-mendozae* así como los días que tarda un botón en convertirse en fruto. El tamaño de muestra fue de 20 flores en un individuo.

En el día 1, (estadio 1, fase pre-dehiscente), los botones están totalmente cerrados. A la mañana siguiente (día 2, estadio 2, fase pre-dehiscente) inicia propiamente la floración, pues los tépalos se abren un poco y las anteras comienzan a emerger por arriba de la parte distal de los tépalos. En el día 3 (estadio 3, fase estaminada), el perianto se encuentra mucho más abierto, los estambres están totalmente exertos ($\bar{x} = 36.4$ mm de altura), las anteras están inmaduras y el estilo es muy pequeño. En la mañana del día 4 (estadio 4, fase estaminada) se registró la abertura máxima del perianto ($\bar{x} = 24.6$ mm), el estilo aumentó de longitud y las anteras son dehiscentes ($\bar{x} = 10.3$ mm) liberan el polen durante la noche hasta la madrugada del día 4. La fase pistilada inicia el día 5 (estadio 5), cuando el perianto comienza a marchitarse, los estambres siguen exertos pero las anteras están secas y el estilo, presentando el máximo de altura ($\bar{x} = 42.4$ mm) tiene el estigma aparentemente receptivo y pegajoso, pues libera un exudado. A la mañana siguiente (día 6) el perianto está completamente seco; los estambres están marchitos y sin anteras y el estilo comienza a secarse. Finalmente, en la mañana del día 7 se puede decir que comienza a formarse el fruto si es que hubo fecundación (Figura 4 y 5).

Producción de néctar

La secreción del néctar comienza durante la fase de pre-dehiscencia, es en el estadio 3 (día 3) en el cual se hicieron las medidas tanto del volumen como de la concentración.

Se obtuvieron las curvas de producción de néctar de dos años consecutivos (2002 y 2003) (Figura 6a, 6b, 6c, 6d). Se encontró que la producción es totalmente nocturna, dando inicio a las 23:00 hrs. y finalizando entre las 5:00 (año 2003) y 7:00 hrs. (año 2002) del día siguiente, con una tasa de producción máxima a la 1:00 hrs.

El volumen y la concentración de néctar acumulado durante toda la noche resultó ser de 67.6 ± 4.75 μ l y 10.49 ± 2.27 %, ($n = 15$) para el año 2002 y de 87.5 ± 29.82 μ l y 15.4 ± 1.82 % ($n = 4$) para el 2003 respectivamente. El volumen total que produjeron las flores con remoción cada dos horas fue de 125 ± 80 μ l ($n = 15$) para el año 2002 y 122 ± 36.2 μ l ($n = 25$) para el año 2003, éstos valores son casi el doble con respecto al volumen acumulado toda la noche en ambos años para las flores que se mantuvieron tapadas.

No se encontraron diferencias significativas ni en el volumen de néctar producido ni en su concentración en los dos años de estudio ($t_{vol} = 0.32$, g.l. 5, $P = 0.3776$; $t_{conc} = 0.006$, g.l. 5, $P = 0.5$).

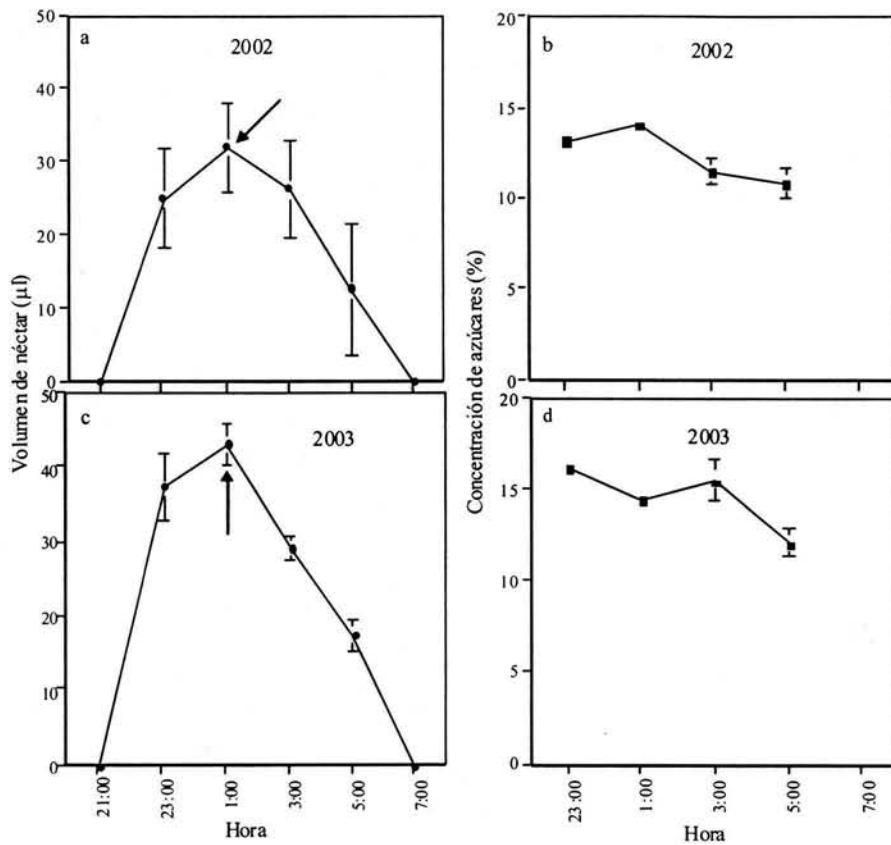


Figura 6. Cambio temporal en la producción de néctar para el año 2002: a) y b) volumen y concentración para el año 2002 c) y d) volumen y concentración para el año 2003. Los valores mostrados son medias \pm error estándar, tomadas cada 2 horas. El tamaño de la muestra fue de 15 flores totales, 5 flores por 3 individuos diferentes para el año 2002 y 25 flores totales, 5 flores por 5 individuos diferentes para el año 2003. Las flechas señalan los picos máximos de producción.

Observación de visitas florales

De un total de 77 hrs de observación para el año 2002 y 48 hrs para el 2003 se encontró que las principales visitas a las flores de *A. garciae-mendozae* eran hechas por abejas (*Apis mellifera*), abejorros (*Bombus sp.*) y murciélagos (*Leptonycteris curasoae* Miller y *Choeronycteris mexicana* Tschdi) para los dos años (Figura 7a y 7b). Sin embargo, también se observaron dípteros que sobrevolaban las flores por las mañanas. Por las noches, además de esfingidos, se observaron otros tipos de polillas, las cuales utilizaban a

la inflorescencia como refugio, pero debido a que la frecuencia con la cual llegaban a los diferentes individuos en floración era baja y muy variable no se tomaron en cuenta al momento de hacer el análisis.

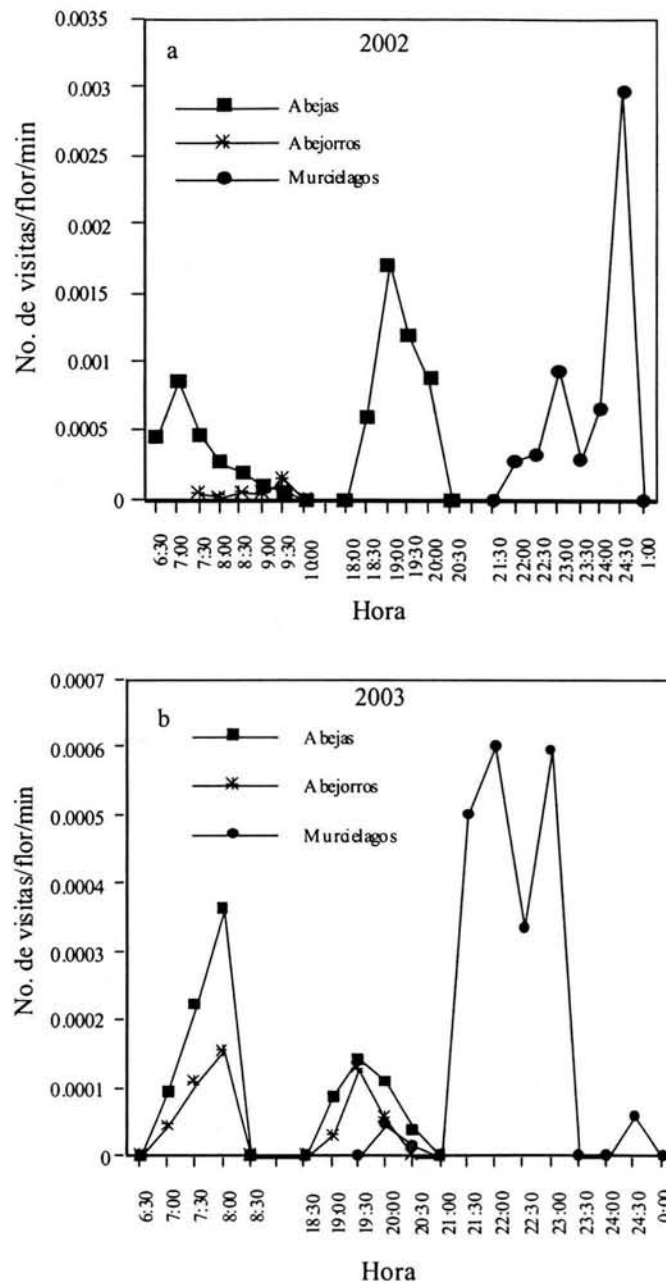


Figura 7. Número de visitas por inflorescencia por minuto del año 2002 a) y 2003 b) de *A. garciae-mendozae*. Para el año 2002 se observaron 19 inflorescencias durante 7 días (77 horas) y para el 2003, 10 individuos por 6 días (48 horas). Nótese que el número de visitas en el año 2002 fue aproximadamente cinco veces mayor que las registradas en el 2003.

En promedio, las inflorescencias en total midieron 428.7 ± 34.3 cm. de largo y de aquí, el 10.5% (45 ± 15.2 cm.) correspondía a la parte fértil para el año 2002 y para el año 2003, 437.2 ± 74.4 cm. y 8.8 % (38.5 ± 14.5) de flores activas en un día, entendiéndose por flores activas aquellas cuyas anteras son dehiscentes y el estigma está receptivo. En términos de número de flores las inflorescencias tienen un total de 3623 flores en promedio y 426 flores activas.

A pesar de que la frecuencia de visitas del año 2003 es bastante baja con relación a la del año 2002, los patrones se conservan (Figura 7a y 7b). Es decir, desde el amanecer (a partir de las 6:30 hrs.) hasta las 8:30 ó 9:30, llegan las abejas y en menor proporción, los abejorros. Al atardecer vuelven a llegar abejas y abejorros (éstos últimos solo en el año 2003) desde las 18:30 hrs. y se van cuando el sol comienza a ocultarse (20:00 - 21:00 hrs.) En el año 2002 los murciélagos llegan hasta las 22:00 hrs. presentando un pico de visitas a las 24:30 hrs. En el año 2003, aunque los murciélagos llegan desde las 19:30 hrs., el pico de más visitas se da entre las 22:00 y 23:00 hrs.

En general el comportamiento, tanto de las abejas como el de los abejorros al llegar a las flores, consiste en buscar el néctar y el polen que queda de la noche anterior. Debido a que las abejas no son tan grandes, en general no tocan ninguna parte reproductiva aunque caminen dentro de la flor. En el caso de los murciélagos, se les considera los polinizadores primarios debido a su tamaño ya que permanecen suspendidos sobrevolando la inflorescencia, por lo que su cabeza y tórax se llenen de polen, y tocan los estigmas receptivos de la flor.

Experimentos de polinización

Con respecto a la proporción de frutos producidos por tratamiento (“fruit-set”) se encontró que la heterocruza produjo más frutos que la autocruza y los sin polinizar (Figura 8a), (Anova *g.l.*3, 17; $F= 3.7350$, $P= 0.0483$), aunque la prueba de Tukey-Kramer *HSD* arroja que ningún par de medias es diferente, lo cual posiblemente se deba al valor marginal de *P* y a la alta varianza al interior de cada grupo experimental.

En cuanto al “seed-set” o número de semillas viables por fruto, se encontró que las heterocruzas registran valores mayores (0.71 ± 0.22) con respecto a los otros tratamientos (autocruzas = 0.35 ± 0.29 , sin polinizar = 0.36 ± 0.16 ; control = 0.58 ± 0.17) (Figura 8b). El

Anova muestra diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los tratamientos (Anova *g.l.* 3,29; $F = 4.96$, $P = 0.0074$). Después de aplicar la prueba estadística de Tukey-Kramer *HSD*, se encontró que existen diferencias significativas entre los valores de la heterocruza con los de autocruza y con los de sin polinizar. No se encontraron diferencias significativas entre el control y la heterocruza, lo cual nos indica que los visitantes son buenos polinizadores (i.e., aparentemente, la fecundidad no está limitada por polinizadores).

Por otro lado, se calculó la depresión por endogamia utilizando los valores del “seed-set” y se encontró una $\delta = 0.51$.

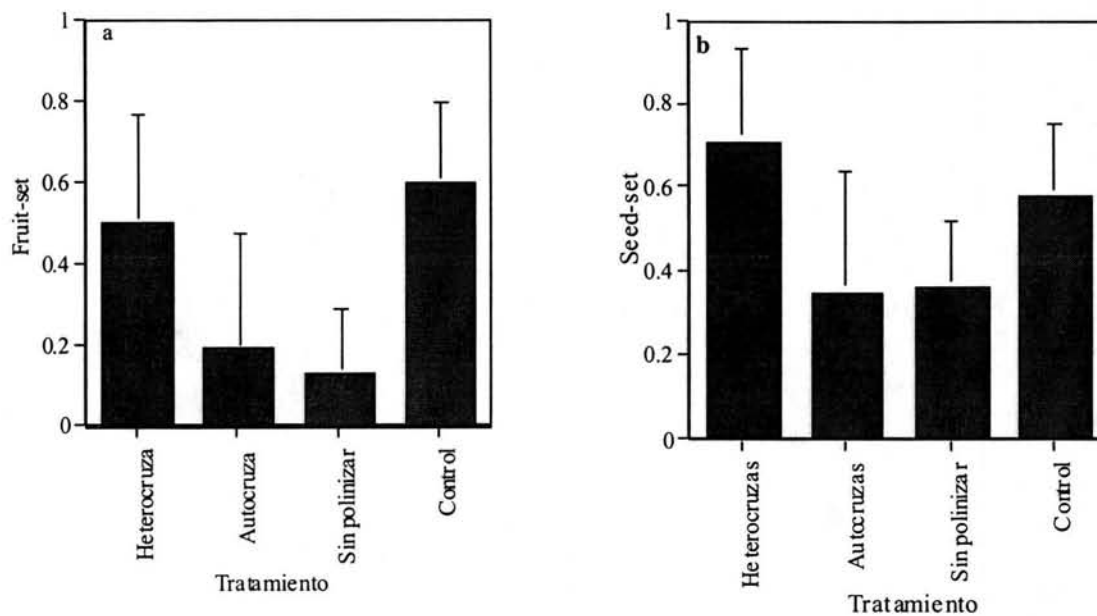


Figura 8. a) “Fruit-set” y b) “seed-set” de los experimentos de polinización controlada realizados en 30 flores de 6 individuos diferentes (5 flores por individuo) de *A. garciae-mendozae*.

Exclusión de polinizadores

Este experimento revela que aunque las visitas nocturnas producen más frutos, una prueba de χ^2 demuestra que tanto los visitantes diurnos como los nocturnos son igualmente efectivos (χ^2 “fruit-set” y “seed-set” = 0.26, *g.l.* = 1, $P = 0.61$) (Figura 9a y 9b). Después de hacer un análisis de varianza con los valores del “seed-set” tanto de los tratamientos como del control, tampoco se encontraron diferencias significativas (Anova *g.l.* 2,8; $F = 0.867$, $P = 0.4669$), lo que nos indica probablemente que ambos gremios de polinizadores (tanto

nocturnos como diurnos) tienen el mismo impacto sobre el éxito reproductivo, a pesar de las bajas frecuencias de visitas florales que hubo en el año de realización del experimento (2003).

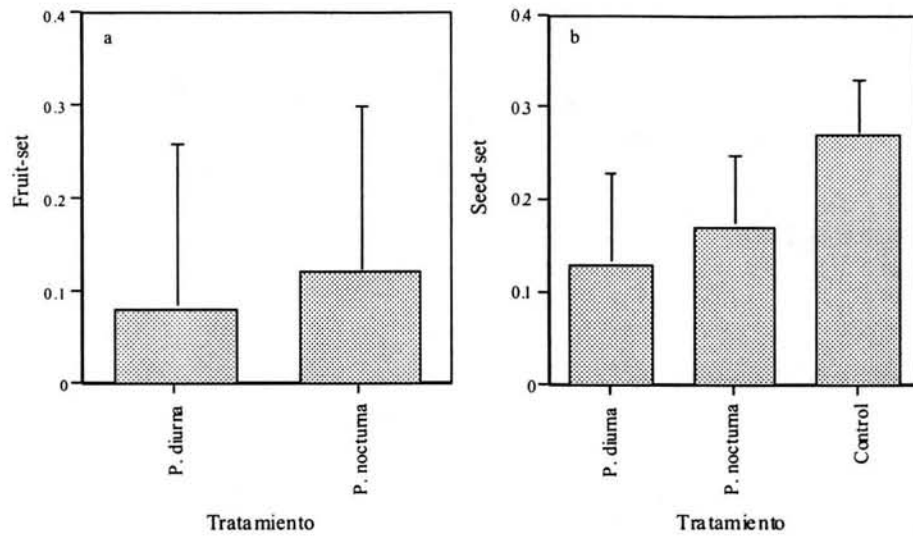


Figura 9: a) "Fruit-set" y b) "seed-set" de los experimentos de exclusión de polinizadores realizados en 5 individuos diferentes. En cada individuo se escogieron 5 flores por tratamiento

4.2. Genética de Poblaciones

Variación genética

Se probaron 18 primers, de los cuales 10 (Apéndice 2) presentaron una buena amplificación, sin embargo, solamente se trabajaron tres: el 841, el 842 y el 846, ya que fueron los que produjeron los patrones de bandeo más claros, repetibles y polimórficos, (Tabla 6, Figuras 10a, 10b y 10c).

Tabla 6. Primers utilizados, el número de loci amplificados por cada uno así como intervalo de peso molecular en pares de bases.

Primer	No. de "loci"	Peso (bp)
841	25	300-2080
842	16	200-1700
846	24	300-2300
No. Total de "loci"	65	

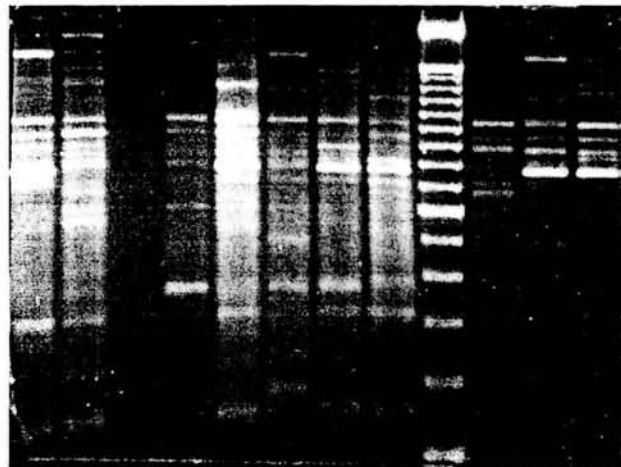


Figura 10a. Gel del primer 841

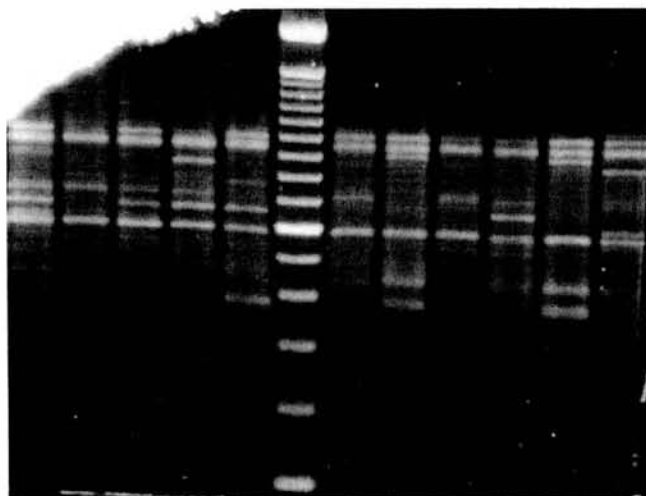


Figura 10b. Gel del primer 842

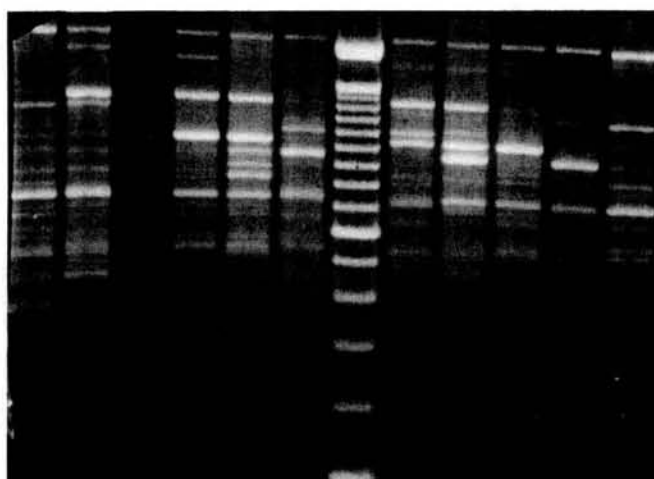


Figura 10c. Gel del primer 846

Se realizó la extracción de ADN de 50 individuos por población, sin embargo los análisis de la genética de poblaciones se hicieron en un promedio de 33 individuos por sitio (Tabla 7a), ya que fue el número de extracciones de mejor calidad según el biofotómetro.

Utilizando el programa TFPGA (Tools for Population Genetics Analysis) con la corrección de Lynch y Milligan (1994), se encontraron niveles de heterocigosis esperada relativamente altos, tanto para el análisis a nivel de especie total ($H_T = 0.27 \pm 0.14$ E.S. promedio, 84.6 % de loci polimórficos, (Tabla 7a) como para el de cada población ($H_s = 0.24 \pm 0.03$ E.S. promedio, 72.4 ± 3.3 % de loci polimórficos (Tabla 7a). La población que presentó el valor más alto de variación genética fue la de Álvarez ($H_s = 0.30$, % $P = 80$), la

cual se encuentra en el estado de San Luis Potosí (Figura 2). Tanto el primer 841 como el 846 presentan los más altos niveles de H_s así como de $\%P$ para el total de las poblaciones (Tabla 7b).

Se encontraron débiles diferencias entre las heterocigosis esperadas entre poblaciones (ANOVA: $n= 260$; $gl= 3,260$; $F= 2.5413$; $P= 0.0569$). La población de Álvarez es la más variable genéticamente. Ambos estimadores de la variación genética (H_s y $\%P$) están correlacionados ($r= 0.58$, $P = 0.05$ g.l. 3), lo cual indica que en términos generales, a mayor polimorfismo, los niveles de heterocigosis son más altos.

Tabla 7a. Valores de los componentes de la variación genética: heterocigosis esperada (H_s) \pm desviación estándar (D.E.) y porcentaje de loci polimórficos ($\%P$, criterio del 95%) para cada una y el total de las poblaciones.

Población	N	H_s	$\% P$
Santa Mónica	32	0.23	67.7
Peña Blanca	38	0.23	72.3
Álvarez	33	0.30	80
Cuesta Colorada	30	0.23	69.2
Promedio	33.25 \pm 3.4 (D.E.)	0.24 \pm 0.03 (D.E.)	72.4 \pm 3.3(D.E)
Total	133	0.27 \pm 0.14 (D.E.)	84.6

Tabla 7b. Heterocigosis total esperada (H_s) y porcentaje de loci polimórficos ($\%P$, criterio del 95%) para el total de las poblaciones por primer.

Primer	H_s	$\%P$
841	0.30	92
842	0.21	71.4
846	0.30	91.6

Estructuración genética

Utilizando el programa TFPGA, se calcularon las frecuencias alélicas de todos los “loci” para todas las poblaciones. Cuando se compararon las frecuencias alélicas utilizando la prueba exacta de Fisher (1954), se encontró que de los 65 “loci” totales, 45 son significativamente diferentes entre las poblaciones (Apéndice 3 y 4).

Mediante el uso del algoritmo del coeficiente de coancestría de Cockerham (1969) se compararon los niveles de variación entre poblaciones y se encontró que el *A. garciae-mendozae* es una especie que presenta una diferenciación genética moderada ($\theta = 0.0976 \pm 0.0108$). El intervalo de confianza al 95% para la θ de todas las poblaciones es de 0.0772 – 0.1180 o sea, θ es diferente de 0. El valor de Nm calculado a partir de la θ , según Crow y Aoki (1984) es de 1.30, valor mayor a 1 pero menor a 4, lo cual indica que las poblaciones están conectadas evolutivamente, aunque de manera moderada.

Utilizando el programa ARLEQUIN se realizó un AMOVA (Analysis of molecular variance) (Excoffier, et al., 1992) para analizar la distribución de la variación genética jerárquicamente. Para esto, se organizaron a las 4 poblaciones en dos regiones.

La región 1 fue llamada Hidalgo y agrupa a las poblaciones de Santa Mónica y Peña Blanca. La región 2 fue nombrada Norte e incluye a la población de Álvarez y a la de Cuesta Colorada.

Se encontró que el 86.05 % de la variación genética de la especie está dentro de cada una de las poblaciones con un valor de $\Phi_{FST} = 0.139$ (valor equivalente a la $F_{ST}(\theta)$). El 2.64 % se encuentra entre las dos regiones y el resto de la variación genética (11.32 %) entre las poblaciones de cada uno de los grupo (Tabla 8).

Distancias genéticas

Para saber qué tan parecidas genéticamente son entre sí las poblaciones, se utilizó el algoritmo que calcula las distancias genéticas según Nei (1978), implementado en el TFPGA.

La distancia promedio entre todos los pares de poblaciones posibles es relativamente baja ($D = 0.036 \pm 0.0085$, D.E.). En la Tabla 9, el valor más bajo ($D = 0.0219$) es el presente entre las poblaciones Santa Mónica y Peña Blanca. En general, los

valores más altos siempre se encuentran en los pares que involucran a la población Álvarez, en particular Álvarez y Peña Blanca ($D = 0.0457$).

Para analizar gráficamente cómo se relacionan las diferentes poblaciones, se realizó un análisis de UPGMA utilizando un bootstrap de 1000 permutaciones. Además del bootstrap, el programa TFPGA calcula los llamados “índices de consistencia” para cada uno de los nodo generados. En éste procedimiento, se realiza un análisis de UPGMA por cada uno de los locus.

La proporción de réplicas similares que apoyan cada nodo, arroja un índice de consistencia promedio alto (0.884). Las poblaciones Santa Mónica y Peña Blanca se agrupan bajo un valor de bootstrap alto (0.86, Figura 11) y las otras dos poblaciones se van agrupando según su distancia genética y geográfica.

Finalmente, la prueba de Mantel indica que existe una correlación alta aunque no significativa, tal vez por que el número de poblaciones es pequeño (4) entre las distancias genéticas y las distancias geográficas (Tabla 9 y Figura 12) presentes en cada par de poblaciones (1000 permutaciones; $Z = 30.99$, $r = 0.7539$, $P = 0.07$), lo que nos sugiere que ésta especie de agave sigue en términos generales un modelo de aislamiento por distancia (Figura 12).

Tabla 8. Análisis de la varianza molecular (AMOVA, Excoffier et al., 1992) para *A. garciae-mendozae*, * = $P < 0.05$. Las regiones son dos. Una se llama Hidalgo y agrupa a las poblaciones de Santa Mónica y Peña Blanca. En la segunda llamada Norte, se encuentran las poblaciones de Álvarez y Cuesta Colorada.

Origen de la variación	g.l	Suma de cuadrados	Componente de la varianza	% de la variación	Estadístico Φ
Entre regiones	2	66.629	0.27	2.64*	Φ_{CT} 0.026
Entre poblaciones/ dentro de las regiones	1	96.183	1.18	11.32*	Φ_{SC} 0.116
Entre poblaciones	129	1159.263	8.99	86.05*	Φ_{ST} 0.139

Tabla 9. Matriz de las distancias genéticas de Nei (1978) calculadas a partir de los 65 loci arrojados por los primers 841, 842 y 846 y las distancias geográficas en km., calculadas a partir de las coordenadas geográficas utilizando el programa ARCVIEW 3.2.

Población	Santa Mónica	Peña Blanca	Álvarez	Cuesta Colorada
Santa Mónica	----	63.048	266.404	121.803
Peña Blanca	0.0219	----	204.051	58.756
Álvarez	0.0401	0.0457	----	146.377
Cuesta Colorada	0.0340	0.0320	0.0423	----

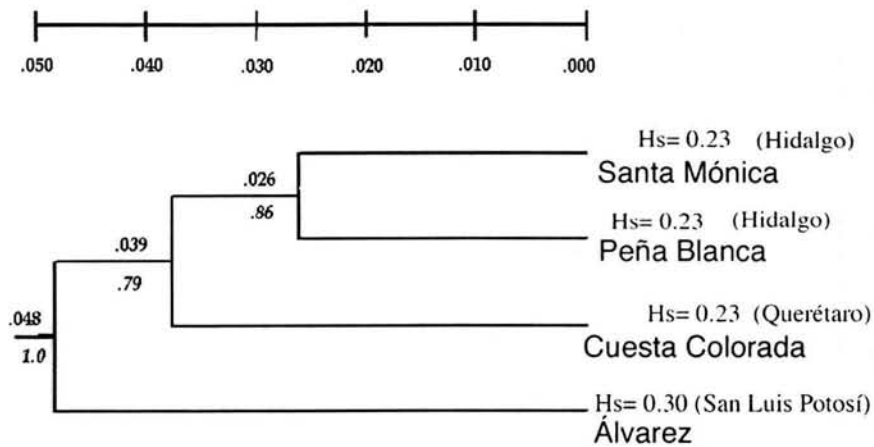


Figura 11. UPGMA de 4 poblaciones de *A. garciae-mendozae*. En la parte superior de las ramas se muestran las distancias genéticas (Nei, 1978) y por debajo, el valor de bootstrap (10,000 permutaciones). Índice de consistencia = 0.884. *Hs* es el valor de heterocigosis esperada por población.

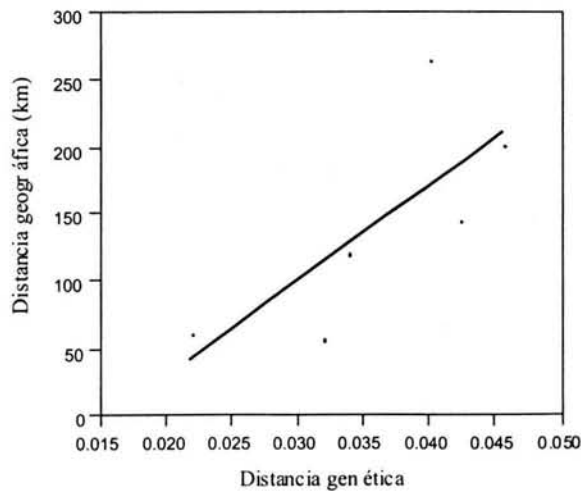


Figura 5. Prueba de Mantel ($r = 0.7539$, $P = 0.07$) para las 4 poblaciones de *A. garciae-mendozae*.

5. DISCUSION

5.1. Biología reproductiva

Morfometría floral, producción de néctar y visitas florales

A. garciae-mendozae presenta caracteres florales que sugieren una polinización por murciélagos. Estos atributos florales son la liberación del polen, la receptividad del estigma y la producción de néctar nocturnos así como valores de la concentración del azúcar del néctar parecidos a aquellos preferidos por los murciélagos (Tabla 10), (Freeman et al., 1983).

Al igual que en otras especies de agaves (Arizaga et al., 2000a; Slauson, 2000; Silva, 2001; Molina-Freaner y Eguiarte, 2003) las flores de *A. garciae-mendozae* producen el máximo de néctar en la fase estaminada. Asimismo, el pico máximo de producción de néctar por noche se da un poco después de la hora en la que comienza a liberarse el polen, así como también coincide con la frecuencia máxima de visitas florales.

En éste trabajo no se identificó la composición de azúcares del néctar, sin embargo, esperaríamos que al igual que otras especies de agaves (Freeman et al., 1983, Cadaval, 1999), presentara altas concentraciones de hexosas (fructuosa y glucosa) y bajas de sacarosa con respecto a otras plantas con flores. Específicamente, el subgénero *Littaea*, presenta valores menores de hexosas y mayores de sacarosa con relación a las concentraciones que presenta el subgénero *Agave* tomando en cuenta el cociente hexosas/sacarosas característico del género el cual, se encuentra relacionado con la preferencia del polinizador (Freeman et al., 1983).

Asimismo, nuestros datos sobre las visitas florales demuestran que los murciélagos realizan un poco más de la mitad de las visitas. Las especies de quirópteros observadas fueron *Leptonycteris curasoae* y *Choeronycteris mexicana* apoyando así lo sugerido en trabajos anteriores (Álvarez y González Quintero, 1970; Howell y Roth, 1981; Martínez del Río y Eguiarte, 1987; Arizaga et al., 2000b) en donde se proponen a éstas especies de murciélagos junto con *L. nivalis* como las principales polinizadores del género *Agave*.

Como se señaló previamente, las tasas de visitas florales son muy diferentes en los dos años de estudio. Esta variación temporal es común (Thompson, 1994; Waser, et al., 1996; Slauson, 2000); en este caso, la falta de murciélagos afecta solamente a los

individuos que no fueron visitados. Éste fenómeno no afecta a la población total pero sí la adecuación de cada individuo, ya que con un año en que lleguen murciélagos y polinicen a las inflorescencias disponibles es más que suficiente para reponer a los individuos que mueren después de reproducirse, así como para aumentar el tamaño de las poblaciones si se toma en cuenta que el número promedio de semillas viables por inflorescencia es de 142,725 de un total de 471,120 semillas (aproximadamente la tercera parte).

Dados el tamaño y el comportamiento de los murciélagos al llegar a las inflorescencias, se propone que éstos son los principales polinizadores. Por otro lado, el comportamiento de las abejas y abejorros consiste principalmente en robar polen y néctar, dado su pequeño tamaño. Sin embargo, no se descarta el hecho de que en algún momento al entrar al perianto, tengan algún contacto con el estigma o con las anteras de la flor.

Por otra parte, claramente existe una relación entre la eficiencia en la reproducción (medida en “fruit-set”) y las tasas de visitas por parte de los murciélagos. En el año 2003 cuando se recogieron los frutos de los experimentos de exclusión de polinizadores, se encontró que el “fruit-set” de las inflorescencias, tanto experimentales como de las observadas fue muy bajo. Además, las inflorescencias se encontraban en muy mal estado, con partes podridas y comidas por animales. En cambio, en el año 2002 los valores de “fruit-set” promedio encontrados fueron más altos (0.54) y el número de visitas fue mayor.

A pesar de la variación anual en los niveles del éxito reproductivo, la población de Santa Mónica está en buenas condiciones: hay muchos individuos jóvenes cuyas rosetas están vigorosas. Estimaciones preliminares sobre su demografía señalan que se trata de una especie con una densidad alta esto es: en 100 m² se encuentran alrededor de 260 individuos. Asimismo, estos individuos presentan tamaños desde 2 a 110 cm tanto de diámetro mayor como de menor así como una altura de 3 a 70 cm, el número de hojas va de 3 a 40.

Es importante señalar que también las otras poblaciones presentan las mismas características. Dos de ellas (Álvarez y Cuesta Colorada) se encontraban en floración al mismo tiempo que la de Santa Mónica (julio del 2003). Muy probablemente las otras (Peña Blanca y Daxshi) también estuviesen floreciendo.

Tabla 10. Principales características de la biología de la polinización de los dos subgéneros pertenecientes al género *Agave*.

Principales características de la biología de la polinización de algunos agaves del subgénero <i>Euagave</i>					
Especies	Volumen de Néctar	Concentración del Néctar	Dehiscencia de las anteras	Principales Visitas	Referencias
<i>Agave palmeri</i>	713 µL/noche	14-19%	Nocturna	Esfingidos, abejas grandes y colibríes	Slauson, 2000
<i>Agave chrysantha</i>	470 µL/noche	14-18%	Nocturna	Abejas grandes, colibríes y esfingidos	Slauson, 2000
<i>Agave salmiana</i>	102 µL/2 h	12%	Nocturna	Murciélagos y aves	Eguiarte et al., 2000
<i>Agave macroacantha</i>	110 µL/día	¿?	Nocturna	Murciélagos, esfingidos, abejas	Arizaga et al., 2000
<i>Agave havardiana</i>	¿?	¿?	¿?	Aves y murciélagos	Eguiarte et al., 2000
<i>Agave mckelveyana</i>	¿?	¿?	Nocturna	Abejas y avispas	Sutherland, 1987
<i>Agave angustifolia</i>	180 µL/noche	18-26%	Nocturna	Murciélagos, aves y abejas	Molina-Freaner y Eguiarte, 2003
<i>Agave subsimplex</i>	40 µL/noche	22-25%	Nocturna	Abejas, palomillas y murciélagos	Molina-Freaner y Eguiarte, 2003
Principales características de la biología de la polinización de algunos agaves del subgénero <i>Littaea</i>					
<i>Agave schottii</i>	11.6 µL/día	18%	Nocturna	Abejas, esfingidos y colibríes	Schaffer y Schaffer, 1977
<i>Agave toumeyana</i>	4.6 µL/día	62.30%	Nocturna	Abejas grandes	Schaffer y Schaffer, 1977
<i>Agave parviflora</i>	0.9 µL/día	37.40%	Diurna	Abejas grandes	Schaffer y Schaffer, 1977
<i>Agave lechuguilla</i>	50-190 µL/día?	12-52%	¿Nocturna?	Esfingidos y abejas grandes	Eguiarte et al., 2000
<i>Agave garciae-mendozae</i>	66-88 µL/noche	10-15%	Nocturna	Murciélagos, abejas y abejorros	Este estudio

Sistema de cruce y depresión por endogamia

Los experimentos de polinización controlada indican que la especie presenta un sistema de polinización cruzada, lo que está de acuerdo con la proterandria de sus flores. En condiciones naturales dicho entrecruzamiento se da gracias a las especies de murciélagos previamente mencionadas.

Asimismo, se detectó cierto grado de auto compatibilidad. La autocompatibilidad es una característica común a varias especies del género. Por ejemplo, *A. lechuguilla* (Silva, 2001), *A. macroacantha* (Arizaga, 2000a), *A. chrysantha* y *A. palmeri* (Slauson, 2000), a pesar de que se entrecruzan principalmente, también presentan auto-compatibilidad, aunque el monto de semillas producidas por autopolinización es pequeño. Sin embargo, Molina-Freaner y Eguiarte (2003) encontraron que tanto *A. subsimplex* como *A. angustifolia* parecen ser auto-incompatibles, ya que no producen frutos por autofertilización. En el caso de *A. garciae-mendozae*, probablemente tanto los murciélagos (por el comportamiento previamente descrito) como las abejas son los agentes que promueven la autopolinización, debido a que entran y salen de flores en diferentes estadios de desarrollo en busca de néctar

y polen, conducta que eventualmente puede derivar en la fecundación de algunas flores de la misma planta (geitonogamia).

En general, se propone que tanto el género *Agave* como la familia Agavaceae parecen ser auto-compatibles, pero la depresión por endogamia puede ser tan fuerte que hace parecer a los datos de autopolinización como evidencia de auto-incompatibilidad, ya que al autopolinizarse se expresan genes recesivos deletéreos en forma homóciga y se reduce mucho la adecuación de las semillas, impidiendo su desarrollo o evitando la formación de los frutos (Eguiarte et. al., 2000). La teoría predice que en el equilibrio, las poblaciones con altos niveles de entrecruzamiento tendrán niveles de depresión por endogamia altos, en cambio, aquellas que presentan niveles de autofertilización altos, tendrán niveles de depresión por endogamia bajos debido a la purga de los alelos recesivos de la población (Charlesworth y Charlesworth, 1987). En este estudio se encontró un índice de depresión por endogamia (δ) de 0.51 (“seed-set”), monto suficiente para favorecer el sistema de polinización cruzada presente en la población en estudio. Sin embargo, estudios previos con otras especies de agaves, sugieren que los niveles de δ pueden ser mucho mayores. Por ejemplo, *A. lechuguilla* presenta niveles de arriba de 0.8 (“seed-set”) (Silva, 2001), *A. macroacantha* de 0.92, (“fruit”-set) (Arizaga et al., 2000a) y *A. palmeri* y *A. crysantha* de 0.91 y 0.97 (“fruti-set”) respectivamente (Slauson, 2000). En cambio, estudios realizados en *Manfreda brachystachya*, estiman niveles de depresión por endogamia relativamente bajos (0.32, seed-set; Eguiarte y Búrquez, 1987). Los datos anteriores sugieren que el género *Agave* presenta niveles de depresión por endogamia altos en relación a los géneros emparentados como *Manfreda* (Silva, 2001).

Por otra parte, los frutos obtenidos con el tratamiento “sin polinizar” en este estudio, se pueden deber a un problema metodológico, ya que el dispositivo con el que se cubría el estilo de la flores experimentales tenía pequeños orificios (para evitar que no se marchitara el pistilo) por medio de los cuales muy probablemente entró polen dando origen posteriormente a un fruto.

Experimentos de exclusión de polinizadores

Aunque todos los datos sugieren que los principales polinizadores coadaptados a *A. garciae-mendozae* son los murciélagos, no se puede asegurar que el éxito de la reproducción sexual de la especie dependa exclusivamente de éstos, tal y como lo demuestran los valores de “fruit-set” producidos por los experimentos de exclusión de polinizadores. A pesar de que el número de visitas florales fue muy bajo durante el año de realización del experimento (2003), el patrón fue el mismo, es decir, mayor número de murciélagos durante menos tiempo a comparación del número menor de abejas y abejorros, pero por más tiempo. Esto nos sugiere muy probablemente que *A. garciae-mendozae* es una especie que presenta un sistema de polinización generalista, en donde los murciélagos son los principales polinizadores, y tanto las abejas como los abejorros los polinizadores secundarios, los cuales pueden asegurar el éxito reproductivo de los individuos en floración cuando los murciélagos faltan.

Otras especies de ambos subgéneros presentan historias contrastantes. Por ejemplo, para *A. angustifolia* (Molina y Eguiarte, 2003) y *A. macroacantha* (Arizaga et al., 2000b) los polinizadores nocturnos (*L. curasoe* para la primera especie, *L. curasoe* y *C. mexicana* para la segunda) son los más importantes, a comparación de *A. subsimplex* (Molina-Freaner y Eguiarte, 2003) y *A. chrysantha* y *A. palmeri* (Slauson, 2000) en los cuales, tanto los polinizadores diurnos como nocturnos son igual de eficientes. En el caso de *A. lechuguilla* los polinizadores nocturnos son más importantes en la parte sur de su gradiente de distribución y los diurnos en la parte norte (Silva, 2001; Silva-Montellano y Eguiarte, 2003).

Los síndromes de polinización

Varios estudios han revelado que diferentes especies de agaves de ambos subgéneros presentan ciertas combinaciones de caracteres florales, las cuales involucran a más de un tipo de polinizadores a pesar de lo sugerido por los síndromes de polinización. Estos arreglos indican que puede haber casos en los cuales, tanto insectos (abejas, abejorros y/o esfingidos) como murciélagos ó colibríes ó aves percheras, pudieran ser los polinizadores (Slauson 2000; Eguiarte et al., 2000; Arizaga et al., 2000; Ornelas et al., 2002; Molina-Freaner y Eguiarte, 2003), lo que cuestiona la rigidez del concepto de los

síndromes de polinización (Waser et al., 1996; Thompson, 2001; Silva-Montellano y Eguiarte, 2003a).

Dada la situación anterior se propone que las especies de agaves que presentan una estrategia de polinizadores generalistas son aquellas que se encuentran en diferentes hábitats o que presentan rangos de distribución muy grandes, en comparación con las especialistas, lo que les permite asegurar su fertilización gracias a la gran variedad de polinizadores, los cuales pueden variar espacial y temporalmente (Slauson, 2000). En el caso de *A. garciae-mendozae*, a pesar de ser *Littaea*, se trata de un sistema de polinización que desde un principio (en la filogenia) ha presentado características propias de quiropterofilia, las cuales le permiten asegurar su éxito reproductivo. Sin embargo se piensa que en ausencia de murciélagos, las abejas y abejorros pueden contribuir a la adecuación de la especie, aunque en menor grado, convirtiéndose posteriormente en los polinizadores más importantes en lugares en donde no llegan murciélagos como es el caso de *A. lechuguilla* (Silva, 2001; Silva y Eguiarte, 2003).

Cabe señalar que el trabajo de campo solamente se hizo en la población de Santa Mónica. Sería interesante realizar el trabajo correspondiente a la biología de la polinización en las otras poblaciones conocidas, para así tener datos que muestren un panorama más amplio, detallado y preciso de lo que sucede en la especie, ya que se pueden encontrar diferencias entre las poblaciones reportadas en cuanto a la morfometría y color florales, en el tipo de las visitas, en el éxito reproductivo, en la hora de la producción del néctar, así como en su concentración y volumen. Tal es el caso de *A. lechuguilla* (Silva, 2001; Silva-Montellano y Eguiarte 2003a), el cual fue estudiado a lo largo de su gradiente de distribución latitudinal y se encontró que las flores tienden a ser más pequeñas, menos abiertas y menos coloridas hacia la parte norte. Con respecto a las visitas florales, los principales polinizadores parecen ser esfingidos (*Hyles lineata*) y abejas grandes diurnas (*Xylocopa californica* y *Bombus pennsylvanicus*). En todas las poblaciones las abejas fueron los polinizadores potenciales más abundantes. Sin embargo, la abundancia de los polinizadores varía a lo largo del gradiente, disminuyendo la frecuencia de visitas por flor hacia las poblaciones norteñas así como el “fruit-set”.

Otros estudios realizados en *Littaea*

Rocha et. al. (no publicado) estudió la biología de la polinización de 5 especies del subgénero *Littaea* ubicadas en la Barranca de Metztitlán (lugar en donde se encuentra la población de Santa Mónica en la cual se llevó a cabo el trabajo correspondiente a la biología de la polinización) y encontró que también son visitadas por las mismas especies de murciélagos (incluyendo a *Glossophaga sp.*) que llegan a *A. garciae-mendozae*, además de otros tipos de visitas como esfingidos (*Hyles lineata*), colibríes (*Eugenes fulgens*, *Calothorax lucifer*, *Cynanthus latirostris*), abejas (*Apis mellifera*) y abejorros (*Bombus sp.*). Asimismo, las anteras liberan el polen por la noche y los valores de concentración del néctar corresponden a los preferidos por los murciélagos (Tabla 11 y Figura 13).

Dentro de la Barranca, al mismo tiempo que *A. garciae-mendozae* está en floración, también lo están *A. difformis* y *A. striata*. A pesar de esto, no hay competencia directa por los polinizadores, debido a que la especie en estudio se encuentra localizada en una serie de cañones (alejados de las poblaciones de las otras especies unos 80 km) en donde el único atractivo para las visitas por murciélagos son las inflorescencias de *A. garciae-mendozae*. Las palmas que abundan, son polinizadas por abejas, escarabajos y por viento, cuando los agaves florecen éstas ya tienen frutos maduros, lo cual indica que estuvieron en flor unos tres meses antes aproximadamente. Por otro lado, no hay cactáceas columnares en la población de estudio ni en las zonas aledañas. Cabe señalar que las especies de cactáceas columnares en la Barranca de Metztitlán son varias como por ejemplo: *Cephalocereus senilis*, *Neobuxbaumia polylopha*, *Pachycereus marginatus*, *Isolatocereus dumortieri* y *Myrtillocactus geometrizans* sin embargo, su temporada de floración es en marzo y principios de abril (Cecilia Jiménez, comentario personal). Asimismo, en el bosque de pino-encino que se encuentra en la parte más alta de la población existen plantas arbustivas, las cuales también están en floración, siendo atractivas para abejas, abejorros y colibríes, aunque el número observado de éstos últimos fue prácticamente nulo.

Figura 13. Principales visitas observadas en 6 especies de agave del subgénero *Littaea* encontradas en la Barranca de Metztitlán.

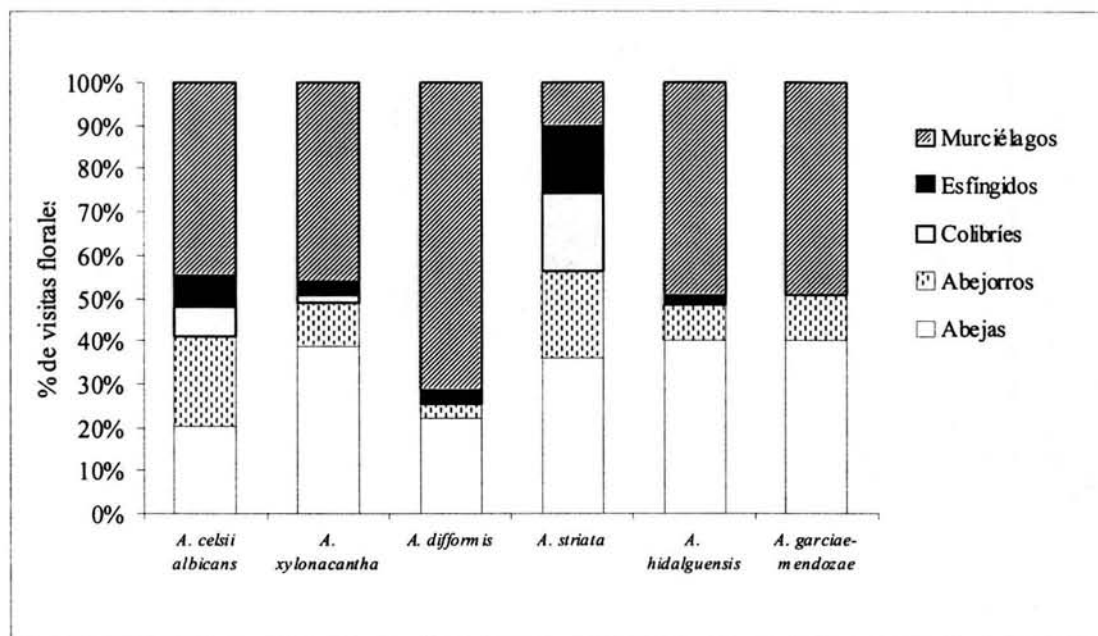


Tabla 11. Hora de la liberación del polen y valores del volumen, concentración y producción máxima (hrs.) del néctar de 6 especies de agaves *Littaea* de la Barranca de Metztitlán.

	Vol de néctar (µl)	Concentración del néctar (%)	Producción máxima de néctar (hrs.)	Liberación del polen (hrs.)
<i>A. garciae-mendozae</i>	66-88	10-15	00 :00	23 :00
<i>A. difformis</i>	83	14	00:00 – 02:00	22 :00
<i>A. striata</i>	218	19	20 :00	22 :00
<i>A. xylonacantha</i>	108	18	00:00 – 02:00	23 :30
<i>A. celsii</i>	133	12	22 :00 - 23:30	00 :00
<i>A. hidalguensis</i>	80	12	02 :00	01:00

5.2. Genética de poblaciones

Marcadores moleculares

La mayoría de los trabajos en donde se utilizan ISSRs se han enfocado en estudiar una amplia gama de especies cultivables en el ámbito de su diversidad genética, análisis filogenéticos, marcaje y mapeo genético y biología evolutiva (Pradeep et al., 2002). A pesar de la alta eficiencia y reproducibilidad que presenta la técnica, existen muy pocos trabajos en donde se traten poblaciones naturales, generalmente se ha utilizado con éxito en estudios de plantas cultivadas. En general los estudios en las poblaciones silvestres se han centrado en estimar los valores de flujo génico entre especies y poblaciones así como también en analizar su diversidad clonal (Wolfe y Liston, 1998; Pradeep et al., 2002).

Investigaciones previas han demostrado que los ISSRs frecuentemente detectan niveles de polimorfismo mayores que los RFLPs o los RAPDs (Esselman et al., 1999) (Apéndice 3). Lo anterior se debe principalmente a la naturaleza de los “primers” ya que al ser un motivo de secuencias simples repetidas, la frecuencia y distribución de los motivos microsatélite repetidos complementarios serán abundantes sobre todo en el ADN nuclear (Pradeep, 2002).

Se sabe también que los métodos utilizados para “leer” los marcadores moleculares afectan de alguna manera los niveles de polimorfismo. En general, los geles de acrilamida, en combinación con la radioactividad son el método más sensible seguidos por geles de acrilamida teñidos con plata y finalmente, los geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio (Pradeep, 2002). Cabe señalar que en éste estudio también se hicieron geles de acrilamida teñidos con plata para el primer 841, y se encontró que se podían leer hasta 40 bandas por individuo en comparación a las 25 bandas promedio registradas mediante geles de agarosa (datos no mostrados).

En este trabajo se obtuvieron aproximadamente 22 loci por cada uno de los tres primers utilizados (65 loci totales). Con éste número de loci relativamente alto se aseguró que cualquiera de los estimados de variación, diferenciación y distancias genéticas que se hicieran, arrojaran valores muy robustos.

Variación genética

Los niveles y distribución de la diversidad genética mantenidos por una especie se encuentran influenciados por su historia evolutiva, así como también por las características específicas que presenta. Por ejemplo, son importantes la forma de vida, los mecanismos de dispersión de las semillas, sus polinizadores y su extensión geográfica. De todos los caracteres examinados, al parecer el sistema de fertilización y distribución geográfica son los que generalmente determinan los niveles de variación genética (Hamrick y Godt, 1989, 1996).

En éste estudio se encontró que *A. garciae-mendozae* presenta niveles de variación genética relativamente altos ($Hs = 0.27$, %P = 84.6). En general, estos valores presentan el mismo patrón que los propuestos por Hamrick y Godt (1989, 1996) para monocotiledóneas longevas, perenes, con un sistema predominante de fertilización cruzada, como es el caso de *A. garciae-mendozae*, esto es, niveles de variación mayores en comparación con especies autopolinizables las cuales generalmente tienen menor diversidad genética. En este estudio los valores que se obtienen son mayores con respecto a los promedios reportados ($Hs = 0.15$, %P = 50, Hamrick et al., 1992). Esta diferencia puede deberse a que éstos corresponden a diferentes especies de plantas, así como también a la técnica de obtención de los datos, ya que el método utilizado fue el de las isoenzimas, en comparación de los ISSR's utilizados en este trabajo. Por otro lado, si se comparan nuestros valores con los compilados por Nybom y Bartish (2000) a partir de estudios de RAPDs, encontramos que prácticamente no hay diferencias (Tabla 12).

A pesar de los diferentes métodos que se han utilizado para describir la variación genética en diferentes especies del género *Agave* y de la familia Agavaceae, los valores encontrados son similares. Utilizando la técnica de los ISSR's, Aguirre (2004) y Eguiarte et al. (2003) encontraron que *A. cupreata* y *A. potatorum* presentan valores de diversidad genética similares a los reportados en este estudio (Tabla 12). Utilizando RAPD's Navarro et al. (2003) encontraron valores un poco más bajos al estudiar a *A. cerulata*, *A. subsimplex* y *A. deserti*, mientras que con las isoenzimas la diversidad genética de *A. subsimplex* es mucho mayor, presentando valores idénticos a los encontrados en este trabajo. Utilizando también isoenzimas, *A. lechuguilla* tiene un valor promedio de Hs alto (0.394) a lo largo de su gradiente latitudinal de distribución. A pesar de no presentar un patrón geográfico en los

niveles de variación genética, las poblaciones del sur exhiben un exceso de heterócigos con relación a lo esperado en equilibrio de Hardy-Weinberg, mientras que las poblaciones norteñas presentan un exceso de homócigos (Silva-Montellano y Eguiarte 2003b).

Tabla 12. Parámetros de estructura genética en especies de la familia Agavaceae así como valores promedio para diferentes rasgos especie específicos de varias especies de plantas.

* Valores de ϕ_{ST}

	H _{esp}	% P	F _{ST}	Técnica	Referencia
<i>A. garciae-mendozae</i>	0.27	85	0.1	ISSRs	Este estudio
<i>A. cupreata</i>	0.29	89	0.145	ISSRs	Aguirre (2004), Eguiarte et al.,(2003)
<i>A. potatorum</i>	0.27	83	0.084	ISSRs	Aguirre (2004), Eguiarte et al.,(2003)
<i>A. subsimplex</i>	0.28	88	0.31	Isoenzimas	Eguiarte et al. (2000)
<i>A. subsimplex</i>	0.14	76	0.08	RAPDs	Navarro et al. (2003)
<i>A. cerulata</i>	0.24	90	0.1	RAPDs	Navarro et al. (2003)
<i>A. deserti</i>	0.19	78	0.14	RAPDs	Navarro et al. (2003)
<i>A. lechuguilla</i>	0.39	96	0.083	Isoenzimas	Silva y Eguiarte (2003b)
<i>A. victoriae-reginae</i>	0.33	83	0.24	Isoenzimas	Martinez Palacios et al (1999)
<i>Yucca filamentosa</i>	0.20	68	0.17	Isoenzimas	Massey y Hamrick (1998)
<i>Manfreda brachystachya</i>	0.48	100	0.03	Isoenzimas	Eguiarte et al. (2000.)
Monocotiledóneas	0.19		0.38*	RAPDs	Nybom y Bartish (2000)
Perenes longevas	0.242		0.25*	RAPDs	Nybom y Bartish (2000)
Anuales	0.125		0.70*	RAPDs	Nybom y Bartish (2000)
Distribución regional	0.222		0.43*	RADPs	Nybom y Bartish (2000)
Perenes de vida corta	0.207		0.39*	RADPs	Nybom y Bartish (2000)
Heterocruza	0.260		0.28*	RADPs	Nybom y Bartish (2000)
Autocruza	0.091		0.70*	RADPs	Nybom y Bartish (2000)

Diferenciación genética

A. garciae-mendozae presenta niveles moderados de diferenciación genética ($\theta = 0.098$). De nuevo estos valores de diferenciación poblacional se ajustan al patrón propuesto por Hamrick y Godt (1996) utilizando isoenzimas, para especies perenes y de vida larga con un sistema de fertilización cruzada ($G_{ST} = 0.094$), las cuales presentan niveles de diferenciación más bajos con relación a los presentes en especies que se autofecundan. Comparando con los valores de diferenciación obtenidos en otras especies de agaves, encontramos similitud tanto en los reportados para el complejo *A. deserti* (Navarro et al., 2003) (rango de 0.084 a 0.135 utilizando RAPDs) como en los presentes en *A. potatorum* (0.084), *A. cupreata* (0.145 utilizando ISSRs) (Aguirre, 2004 ; Eguiarte et al., 2003) y *A. lechuguilla* (0.083 utilizando isoenzimas) (Silva y Eguiarte, 2003b); sin embargo, son mucho más bajos que los reportados en *A. victoriae-reginae* (0.23) (Martínez y Eguiarte, 1999) (Tabla 12).

Comparando con plantas de otros grupos taxonómicos y utilizando RAPDs, Nybom y Bartish (2000) encuentran un valor promedio de F_{ST} de 0.35 y de G_{ST} de 0.29, por lo que se puede concluir que los niveles de diferenciación genética encontrados en este trabajo son bajos, así como también los presentes en otros miembros del género *Agave*, lo cual es congruente con los rasgos especie específicos que presenta.

El valor de la diferenciación genética (ϕ) encontrado es ligeramente mayor al obtenido mediante los coeficientes de Wright (θ) (1921), esto debido a la naturaleza de cada uno de los métodos matemáticos (descrita en material y métodos). No obstante, el patrón de baja diferenciación genética y la presencia de una gran proporción de la variación dentro de las poblaciones son congruentes con lo propuesto tanto por Hamrick y Godt (1996) como por Nybom y Bartish (2000) para especies cuyo sistema de fecundación es preferentemente la heterocruza.

Para tener estimados de ϕ más consistentes e informativos probablemente se debería de contar con más poblaciones, sin embargo esto representa una tarea difícil, debido a que la especie se describió hace poco y aún no se han encontrado suficientes poblaciones o tal vez no existan.

Flujo génico

El flujo génico es el principal componente de la estructura poblacional, ya que determina qué tanto se comporta cada población de una especie como una unidad evolutivamente independiente. Si existen niveles de flujo génico elevados entre las poblaciones, entonces éstas evolucionan juntas, pero si los niveles son bajos, cada población evoluciona prácticamente de manera independiente (Slatkin, 1994).

Qué tanto flujo génico es necesario para prevenir la evolución independiente de las poblaciones de una especie dependerá de las otras fuerzas evolutivas presentes y de su estructura (modelo espacial al que se ajusta la especie). Si Nm o el número de migrantes efectivos es mayor a 1, teóricamente el flujo génico supera los efectos de la deriva génica y previene la diferenciación local. Si Nm es menor a 1 entonces se puede decir que la deriva actúa independientemente en cada una de las poblaciones y si es mayor de 4, entonces las poblaciones se comportan como una gran población más o menos panmíctica. Es importante hacer notar que el flujo génico puede prevenir la diferenciación de algunos loci en particular los neutros, pero no de aquellos que se encuentran bajo presiones de selección fuertes (Slatkin, 1994).

El valor estimado de Nm para *A. garciae-mendozae* fue de 1.30, lo cual nos sugiere que existe el suficiente flujo génico como para contrarrestar los efectos de la deriva génica y mantener a las poblaciones conectadas evolutivamente. Como se sabe, uno de los principales factores que afectan los niveles de flujo génico son los polinizadores y dispersores. Con relación a la especie en estudio, los niveles moderados que presenta probablemente se deban a que a pesar de que es polinizada por murciélagos, sus poblaciones están muy localizadas aunque son localmente abundantes.

Sería interesante utilizar otros métodos para obtener otros valores de los niveles de flujo génico. Por ejemplo, podrían utilizarse los alelos privados, aquellos que se encuentran solamente en una población (Slatkin, 1985). Aunque se sabe, que en la práctica cuando se cuenta con suficiente información genética, ambos métodos (el de la F_{ST} utilizada en este estudio y el de los alelos privados) se espera que arrojen estimados del flujo génico comparables bajo una amplia variedad en las condiciones de las poblaciones (Slatkin y Barton, 1989). Por otra parte, existen métodos directos para medir el flujo génico como por ejemplo, marcar el polen utilizando marcadores fluorescentes.

En general, el valor de Nm depende directamente de la estimación de la F_{ST} debido al algoritmo utilizado para calcularlo (Crow y Aoki, 1984). Este tipo de métodos indirectos tiene la ventaja de que incorpora los efectos de todos los tipos de dispersores. Sin embargo, tienen la desventaja de que depende de las suposiciones relacionadas con los procesos que afectan a las frecuencias alélicas, las cuales no pueden ser probadas independientemente. Por ejemplo, éstos estimados indirectos asumen que la especie se encuentra en un equilibrio tanto genético como demográfico, cuestión que puede no ser verdadera si se encuentra en un cuello de botella o si acaba de especiarse (Slatkin, 1996). Entre las principales propiedades que presenta la F_{ST} como estimador indirecto del número efectivo de migrantes es el hecho de que cuando llega al “equilibrio”, la F_{ST} tiende al equilibrio siendo sensible solamente al flujo génico y a la deriva génica, dejando por un lado a la selección y a la mutación (Slatkin, 1996).

Si se comparan los valores de este trabajo ($Nm = 1.3$) con los encontrados en otras especies de agaves, observamos que *A. cupreata* presenta valores similares ($Nm = 1.49$, ISSRs) mientras que los estimados para *A. potatorum* ($Nm = 2.99$, ISSRs) y el complejo *A. deserti* (rango de 2.91 a 6.14, RAPDs) son mayores. De los estudios realizados con isoenzimas, *A. victoriae-reginae* arroja niveles bajos ($Nm = 0.655$, isoenzimas) en comparación de *A. lechuguilla* cuyo valor declina desde el sur de su distribución hacia el norte (12.23, sur; 2.23, centro y 1.08 en el norte, isoenzimas).

Distancias genéticas y aislamiento por distancia

La prueba de Mantel indica que *A. garciae-mendozae* sigue un patrón de aislamiento por distancia, es decir, las distancias genéticas y las geográficas se encuentran correlacionadas positivamente, lo que significa que conforme más alejadas estén las poblaciones unas de otras, serán más diferentes genéticamente hablando. Como se muestra en el UPGMA de la figura 11, las poblaciones pertenecientes al estado de Hidalgo (Santa Mónica y Peña Blanca) son las que presentan la distancia genética menor (0.0219), en cambio, la población de Álvarez, localizada en el estado de San Luis Potosí, es la más alejada con respecto a las otras tres poblaciones tanto geográfica (205.61 km. promedio) como genéticamente ($D= 0.0427$ promedio) seguida por la población de Cuesta Colorada en Querétaro (109 km, $D= 0.0361$, valores promedio).

En general, los estimados de las distancias genéticas entre las diferentes poblaciones de nuestro estudio son pequeñas ($D=0.0219 - 0.0457$) si se comparan con otras especies, lo cual nos está indicando o que éstas han divergido hace poco tiempo y son muy jóvenes o que existe flujo génico entre ellas, como lo muestran los resultados previamente descritos.

Los valores de las distancias genéticas ($D=0.036$ promedio) son parecidos a los de *A. potatorum* ($D=0.0228 - 0.0550$) (Aguirre, 2004; Eguiarte et al., 2003). Con respecto a *A. cupreata* ($D=0.0348 - 0.0930$) (Aguirre, 2004; Eguiarte et al., 2003), a *A. lechuguilla* ($D=0.03 - 0.12$, por isoenzimas) (Silva y Eguiarte, 2003b) y a *A. victoriae-reginae* ($D=0.182$ promedio, isoenzimas) son menores (Martínez y Eguiarte, 1999). Son mayores si se comparan con los presentes en *A. subsimplex* ($D=0.0148 - 0.025$), *A. cerulata* ($D=0.0141 - 0.092$) y *A. deserti* ($D=0.0062 - 0.0292$) (estos últimos tres rangos de valores se obtuvieron mediante RAPD's) (Navarro et al., 2003). Esto es lógico si se toma en cuenta que las tres últimas especies de agaves forman el llamado complejo *A. deserti*, el cual representa un grupo de especies y subespecies con una distribución alopátrica cercana.

Cabe señalar que los valores de las distancia genéticas se encuentran íntimamente relacionados con los valores de Nm y de diferenciación genética y éstos dos últimos con el número de poblaciones que se estén trabajando dado el algoritmo con el que se calculó la Nm (Crow y Aoki, 1984). Esto es, a valores mayores de distancia genética, los valores de Nm serán menores y los de diferenciación genética, mayores. En el caso de *A. garciae-mendozae*, las distancias genéticas son relativamente pequeñas y los valores tanto de Nm como de θ son moderados. Asimismo, al compararse los valores de las distancias genéticas, de Nm y de θ de otras especies de agaves con las presentes en *A. garciae-mendozae*, puede en algunos casos no parecer congruente la relación que presentan estos parámetros debido a que el número de poblaciones en los diferentes trabajos no es el mismo, sin embargo en cada estudio, se conserva el sentido de la relación entre los diferentes parámetros esto es, a mayor flujo génico, distancias y diferenciación genéticas menores.

Sintetizando

Conociendo algunas características de la biología de la polinización se puede interpretar el escenario evolutivo descrito por la genética de poblaciones para *A. garciae-mendozae*. El hecho de que la especie presente altos niveles de heterocigosis se explica

gracias a la presencia de un sistema de fertilización cruzada principalmente, la cual en condiciones naturales es efectuada por los murciélagos *L. curasoeae* y *C. mexicana*. Gracias a estos polinizadores el nivel de flujo génico entre las poblaciones es suficiente como para evitar que exista una fuerte diferenciación poblacional, explicando así el hecho de que la mayor parte de la variación genética de la especie se encuentre al interior de las poblaciones.

Asimismo, este trabajo es una propuesta de estudio en donde se relacionan tanto la aproximación genética como la ecológica, integración que puede ser una herramienta interesante para entender un poco más acerca de la evolución del género *Agave*. Por otro lado, éste enfoque también puede ser útil para estudiar especies de importancia económica y/o en peligro de extinción como es el caso de algunos agaves (Martínez-Palacios et al., 1999), con el fin de diseñar programas de conservación que tomen en cuenta ambos aspectos fundamentales de las especies.

Comparación entre los marcadores de ADN y las isoenzimas

A lo largo de la discusión, los resultados de éste trabajo obtenidos mediante ISSRs se han comparado con los de otros trabajos en agaves en donde se han utilizado diferentes técnicas de obtención de los datos como los RAPDs y las isoenzimas. A éste respecto cabría la pregunta de qué tan válida es ésta comparación. Como se observa en la Tabla 12, los valores de H_{esp} , $\%P$ y F_{ST} obtenidos para diferentes especies de agaves y otros miembros de la familia Agavaceae (RAPDs e isoenzimas) tienen niveles de variación genética mayores y niveles de diferenciación genética menores con relación a los valores presentes en especies autopolinizables.

Existen trabajos en donde se utilizan dos técnicas para obtener los datos correspondientes a la variación y diferenciación genética. Por ejemplo, Liu y Furnier (1993) estudiando dos especies de álamos, encontraron que los RAPDs revelan más variación que las isoenzimas, ya que reflejan la variación aleatoria en el ADN no codificante además de que son sensibles a los diferentes tipos de mutación. En cambio, la variación isoenzimática es originada solamente por aquellas mutaciones que promueven un cambio en las propiedades electroforéticas de un muy limitado número de proteínas. Por otra parte, datos empíricos indican que los polimorfismos obtenidos por isoenzimas se encuentran sujetos a

presiones selectivas, mientras que los marcadores por RAPDs son en general neutros (Nybom y Barthish, 2000)

Asimismo, Ge y Sun (1999) encontraron que el mangle *Aegiceras corniculatum* presenta niveles de variación y diferenciación genética bajos tanto con isoenzimas ($H_{esp} = 0.024$, $G_{ST} = 0.106$) como con ISSRs ($H_{esp} = 0.039$, $G_{ST} = 0.178$), haciendo notar que generalmente los valores de ISSRs son ligeramente mayores a los de las isoenzimas, a pesar de ésta diferencia en los valores, sí son comparables.

Varios estudios han demostrado que un análisis por ISSRs frecuentemente arroja niveles de polimorfismo mayores a los detectados por RFLPs o RAPDs (Salimath et al., 1995; Nagaoka y Ogihara, 1997; Esselman et al., 1999). Otros trabajos sugieren que los estimados de diferenciación genética entre poblaciones basados en marcadores moleculares (como RAPD y RFLP) son generalmente mayores a los estimados basados en isoenzimas (Buso et al., 1998; Ayres y Ryan, 1999) y además más robustos dado los altos niveles de polimorfismo (Ge y Sun, 1999).

6. CONCLUSIONES

- Los murciélagos son los polinizadores “coadaptados” y más importantes, hecho que podría explicar en parte la preferencia de heterocruza como sistema de polinización, los niveles altos de heterocigosis esperada, así como el flujo génico encontrado, el cual evita que haya una fuerte diferenciación genética entre las poblaciones.
- El escenario descrito por la genética de poblaciones está relacionado al encontrado en las flores de este agave, ya que éstas presentan características que sugieren un síndrome de polinización por murciélagos. A pesar de esto, no se puede asegurar que la especie presente un síndrome de polinización quiropterofílico estricto. Más bien se trata de una especie generalista en donde los murciélagos son los principales polinizadores y las abejas, los polinizadores secundarios las cuales aseguran el éxito reproductivo de los individuos en floración cuando los murciélagos varían temporal y espacialmente.
- *A. garciae-mendozae* presenta una heterocigosis relativamente alta y una diferenciación genética moderada comparada con otras especies de agaves ($Hs_{total} = 0.18$ y $Fst = 0.1$, valores promedio), lo cual es coherente con el hecho de que una gran parte de la variación genética de la especie se encuentre dentro de las poblaciones.
- Los niveles de flujo genético ($Nm = 1.3$) son un poco bajos en relación al valor promedio de otros agaves ($Nm = 3.3$).
- Esta especie sigue un modelo de aislamiento por distancia, pues a mayor distancia geográfica entre las poblaciones hay una mayor distancia genética.

Apéndice 1

Extracción de ADN de Agave

- 1.- Moler en un mortero el tejido con nitrógeno líquido.
- 2.- Agregar 250 µl de buffer CTAB y 750 µl de STE, seguir moliendo. Recuperar el todo en un tubo eppendorf de 1.5 ml y centrifugar a 10 000 rpm durante 8 minutos. Se agregan estos dos buffers tanto como se necesite para que el todo no quede muy espeso ni baboso, siempre guardando la proporción 1:3 de CTAB y STE.
- 3.- Eliminar el sobrenadante, secar con espátula el exceso y resuspender con 600 µl de buffer CTAB-2x con β-mercaptoetanol. Homogeneizar en el vortex. Centrifugar a 10000 rpm durante 8 minutos, eliminar el sobrenadante. Escurrir en papel secante y mantener en hielo todo el tiempo. Repetir este paso 2 veces o hasta que el sobrenadante esté un poco transparente y no tan baboso.
- 4.- Agregar 8 µl de RNAasa (7000 u/ml). Homogeneizar suavemente. Incubar a 37° por 20 minutos.
- 5.- Después agregar a cada tubo 40 µl de proteinasa K (20 mg/ml) durante 20 minutos. Incubar a 65° durante 20 minutos.
- 6.- Agregar a cada tubo 600 µl de cloroformo-octanol 21:1, agitar hasta homogeneizar y centrifugar a 9 000 rpm durante 14 minutos. Opcional: repetir la extracción con el cloroformo-octanol hasta que el sobrenadante quede totalmente transparente.
- 7.- Trasladar el sobrenadante a un tubo nuevo (con una pipeta de 200 µl) y precipitar el DNA con 2/3 partes del volumen final (600 µl aprox.) de isopropanol frío. Dejar precipitando 2 horas a -20° C.
- 8.- Centrifugar a 9 000 rpm durante 5 minutos.
- 9.- Tirar sobrenadante y limpiar el pellet con 1 ml de etanol al 70% frío y centrifugar a 7000 rpm durante 5 minutos.
- 10.- Eliminar el sobrenadante y resuspender el pellet con 100 µl de H₂O ultra pura.
Nota: el pellet debe de estar bien seco, que no quede nada de etanol. Esto se hace en la campana de flujo laminar y se dejan los tubos abiertos por 10 minutos con la campana encendida.

CTAB 2X- Tris-Hcl 100 mM pH 8
NaCl 1.4 M
EDTA 20 mM
CTAB 2%
β-ME 0.3%

STE – Tris-Hcl 100 mM pH8
EDTA 50 mM pH 8
NaCl 100 mM
β-ME 0.3%

CTAB – Tris-Hcl 100 mM pH 8
EDTA 20 mM pH 8
CTAB 4%
NaCl 1.5 M
PVP 40 4%
Ác. Ascórbico 0.1%
DIECA 0.1%
β-ME 0.3%

El β-mercapto etanol se agrega solamente cuando se va a utilizar el buffer.

Apéndice 2

De los 18 primers probados, en la siguiente tabla se muestran los que presentaron buena amplificación. Lo datos para hacer los análisis de genética de poblaciones se obtuvieron utilizando los primers 841, 842 y 846.

Primer	Secuencia 5' → 3'	No. de "loci"*
808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	15
827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	8
840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	19
841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	25
842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG	16
846	CAC ACA CAC ACA CAC ART	24
847	CAC ACA CAC ACA CAC ARC	10
850	GTG TGT GTG TGT GTG TYC	10
855	ACA CAC ACA CAC ACA CYT	18
856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA	10

*Número de loci aproximado para *A. garciae-mendozae*

Apéndice 3.

Frecuencias alélicas por "loci" para cada una de las poblaciones, p y q

Locus	Santa Mónica		Peña Blanca		Álvarez		Cuesta Colorada	
	P	q	p	q	p	q	p	q
1	0,6365	0,3635	0,4822	0,5178	0,3687	0,6313	0,3381	0,6619
2	0,0641	0,9359	0,2724	0,7276	0,0305	0,9695	0,1818	0,8182
3	0,3123	0,6877	0,2038	0,7962	0,2591	0,7409	0,3136	0,6864
4	0,2274	0,7726	0,3284	0,6716	0,4724	0,5276	0,0864	0,9136
5	0,0000	1,0000	0,0537	0,9463	0,1115	0,8885	0,0864	0,9136
6	0,0315	0,9685	0,1255	0,8745	0,1460	0,8540	0,0167	0,9833
7	0,0315	0,9685	0,0132	0,9868	0,0305	0,9695	0,0685	0,9315
8	0,2274	0,7726	0,2906	0,7094	0,3687	0,6313	0,3136	0,6864
9	0,0476	0,9524	0,0132	0,9868	0,1460	0,8540	0,0685	0,9315
10	0,0641	0,9359	0,0676	0,9324	0,0621	0,9379	0,2670	0,7330
11	1,0000	0,0000	0,7561	0,2439	1,0000	0,0000	0,5452	0,4548

12	0,6818	0,3182	0,2203	0,7797	0,6420	0,3580	0,4776	0,5224
13	1,0000	0,0000	0,8153	0,1847	0,6023	0,3977	0,6715	0,3285
14	0,1882	0,8118	0,0132	0,9868	0,3687	0,6313	0,1818	0,8182
15	0,7344	0,2656	0,7561	0,2439	1,0000	0,0000	1,0000	0,0000
16	0,4361	0,5639	0,2373	0,7627	0,5017	0,4983	0,6715	0,3285
17	0,2274	0,7726	0,0400	0,9600	0,3687	0,6313	0,1618	0,8382
18	0,5595	0,4405	0,7561	0,2439	0,3227	0,6773	0,7923	0,2077
19	0,4643	0,5357	0,0961	0,9039	0,0782	0,9218	0,0864	0,9136
20	0,1694	0,8306	0,0132	0,9868	0,1115	0,8885	0,0864	0,9136
21	0,2274	0,7726	0,0400	0,9600	0,1638	0,8362	0,0000	1,0000
22	0,1509	0,8491	0,0400	0,9600	0,0782	0,9218	0,0509	0,9491
23	0,6818	0,3182	0,5955	0,4045	0,5662	0,4338	0,6247	0,3753
24	0,0476	0,9524	0,0676	0,9324	0,0000	1,0000	0,0000	1,0000
25	0,1882	0,8118	0,2038	0,7962	0,6023	0,3977	0,3381	0,6619
26	0,0641	0,9359	0,0400	0,9600	0,0621	0,9379	0,0000	1,0000
27	0,0978	0,9022	0,0265	0,9735	0,3009	0,6991	0,0685	0,9315
28	1,0000	0,0000	0,8153	0,1847	0,6420	0,3580	1,0000	0,0000
29	1,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,6420	0,3580	1,0000	0,0000
30	0,0000	1,0000	0,0132	0,9868	0,0782	0,9218	0,0336	0,9664
31	0,3123	0,6877	0,3685	0,6315	0,2591	0,7409	0,2899	0,7101
32	0,0641	0,9359	0,1107	0,8893	0,0621	0,9379	0,0864	0,9136
33	0,0476	0,9524	0,1255	0,8745	0,2591	0,7409	0,0509	0,9491
34	0,0315	0,9685	0,3284	0,6716	0,6023	0,3977	0,3136	0,6864
35	0,1328	0,8672	0,0676	0,9324	0,2005	0,7995	0,2448	0,7552
36	0,0000	1,0000	0,0000	1,0000	0,0152	0,9848	0,2023	0,7977
37	0,0000	1,0000	0,0000	1,0000	0,0462	0,9538	0,0000	1,0000
38	1,0000	0,0000	0,8153	0,1847	1,0000	0,0000	1,0000	0,0000
39	0,0315	0,9685	0,0537	0,9463	0,2196	0,7804	0,2899	0,7101
40	0,0000	1,0000	0,0265	0,9735	0,1286	0,8714	0,0000	1,0000
41	0,0000	1,0000	0,0000	1,0000	0,1820	0,8180	0,0000	1,0000
42	0,5257	0,4743	0,4340	0,5660	0,3227	0,6773	0,0000	1,0000
43	0,0000	1,0000	0,1255	0,8745	0,0305	0,9695	0,0000	1,0000
44	0,1151	0,8849	0,0000	1,0000	0,1115	0,8885	0,0000	1,0000
45	0,0315	0,9685	0,1406	0,8594	0,3453	0,6547	0,2899	0,7101
46	0,0641	0,9359	0,0961	0,9039	0,2196	0,7804	0,0864	0,9136
47	0,1328	0,8672	0,1875	0,8125	0,0462	0,9538	0,0864	0,9136
48	0,0978	0,9022	0,1559	0,8441	0,3227	0,6773	0,0167	0,9833
49	0,2686	0,7314	0,3092	0,6908	0,3930	0,6070	0,0685	0,9315
50	0,4093	0,5907	0,4822	0,5178	0,4182	0,5818	0,4776	0,5224
51	0,1328	0,8672	0,0818	0,9182	0,0947	0,9053	0,0000	1,0000
52	0,2274	0,7726	0,0961	0,9039	0,3009	0,6991	0,0167	0,9833
53	0,6818	0,3182	0,8153	0,1847	0,4724	0,5276	0,4178	0,5822
54	0,0808	0,9192	0,1255	0,8745	0,2005	0,7995	0,1618	0,8382
55	0,7989	0,2011	0,7078	0,2922	1,0000	0,0000	0,7258	0,2742
56	0,4941	0,5059	0,7561	0,2439	0,3687	0,6313	0,5102	0,4898

57	0,4093	0,5907	0,3092	0,6908	0,4724	0,5276	0,2899	0,7101
58	0,0808	0,9192	0,1107	0,8893	0,0621	0,9379	0,1424	0,8576
59	0,2274	0,7726	0,3482	0,6518	0,2797	0,7203	0,1046	0,8954
60	0,4941	0,5059	0,7561	0,2439	0,6866	0,3134	0,2670	0,7330
61	0,0641	0,9359	0,0676	0,9324	0,2196	0,7804	0,3381	0,6619
62	0,0000	1,0000	0,0132	0,9868	0,0462	0,9538	0,0167	0,9833
63	0,1882	0,8118	0,0400	0,9600	0,4724	0,5276	0,2232	0,7768
64	0,1509	0,8491	0,0676	0,9324	0,0152	0,9848	0,0000	1,0000
65	0,3836	0,6164	0,1716	0,8284	0,2797	0,7203	0,2899	0,7101

Apéndice 4

Frecuencias alélicas por locus para el total de las poblaciones, * = $P < 0.05$

Loci	p	q	P de Fisher
1	0,4504	0,5496	0,0212 ± 0,0034*
2	0,1370	0,8630	0,0001 ± 0,0001*
3	0,2688	0,7312	0,4508 ± 0,0111
4	0,2739	0,7261	0,0000 ± 0,0000*
5	0,0620	0,9380	0,0181 ± 0,0022*
6	0,0822	0,9178	0,0097 ± 0,0015*
7	0,0344	0,9656	0,4222 ± 0,0134
8	0,3002	0,6998	0,4315 ± 0,0136
9	0,0660	0,9340	0,0232 ± 0,0038*
10	0,1070	0,8930	0,0025 ± 0,0011*
11	0,7511	0,2489	0,0023 ± 0,0008*
12	0,4642	0,5358	0,0000 ± 0,0000*
13	0,7365	0,2635	0,0385 ± 0,0049*
14	0,1725	0,8275	0,0000 ± 0,0000*
15	0,8212	0,1788	0,3128 ± 0,0066
16	0,4303	0,5697	0,0007 ± 0,0006*
17	0,1862	0,8138	0,0000 ± 0,0000*
18	0,5734	0,4266	0,0000 ± 0,0000*
19	0,1635	0,8365	0,0000 ± 0,0000*
20	0,0904	0,9096	0,0082 ± 0,0019*
21	0,1028	0,8972	0,0000 ± 0,0000*
22	0,0781	0,9219	0,1115 ± 0,0068
23	0,6199	0,3801	0,756 ± 0,0059
24	0,0305	0,9695	0,0167 ± 0,0021*
25	0,3110	0,6890	0,0000 ± 0,0000*
26	0,0422	0,9578	0,208 ± 0,0107
27	0,1155	0,8845	0,0000 ± 0,0000*
28	0,8013	0,1987	0,0430 ± 0,0044*
29	0,8212	0,1788	0,0084 ± 0,0019*
30	0,0305	0,9695	0,0514 ± 0,0045

31	0,3110	0,6890	0,6241±0,0112
32	0,0822	0,9178	0,7212± 0,0122
33	0,1197	0,8803	0,0028±0,0012*
34	0,2949	0,7051	0,0000±0,0000*
35	0,1545	0,8455	0,0323±0,0038*
36	0,0461	0,9539	0,0000±0,0000*
37	0,0113	0,9887	0,0410±0,0051*
38	0,9010	0,0990	1,0000±0,0000
39	0,1370	0,8630	0,0000±0,0000*
40	0,0383	0,9617	0,0005±0,0004*
41	0,0422	0,9578	0,0000±0,0000*
42	0,3056	0,6944	0,0000±0,0000*
43	0,0422	0,9578	0,0002±0,0001*
44	0,0540	0,9460	0,0000±0,0000*
45	0,1908	0,8092	0,0000±0,0000*
46	0,1155	0,8845	0,0601±0,0058
47	0,1155	0,8845	0,0714±0,0089
48	0,1457	0,8543	0,0000±0,0000*
49	0,2586	0,7414	0,0001±0,0001*
50	0,4504	0,5496	0,8289±0,0101
51	0,0781	0,9219	0,0202±0,0036*
52	0,1545	0,8455	0,0000±0,0000*
53	0,5823	0,4177	0,0013±0,0006*
54	0,1413	0,8587	0,2901±0,0100
55	0,7833	0,2167	0,4244±0,0074
56	0,5235	0,4765	0,0051±0,0017*
57	0,3678	0,6322	0,1773±0,0042
58	0,0987	0,9013	0,4776±0,0075
59	0,2435	0,7565	0,0119±0,0025*
60	0,5315	0,4685	0,0000±0,0000*
61	0,1590	0,8410	0,0001±0,0001*
62	0,0189	0,9811	0,3045 ±0,0078
63	0,2096	0,7904	0,0000±0,0000*
64	0,0580	0,9420	0,0017±0,0012*
65	0,2739	0,7261	0,0928±0,0122

Apéndice 5.

Principales ventajas y desventajas de algunos marcadores moleculares (Witkus et al., 1994; Wolfe, 1998; Esselman, 1999; Pradeep et al., 2002)

	Ventajas	Desventajas
Isoenzimas	<ul style="list-style-type: none"> • Baratas • Muestras grandes en poco tiempo • Comparable con estudios previos • Métodos estadísticos robustos 	<ul style="list-style-type: none"> • Especies monomórficas para muchas enzimas • Arrojan pocos marcadores • Laboriosas • Pueden estar sujetas a selección
Marcadores de ADN		
1. RFLPs	<ul style="list-style-type: none"> • Puede producir suficientes "loci" polimórficos para estudios intra e interpoblacionales • Codominantes • Seguridad en la homología de los "loci" • Útil en el mapeo de QTLs • Métodos estadísticos robustos 	<ul style="list-style-type: none"> • Grandes cantidades de ADN (100 µg) • Caros • Requiere librería genómica • Laboriosos
2. RAPDs	<ul style="list-style-type: none"> • No se requiere la secuencia de la muestra de ADN • Fáciles de hacer • Baratos • Poca cantidad de ADN (ng) • Arrojan un gran número de marcadores • Altos niveles de polimorfismo • Aplicación amplia: identificación de individuos, análisis de paternidad, identificación de cepas, análisis filogenéticos 	<ul style="list-style-type: none"> • Dominantes • Poco reproducibles • Poca especificidad • Homología incierta • Artefactos en los geles • Estimados de H_{esp} y F_{ST} sesgados
3. VNTRs	(Variable Number Tandem Repeats)	
a) Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs)	<ul style="list-style-type: none"> • No se requiere la secuencia de la muestra de ADN • Poca cantidad de ADN (ng) • Arrojan gran número de "loci" polimórfico • No se requiere la secuencia de la 	<ul style="list-style-type: none"> • Dominantes • Homología incierta • Estimados de H_{esp} y F_{ST} sesgados

	<p>muestra de ADN</p> <ul style="list-style-type: none"> • Alta reproducibilidad • Simples, fáciles, rápidos y eficientes • Detección tanto por geles de acrilamida como de agarosa • Uso amplio tanto en especies cultivables y no cultivables 	
b) Minisatélites multilocus	<ul style="list-style-type: none"> • La variación es apropiada para estudios de identificación de individuos y exclusión de paternidad 	<ul style="list-style-type: none"> • Ambigüedad en los alelos
c) Minisatélites "single-locus"	<ul style="list-style-type: none"> • Sirven desde para identificar individuos hasta para análisis poblacionales 	<ul style="list-style-type: none"> • Muy laboriosos
4. AFLPs	<ul style="list-style-type: none"> • No se requiere la secuencia de la muestra de ADN • Arrojan gran número de "loci" polimórfico • Altamente reproducible 	<ul style="list-style-type: none"> • Muy laboriosos • Caros
5. Secuencias	<ul style="list-style-type: none"> • Proporcionan mucha información de una sola región del genoma 	<ul style="list-style-type: none"> • Costoso

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

7. BIBLIOGRAFIA

- Aguirre, X., 2004. Genética de Poblaciones de *Agave cupreata* y *Agave potatorum*: aportaciones para el manejo y conservación de dos especies mezcaleras. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM, México, D.F., 73 p.
- Alvarez, T. y L. González Quintero, 1970. Análisis polínico del contenido gástrico de murciélagos Glossophaginae de México. *Anales de la Escuela de Ciencias Biológicas* 18: 137-165.
- Arizaga, S. y Ezcurra, E., 1995. Insurance against reproductive failure in a semelparous plant: bulbil formation in *Agave macroacantha* flowering stalks. *Oecologia* 101: 329–334.
- Arizaga, S., E. Ezcurra, E. Peters, F. Ramírez de Arellano y E. Vega., 2000a. Pollination ecology of *Agave macroacantha* (Agavaceae) in a Mexican tropical desert. I. Floral biology and pollination mechanisms. *American Journal of Botany* 87 (7): 1004-1010.
- Arizaga, S., E. Ezcurra, E. Peters, F. Ramírez de Arellano y E. Vega., 2000b. Pollination ecology of *Agave macroacantha* (Agavaceae) in a Mexican tropical desert. II. The role of pollinators. *American Journal of Botany* 87(7): 1011-1017.
- Armbruster, W.S., C.B. Fenster y M.R. Dudash, 2000. Pollination “principle” revisited: specialization, pollination syndromes, and the evolution of flowers. *Det Norske Videnskaps-Akademi. I. Matematisk Naturvidenskabelige Klasse, Skrifter, Ny Serie* 39: 179-200.
- Ayres, D.R. y F.J. Ryan, 1999. Genetic diversity and structure of the narrow endemic *Wyethia reticulata* and its congener *W. Bolanderi* (Asteraceae) using RAPD and allozyme techniques. *American Journal of Botany*, 86, 344-353.
- Backman, E.G., 1944. A karyosystematic study of the genus *Agave*. *American Journal of Botany* 31: 283-298.
- Baker, H. G. y Baker, I., 1983. Floral nectar sugar constituents in relation to pollination type. En C. E. Jones y R. J. Little (eds). *Handbook of experimental pollination biology*. Van Nostrand-Reinhold, New York, NY. pp. 117-141.
- Berger, A., 1921. *Die Agaven*. Verlag, Jena.
- Blair, M.W., O. Panaud y S.R. Mc Couch, 1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L). *Theoretical and Applied Genetics* 92: 442-447.

- Bond, W. J., 1994. Do mutualism matter? Assessing the impact of pollinator and disperser disruption on plant extinction. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B* 344: 83-90.
- Bornet, B. y M. Branchard, 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 209-215.
- Buso, G.S.C., P.H. Rancel y M.E. Ferreira, 1998. Análisis of genetic variability of South American wild rice populations (*Orzya glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. *Molecular Ecology* 7, 107-117.
- Cadaval, A., 1999. Estudio evolutivo de los azúcares del néctar de *Agave lechuguilla* en el desierto de Chihuahua. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- Cockerham, C. C., 1969. Variance of gene frequencies. *Evolution* 23: 72-83.
- Cockerham, C. C. y B. S. Weir, 1993. Estimation of gene flow from F-statistics. *Evolution* 47: 855-863.
- Crow, J. F. y K. Aoki, 1984. Group selection for a polygenic behavioral trait: Estimating the degree of population subdivision. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. USA 81: 6073-6077.
- Charlesworth, D. y B. Charlesworth, 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics*. 18: 237-268.
- Doyle, J. J. y J. L. Doyle, 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19: 11-15.
- Eguiarte, L.E. y A. Búrquez, 1987. Reproductive ecology of *Manfreda brachystachya*, an iteroparous species of Agavaceae. *Southwestern Naturalist* 32: 169-178.
- Eguiarte, L. E., 1990. Genética de poblaciones de *Astrocaryum mexicanum* Liebm. en Los Tuxtlas, Ver. Centro de Ecología. México, D.F., UNAM.
- Eguiarte, L. E., 1999. Una Guía para Principiantes a la Genética de Poblaciones. En: J. Núñez Farfán y L. E. Eguiarte (eds.) *La Evolución Biológica*. México, D.F., UNAM: pp: 35-50.
- Eguiarte, L. E., V. Souza 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.
- Eguiarte, L.; X. Aguirre; M. Rocha, C. Torres, A. Silva y A. Valera, 2003. Diversidad genética de dos especies mezcaleras. Proyecto Conabio V038, Informe final.

- Esselman, E. J., L. Jianqiang, D., Crawford, J. Windus y D. Wolfe, 1999. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insoerata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology* 8: 443-451.
- Excoffier, L., P. E. Smouse y J. Quattro, 1992. Analysis of Molecular Variance Inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Excoffier, L., 2001. Analysis of population subdivision. En Balding et al., (eds.) *Handbook of Statistical Genetics*, USA, John Wiley & Sons, Ltd.
- Faegri, K. y L. van der Piel, 1979. *The principles of pollination ecology*. Third edition. Oxford, Pergamon.
- Fang, D. Q. y M. L. Roose, 1997. Identification of closely related citrus cultivars with intersimple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 408-417.
- Feisinger, P., 1983. Coevolution and Pollination En D.J. Futuyma y M. Slatkin (eds.). *Coevolution.*, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. pp. 283-310
- Fisher, R. A., 1954. *Statistical Methods for research workers*. 12th ed. Oliver and Boyd, Edinburgh.
- Fleming, T. H., R. A. Nuñez, y L.L Sternberg, 1993. Seasonal changes in the diets of migrant and non-migrant nectarivorous bats as revealed by carbon stable isotope analysis. *Oecologia* 94: 72-75.
- Freeman, C., W. Reid y J. Becvar, 1983. "Nectar sugar composition in some species of *Agave* (Agavaceae)" *Madroño* 30: 153-158.
- Galván, R. y L. Hernández, 2002. *Agave garciae-mendozae*, a new species from central Mexico. *Cactus and Succulent Journal* 74(4): 188-191.
- García-Mendoza, A., 2002. Distribution of *Agave* (Agavaceae) in Mexico. *Cactus and Succulent Journal* 74(4): 177-187.
- García-Mendoza, A. y R. Galván, 1995. Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 56: 7-24.
- Ge, X. J. y M. Sun, 1999. Reproductive biology and genetic diversity of a cryptoviviparous mangrove *Aegiceras corniculatum* (Myrsinaceae) using allozyme and intersimple sequence repeat (ISSR) analysis. *Molecular Ecology* 8: 2061-2069.
- Gentry, H. S., 1982. *Agaves of continental North America*. Tucson, Arizona, University of Arizona Press.

- Gillespie, J. H., 1998. Population Genetics, A Concise Guide. USA, The Johns Hopkins University Press.
- Gould, S. J. y E. S. Vrba., 1982. Exaptation – a missing term in the science of form. *Paleobiology* 8: 4-15.
- Gómez, J.M., 2002. Generalización en las interacciones entre plantas y polinizadores. *Revista Chilena de Historia Natural* 75: 105-116.
- Gupta, M., Y. Chyi, J. Romero-Severson y J. Owen, 1994. Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers of simple sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 998-1006.
- Hamada, H. y T. Kakunaga, 1982. Potential Z-DNA forming sequences are highly dispersed in the human genome. *Nature* 298: 396-398.
- Hamrick, J. L. y J. W. Godt, 1989. Allozyme diversity in plant species. En: H. D. Brown, M. T. Clegg, A. L. Kahler y B. S. Weir (eds.) Plant population genetics, breeding, and genetic resources. Sunderland, M.A., Sinauer. pp: 43-63.
- Hamrick, J. L., J. W. Godt, S. Sherman-Broyles, 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests* 6: 95-124.
- Hamrick, J. L. y J. W. Godt, 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 351: 1291-1298.
- Harris, H., 1966. Enzyme polymorphisms in man. *Proceedings of The Royal Society of London B*. 164: 298-310.
- Hartl, D. L. y A. G. Clark, 1989. Principles of Population Genetics. Sunderland, Massachusetts, USA, Sinauer Associates, Inc.
- Hartl, D. L. y A. G. Clark, 1997. Principles of Population Genetics, Sinauer Associates, Inc.
- Hedrick, W., 2000. Genetics of Populations. USA, Jones and Bartlett Publishers, Inc.
- Herrera, C. M., 1988. Variation in mutualism: the spatio-temporal mosaic of a pollinator assemblage. *Biological Journal of the Linnean Society* 35: 95-125.
- Herrera, C. M., 1996. Floral traits and plant adaptation to insect pollinators: a devil's advocate approach. En D. G. Lloyd and S. C. H. Barrett (eds.) Floral biology. New York, Chapman and Hall.
- Howell, D. J., 1972. Physiological adaptations in the syndrome of chiropterophily with emphasis on the bat *Leptonycteris lydekker*. Tucson, University of Arizona.

- Howell, D. J., 1974. Bats and pollen physiological aspects of the syndrome of chiropterophily *Comparative and Biochemical Physiology A*. 48: 63-276.
- Howell, D. J., 1979. Flock foraging in nectar-feeding bats. *American Naturalist*. 114 : 23-49.
- Howell, D. J. y B. S. Roth, 1981. Sexual reproduction in agaves: the benefits of bats, the costs of semelparous advertisement. *Ecology* 62: 1-7.
- Irish, M. y G. Irish, 2000. Agaves, Yuccas and Related Plants, a gardener's guide. USA, Timber Press.
- Johnson SD y K.E. Steiner, 2000. Generalization versus specialization in plant pollination systems *Trends in Ecology and Evolution* 15 : 140-143
- Joshi, S.P., V.S., Gupta, R.K. Aggarwal, P.K. Ranjekar y D.S. Brar., 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Orzya*. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 1311-1320.
- Karp, A., P. G. Isaacs, P.G., Isaac y D.S. Ingram, 1998. Molecular Tools for Screening Biodiversity. London, Chapman & Hall, 498 pp.
- Kuban, J. F., 1989. The pollination biology of two populations of the big bang century plant, *Agave havardiana* Trel.: a multiple pollinator syndrome with floral specialization for vertebrate pollinators. Ph.D. dissertation, Syracuse University, Syracuse, New York, USA.
- Kuban, J, J. Lawley y R. Neill., 1983. The partitioning of flowering century plants by Black-chinned and Lucifer Hummingbird. *Southwestern Naturalist* 28 : 143-148.
- Lewontin, R. C. y J. L. Hubby, 1966. A molecular approach to the study of the genetic heterozygosity in natural populations II. Amount of variation and degree of heterozygosity in natural populations of *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics* 54: 595-609.
- Lewontin, R. C., 1974. The analysis of variance and the analysis of causes. *American Journal of Human Genetics*. 26: 400-411.
- Liu, Z. y G. Furnier, 1993. Comparison of allozyme, RFLP, and RADP markers for revealing genetic variation within and between trembling aspens and bigtooth aspens. *Theoretical and Applied Genetics* 87: 97-105.
- Lynch, M. y B. G. Milligan, 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.

- Martínez del Río, C. y L. Eguiarte, 1987. Bird visitation to *Agave salmiana*: comparisons among hummingbirds and perching birds. *Condor* 89: 357-363.
- Martínez-Palacios, A., L. E. Eguiarte y G. Furnier, 1999. Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. *American Journal of Botany* 86(6): 1093-1098.
- Mantel, N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- Massey, L. K. y J. L. Hamrick, 1998. Genetic diversity and Population structure of *Yucca filamentosa* (Agavaceae). *American Journal of Botany* 85(3): 340-345.
- Medellin, R.A., H.T.Arita y O., Sánchez, 1997. Identificación de los murciélagos de México. Clave de campo, Asociación Mexicana de Mastozoología, A.C., Publicaciones Especiales Núm. 2, Instituto de Ecología, UNAM, México, 83 pp
- Miller, M. P., 1997. Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA) 1.3: A windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.
- Molina-Freaner, F. y L. E. Eguiarte, 2003. The pollination biology of two paniculate agaves (Agavaceae) from northwestern Mexico: Contrasting roles of bats as pollinators. *American Journal of Botany* 90(7): 1016-1024.
- Nagaoka, T. y Y. Ogihara, 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 597-602.
- Navarro, A., 1999. Estructura genética y procesos de especiación de *Agave cerulata* (Trel.) y *Agave subsimplex* (Trel.) en el desierto Sonorense a partir de RAPD's. Tesis de licenciatura. Facultad de Ciencias. México, D.F., UNAM: 96.
- Navarro, A., R. González, F. Molina-Freaner y L.E. Eguiarte, (2003). Genetic differentiation in the *Agave deserti* (Agavaceae) complex of the Sonoran desert. *Heredity* 90: 220-227.
- Nei, M., 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist*. 106(84,284): 238-292.
- Nei, M., 1978. The theory of genetic distance and evolution of human races. *Japanese Journal of Human Genetics*. 23: 341-369.
- Nei, M., 1987. Molecular evolutionary genetics. New York, Columbia University Press.
- Nobel, P. S., 1988. Environmental biology of agaves and cacti. Los Angeles, Cambridge University Press.

- Nyblom, H. y I. Bartish, 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD marker in plants *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 3(2): 93-114.
- Ollerton, J., 1996. Reconciling ecological processes with phylogenetic patterns: the apparent paradox of plant-pollinator systems. *Journal of Ecology* 84: 767-769.
- Ornelas, J. F., M. Ordano, A. Hernández, J. C. López, L. Mendoza y Y. Perroni, 2002. Nectar oasis produced by *Agave marmorata* Roehl. (Agavaceae) lead to spatial and temporal segregation among nectarivores in the Tehuacán Valley, México. *Journal of Arid Environments* 52 (1): 37-51.
- Pinkava, J.D. y M.A. Baker, 1985. Chromosome and hybridization studies of Agaves. En: Pinkava, J.D. y H.S. Gentry (eds.). *Desert Plants*, 7(2): 93-100, Special Issue, Symposium on the Genus *Agave*.
- Pradeep, R.M., Sarla, N y Siddiq E.A., 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128 : 9-17.
- Proctor, M. y P. Yeo, 1996. The natural history of pollination. USA, Timber Press.
- Provine, W. B., 1971. The Origins of Theoretical Population Genetics. Chicago, University of Chicago Press.
- Salimath, S., A. De Oliveira, I. Godwin y J. Bennetzen, 1995. Assessment of genome origins and genetic diversity in the genus *Eleusine* with DNA markers. *Genome* 38: 757-763.
- Schaffer, W.M. y M.V. Schaffer, 1977. The reproductive biology of Agavaceae : I. Pollen and nectar production in four Arizona agaves. *Southwestern Naturalist* 22 :157-168.
- Schemske, D. y R. Lande., 1985. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. II. Empirical observations. *Evolution* 39: 1242-1249.
- Schneider S., Roessli D., y Excoffier L., 2000. Arlequin ver. 2.000. A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Silva-Montellano, A., 2001. Ecología reproductiva y genética de poblaciones de *Agave lechuguilla* (Torr.) en un gradiente latitudinal. Instituto de Ecología. México, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Silva-Montellano, A. y L. E. Eguiarte., 2003a. Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. I. Floral characteristics, visitors, and fecundity. *American Journal of Botany* 90 (3) :377-387.

- Silva-Montellano, A. y L. E. Eguiarte., 2003b. 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 (5) :700-706.
- Slatkin, M., 1985. Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution* 39(1): 53-65.
- Slatkin, M., 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science* 263: 787-792.
- Slatkin, M., 1994. Gene Flow and Population Structure en Ecological Genetics. En: L. A. Real (ed.). New Jersey, Princenton University Press: 4-17.
- Slatkin, M. y N. H. Barton, 1989. A comparison of three methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution* 43: 1358-1368.
- Slauson, L. A., 2000. Pollination biology of two chiropterophilous agaves in Arizona. *American Journal of Botany* 87(6): 825-836.
- Slauson, L. A., 2001. Insights on the pollination biology of *Agave* (Agavaceae). *Haseltonia* (8): 10-23.
- Thompson, J. N., 1994. The coevolutionary process. Chicago, The University of Chicago Press.
- Trelease, W., 1920. Agave. P.C. Standley (Ed.) Trees and Shurbs of Mexico Copntr. *U.S. Natl. Herb.* 23(1): 107-142.
- Vos, P., J. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van der Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper y M. Zabeau, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.
- Waser, N. M., M. V. Chittka, V. Price, N. Williams y J. Ollerton, 1996. Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology* 77: 1043-1060.
- Weir, S., 1996. Genetic Data Analysis II. USA, Sinauer Associates, Suderland, Mass.
- Weir, S. y C. Cockerham, 1984. Estimating *F*- Statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38(6), 1358-1370.
- Williams, J. G. K.; A. R., Kubelik, K. J., Livak, J. A. Rafalski, S. V., Tingey, 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers *Nucleic Acids Research* 18: 6231-6235.

- Wolfe, A. D. y A. Liston, 1998. Contributions of PCR-Based methods to Plant Systematics and Evolutionary Biology. En: Soltis, Soltis y Doyle (eds.) *Molecular Systematics of Plants II*, 45-82, Kluwer academic Publishers, USA.
- Wright, S., 1921. Systems of mating. *Genetics* 6: 111-178.
- Wright, S., 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159.
- Wright, S., 1932. The roles of mutation, inbreeding, crossbreeding and selection in evolution *Proceedings of the VI International Congress of Genetics I*: 356-366.
- Wright, S., 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenetics* 15:323-354.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski y D. Labuda, 1994. Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored polymerase chain reactions amplification. *Genomics* 20: 176-183.