



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Ecología

**ECOLOGÍA EVOLUTIVA COMPARADA EN CINCO
ESPECIES DE AGAVE**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

MARTHA GRACIELA ROCHA MUNIVE

DIRECTOR DE TESIS: DR. LUIS ENRIQUE EGUIARTE FRUNS

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2006



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.

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 21 de noviembre del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna **ROCHA MUNIVE MARTHA GRACIELA** con número de cuenta **87263055** y número de expediente **3971266**, con la tesis titulada: **"Ecología evolutiva comparada en cinco especies de Agave"**, bajo la dirección del **Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns**.

Presidente:	Dr. César Domínguez-Pérez Tejada
Vocal:	Dr. Eduardo Morales Guillaumin
Vocal:	Dr. Mark E. Olson Zúñica
Vocal:	Dr. Alberto Enrique Rojas Martínez
Secretario:	Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns
Suplente:	Dra. Patricia Colunga García-Marín
Suplente:	Dr. Carlos Montaña Carubelli

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 9 de noviembre del 2006.

Dr. Juan Nuñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Luis Enrique Eguiarte Fruns.

El comité tutorial estuvo formado por el Dr. Francisco Molina Freaner y el Dr. Eduardo Morales Guillaumin.

El trabajo de campo se realizó en la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán gracias al apoyo de los directivos de la reserva y de la brigada de vigilancia participativa.

El proyecto fue financiado por el Instituto de Ecología de la UNAM, por el Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) Tesis Doctorales, proyecto 201319 y por el proyecto CONACYT-SEMARNAT COI-0246/A-1.

Durante el desarrollo de esta tesis recibí beca de doctorado de CONACYT y de la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP), UNAM, así como del programa de incentivos a la graduación de estudiantes de posgrado del Instituto de Ecología de la UNAM.

El manuscrito fue terminado en el Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental del Instituto Nacional de Ecología.

Índice de Figuras

Figura 1. Mapa de la reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán.....	5
Figura 2. <i>Agave celsii albicans</i>	11
Figura 3. <i>Agave striata</i>	12
Figura 4. <i>Agave difformis</i>	13
Figura 5. <i>Agave xylonacantha</i>	14
Figura 6. <i>Agave hidalguensis</i>	15
Figura 7. Distribución en México de las especies estudiadas.....	24
Figura 8. Localización de las poblaciones usadas para el análisis genético de este estudio	82
Figura 9. Repartición de la variación genética según el análisis de varianza molecular (AMOVA)	95
Figura 10. Dendrogramas de distancia genética para cuatro especies analizadas individualmente	100
Figura 11. Dendrograma de distancias genéticas para las especies del grupo Marginatae	101
Figura 12. Dendrograma de distancia genética para las cinco especies de <i>Agave</i>	102
Figura 13. Prueba de aislamiento por distancia para las cinco especies.....	103

Índice de Tablas

Tabla 1. Especies de <i>Agave</i> que se encuentran en la Barranca de Metztitlán	10
Tabla 2. Biología reproductiva del subgénero <i>Agave</i>	31
Tabla 3. Biología reproductiva del subgénero <i>Littaea</i>	32
Tabla 4. Poblaciones de las cinco especies de <i>Agave</i> analizadas	83
Tabla 5. Número de loci para cada iniciador de ISSR y para las cinco especies de <i>Agave</i>	89
Tabla 6. Loci compartidos entre las cinco especies de agave	89
Tabla 7. Estimadores de diversidad genética para las cinco especies de agaves.....	91
Tabla 8. Estimadores de estructuración genética para las cinco especies de agaves.....	92
Tabla 9. Estimadores de estructuración genética para las cinco especies de agaves dentro de la barranca de Metztitlán	93
Tabla 10. Estimadores de diversidad y de estructura genética para las cinco especies obtenidos con la aproximación bayesiana	97
Tabla 11. Distancias genéticas (Nei, 1978) y geográficas (km) para las poblaciones de <i>A. difformis</i>	98
Tabla 12. Distancias genéticas (Nei, 1978) y geográficas (km) para las poblaciones de <i>A. xylonacantha</i>	98
Tabla 13. Distancias genéticas (Nei, 1978) y geográficas (km) para las poblaciones de <i>A. celsii</i>	99
Tabla 14. Distancias genéticas (Nei, 1978) y geográficas (km) para las poblaciones de <i>A. striata</i>	99
Tabla 15. Distancia genética para las cinco especies de agaves.....	101
Tabla 16. F_{ST} y Nm pareadas para las poblaciones de <i>A. difformis</i>	104
Tabla 17. F_{ST} y Nm pareadas para las poblaciones de <i>A. xylonacantha</i>	104
Tabla 18. F_{ST} y Nm pareadas para las poblaciones de <i>A. celsii</i>	104
Tabla 19. F_{ST} y Nm pareadas para las poblaciones de <i>A. striata</i>	105
Tabla 20. Medidas de diversidad y estructura genética en <i>Agave</i> , en comparación con otras especies y grupos de plantas.....	107
Tabla 21. Análisis de varianza de las frecuencias alélicas en una población subdividida.....	138

Índice

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 La Barranca de Metztitlán y su alta diversidad de agaves	4
1.1.1 LA ZONA DE ESTUDIO	4
1.1.2 DIVERSIDAD DE ESPECIES EN ZONAS ÁRIDAS Y RELEVANCIA DE LOS AGAVES	7
1.1.3 CENTROS DE RIQUEZA Y ENDEMISMO PARA EL GÉNERO <i>AGAVE</i>	8
1.1.4 ESPECIES DE <i>AGAVE</i> PRESENTES EN LA BARRANCA DE METZTITLÁN	9
1.2 ¿Cómo coexisten las especies de <i>Agave</i>? Aspectos ecológicos de la coexistencia de especies simpátricas	16
1.2.1 OBSERVACIONES PREVIAS EN LA COMUNIDAD DE AGAVES DE METZTITLÁN	16
1.2.2 LA TEORÍA DEL NICHOS Y LAS CURVAS DE UTILIZACIÓN DE RECURSOS	17
1.2.3 SOBREPOSICIÓN DEL NICHOS Y REPARTICIÓN DE RECURSOS	18
1.2.4 DESPLAZAMIENTO DE CARACTERES EN LA MORFOLOGÍA.....	20
1.2.5 ENFOQUES ALTERNATIVOS EN EL ESTUDIO DE LA COEXISTENCIA Y LA COMPETENCIA ...	20
1.2.6 COEXISTENCIA Y ESPECIACIÓN SIMPÁTRICA.....	21
1.2.7 PATRONES DE DISTRIBUCIÓN ESPACIAL: NIVELES DE RAREZA.....	22
1.3 Biología reproductiva	25
1.3.1 EVOLUCIÓN EN LOS SISTEMAS DE POLINIZACIÓN.....	25
1.3.2 SÍNDROMES DE POLINIZACIÓN	26
1.3.3 TENDENCIA HACIA LA ESPECIALIZACIÓN	27
1.3.4 RESTRICCIONES A LA ESPECIALIZACIÓN Y TENDENCIAS A LA GENERALIZACIÓN	28
1.3.5 SISTEMAS DE POLINIZACIÓN EN AGAVES	29
1.4 Genética de poblaciones	33
1.4.1 LA DIVERSIDAD GENÉTICA Y LOS MECANISMOS DE LA EVOLUCIÓN	33
1.4.2 MÉTODOS ACTUALES PARA ESTIMAR LA DIVERSIDAD GENÉTICA	34
1.4.3 ESTRUCTURACIÓN DE LA VARIACIÓN.....	35
1.4.4 ANÁLISIS GENÉTICOS USANDO EL CRITERIO DE RAREZA	38
1.4.5 GENÉTICA DE LA CONSERVACIÓN	41
1.5 Objetivos.....	43

CAPÍTULO 2. LA BIOLOGÍA REPRODUCTIVA Y LA RADIACIÓN ADAPTATIVA EN LA FAMILIA AGAVACEAE	45
2.1. Resumen	46
2.2 Biología de la polinización y radiación adaptativa de la Familia Agavaceae, con especial énfasis en el género <i>Agave</i>	46
 CAPÍTULO 3. BIOLOGÍA REPRODUCTIVA EN LA COMUNIDAD DE AGAVES DE LA BARRANCA DE METZTITLÁN	61
3.1 Resumen.....	62
3.2 Ecología reproductiva de cinco especies simpátricas de <i>Agave Littaea</i> (Agavaceae) en el centro de México	62
 CAPÍTULO 4. GENÉTICA DE POBLACIONES EN CINCO ESPECIES DE AGAVE (<i>LITTAEA</i>): PATRONES DE VARIACIÓN Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA	75
4.1 Antecedentes	76
4.1.1 ESTUDIOS PREVIOS DE GENÉTICA DE POBLACIONES EN EL GÉNERO <i>AGAVE</i>	76
4.1.2 ANÁLISIS DE GENÉTICA DE POBLACIONES USANDO LOS MARCADORES ISSR.....	78
4.2 Metodología	80
4.2.1 OBTENCIÓN DE MUESTRAS	80
4.2.2 EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN DE ISSRS.....	84
4.2.3 ANÁLISIS DE DATOS	85
4.3 Resultados.....	88
4.3.1 AMPLIFICACIÓN DE ISSRS	88
4.3.2 DIVERSIDAD GENÉTICA DENTRO DE LAS POBLACIONES	89
4.3.3 DIVERSIDAD GENÉTICA ENTRE POBLACIONES	92
4.3.4 DISTANCIA GENÉTICA ENTRE POBLACIONES Y PRUEBA DE MANTEL.....	97
4.3.5 DIFERENCIACIÓN GENÉTICA ENTRE POBLACIONES Y FLUJO GÉNICO	103
4.4 Discusión	105
4.4.1 NIVELES DE DIVERSIDAD GENÉTICA DENTRO DE LAS POBLACIONES	105
4.4.2 DISTRIBUCIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA ENTRE POBLACIONES	108
4.4.3 DISTANCIA GENÉTICA Y ANÁLISIS DE AISLAMIENTO POR DISTANCIA.....	110
4.4.4 FLUJO GÉNICO.....	111

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN GENERAL	113
5.1 Diversidad de agaves y su coexistencia en la Barranca de Metztitlán.....	114
5.1.1 COEXISTENCIA DE LOS AGAVES EN LA BARRANCA DE METZTITLÁN	114
5.1.2 DESPLAZAMIENTO DE CARACTERES.....	115
5.1.3 CONVERGENCIA DE ESPECIES EN LA BARRANCA DE METZTITLÁN VS. ESPECIACIÓN SIMPÁTRICA	116
5.2 Biología reproductiva	117
5.2.1 SISTEMAS DE POLINIZACIÓN EN LOS AGAVES DE METZTITLÁN	117
5.2.2 VISITANTES FLORALES	118
5.2.3 EVOLUCIÓN DE LA SEMELPARIDAD	119
5.3 Genética de poblaciones	119
5.3.1 SOBRE LOS MARCADORES MOLECULARES ISSRS	120
5.3.3 GENÉTICA DE LA CONSERVACIÓN	121
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	123
6.1 Conclusiones	124
6.2 Perspectivas	126
APÉNDICE 1. PROTOCOLOS DE OBTENCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN DE ISSRS.....	127
APÉNDICE 2. MÉTODOS DE ANÁLISIS GENÉTICO	132
APÉNDICE 3. INFORMACIÓN ESTADÍSTICA ADICIONAL DE LOS DATOS GENÉTICOS	143
LITERATURA CITADA	144

RESUMEN

En este trabajo se estudió la biología reproductiva y la genética de poblaciones de cinco especies de *Agave* que coexisten en la Barranca de Metztitlán, Hidalgo, en la zona de más alta diversidad para el subgénero *Littaea*. Las especies estudiadas fueron: *A. celsii*, *A. striata*, *A. difformis*, *A. xylonacantha* y *A. hidalguensis*. Por primera vez se reporta la presencia de murciélagos visitando especies del subgénero *Littaea* y se encontró que son los principales polinizadores en cuatro de las cinco especies. Se encontraron evidencias de presiones de selección hacia la semelparidad, debido a que los polinizadores están seleccionando las inflorescencias de mayor altura en tres de las cinco especies. En la comunidad estudiada se observó complementariedad fenológica, porque los periodos de floración de las especies se distribuyen a lo largo de todo el año. Se encontraron también evidencias de desplazamiento de caracteres y separación espacial y temporal en el uso de recursos (polinizadores) entre las especies.

En el análisis genético se encontraron en las cinco especies niveles de variación altos y de estructuración bajos. Los sistemas reproductivos mostraron tener una fuerte repercusión en la manera en que se estructura la diversidad genética: las especies predominantemente polinizadas por murciélagos presentan una diferenciación genética menor y un mayor flujo génico. Los niveles de diversidad fueron mayores para las especies de ciclo de vida corto que para las más longevas. Se demostró la utilidad en el uso de los marcadores ISSR (“inter simple sequence repeats”) al analizarlos con métodos estadísticos robustos implementados recientemente.

Este trabajo representa el inicio del entendimiento de la ecología de las especies más representativas de la Barranca de Metztitlán y se proponen las líneas de estudio más importantes para entender diversos aspectos ecológicos y evolutivos de la comunidad, como son la coexistencia de las especies, el papel de la especiación en esta zona y los patrones de microevolución de las especies analizadas.

ABSTRACT

In this work we studied the reproductive biology and population genetics of five coexisting species of *Agave* in the Metztitlan Canyon, located in the state of Hidalgo, in the region of the highest species diversity for the studied species were: *A. celsii*, *A. striata*, *A. difformis*, *A. xylonacantha* and *A. hidalguensis*. For the first time we reported bats visiting species belonging to the subgenus *Littaea* and we found that bats are the most important pollinators in four of the five species. We also found evidence of selection pressures toward semelparity because pollinators are selecting for taller inflorescences in three of the five species. There is phenological complementarity in this community because the flowering periods of the five species span the entire year. We found evidence for character displacement in rosette sizes and separation of spatial and temporal resource use in pollinator composition among species.

In the genetic analysis we found in all the species high levels of genetic variation and low genetic structure. Reproductive systems seem to have an impact on the way that genetic diversity is structured: species pollinated predominantly by bats show a lower genetic differentiation and a higher gene flow. Levels of genetic diversity were higher for short lived species. We demonstrated the utility of ISSRs (“inter simple sequence repeats”) markers and the implementation of new statistical analyses.

With this work we start a comprehensive study of the ecology of the more representative *Agave* species in the Metztitlan canyon, and we propose future studies to understand ecological and evolutionary aspects of the community, such as species coexistence, the role of speciation in this region and microevolutionary patterns for the analyzed species.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

En este primer capítulo se presenta una justificación para haber realizado la presente investigación dentro de la reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán. La comunidad de agaves de Metztitlán es de alta importancia por su diversidad, pues tiene el segundo lugar a nivel nacional en el número de especies para el género *Agave* y el primero para el subgénero *Littaea*. Este sitio resulta ser un modelo ideal para estudiar fenómenos ecológicos importantes para el género *Agave* como la coexistencia de especies simpátricas, la biología reproductiva y la genética de poblaciones.

1.1 La Barranca de Metztitlán y su alta diversidad de agaves

1.1.1 La zona de estudio

La Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán se encuentra ubicada en el centro-este del estado de Hidalgo, entre la Sierra de Pachuca y la Sierra de Zacualtipán, comprende los municipios de Acatlán, Atotonilco el Grande, Eloxochitlán, Huasca de Ocampo, Metepec, Metztitlán, San Agustín Metzquititlán y Zacualtipán de Ángeles (Sánchez-Mejorada, 1978) (Figura 1). Presenta una extensión de 96,042.94 hectáreas y una elevación que va desde los 1000 hasta los 2000 msnm. Esta región forma parte del desierto queretano-hidalgense y es considerada como refugio del Pleistoceno de la biota desértica mexicana, por la afinidad que muestra con el desierto de Chihuahua y Sonora, como resultado de la relación que existió con éstos en el Oligoceno y Mioceno (Axelrod, 1983). Actualmente funciona como corredor biológico de las zonas áridas en el Altiplano Central del país (Briones, 1994; Challenger, 1998) y también muestra gran afinidad con la región de Tehuacán-Cuicatlán.

La Barranca de Metztitlán es una fuerte depresión formada por la cuenca endorreica Río Moctezuma y está ubicada dentro de la región hidrológica número 26 del río Pánuco. Esta cuenca tiene como corriente principal el río Moctezuma; uno de los afluentes de esta corriente es el río Metztitlán, que se origina en Puebla y llega hasta la laguna de Metztitlán. El clima es seco y semiseco cálido, debido a un régimen de sólo unos pocos meses de lluvia y sequía que dura la mayor parte del año determinado por el efecto de sombra de lluvia que ejerce la Sierra Madre Oriental. Ésta junto con la Sierra de Pachuca actúan como barrera orográfica, los vientos descargan la humedad en las laderas norte y este de las mismas, y los escurrimientos descienden a San Luis Potosí, Veracruz y Puebla, ocasionando que en la mayor parte del estado de Hidalgo las lluvias sean escasas (Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática, <http://mapserver.inegi.gob.mx/geografia/espanol/estados/hgo/rh.cfm>).

Existen dos tipos principales de clima dentro de la barranca de acuerdo a la clasificación de García (1973), en la zona norte y en la norte-centro predomina el clima seco semicálido con régimen de lluvias en verano (BS0hw), en esta región la temperatura media anual es de 18.5° C

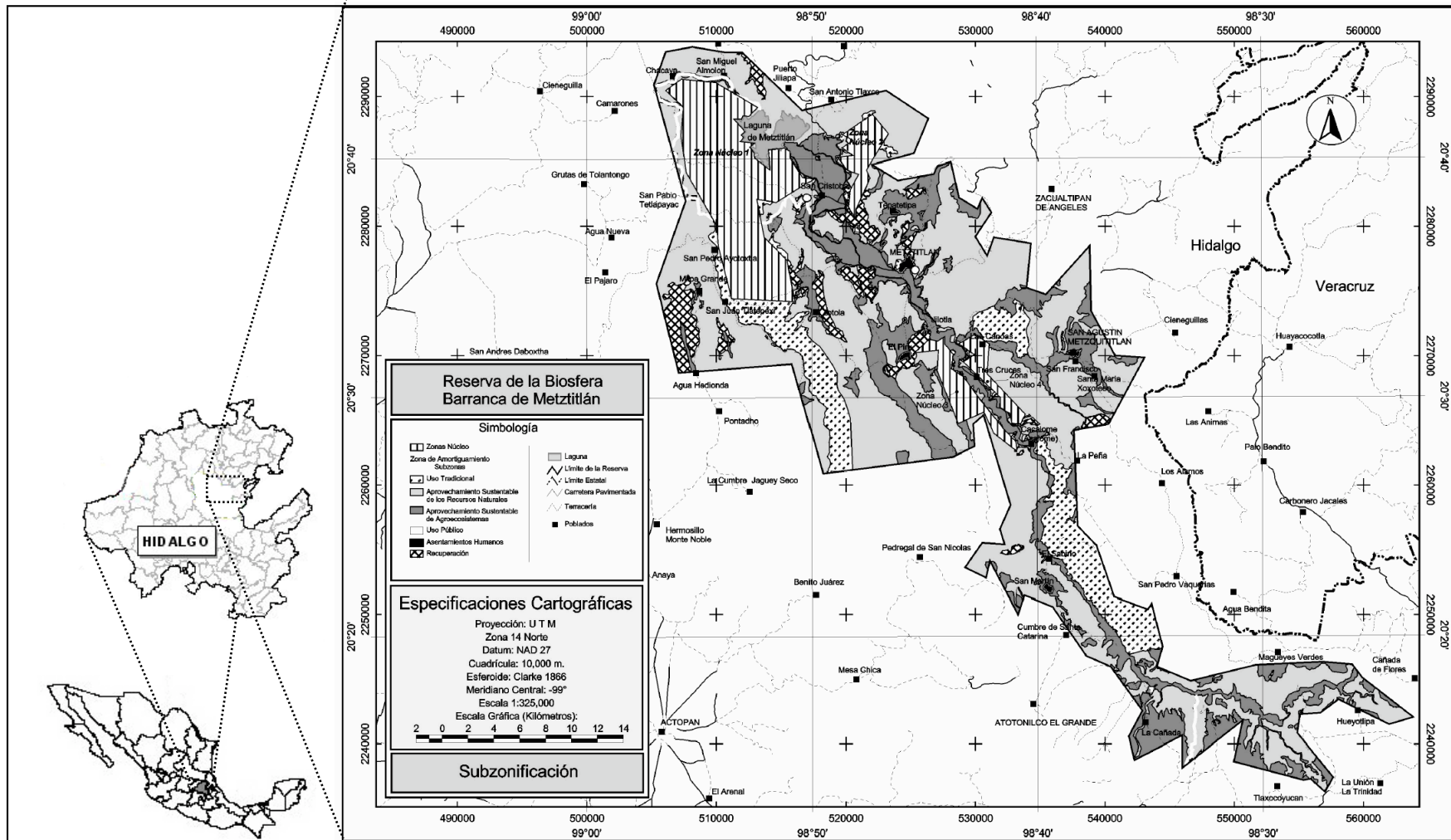


Figura 1. Mapa de la reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán.

Tomado de CONANP (2003)

(la temperatura máxima ocurre en julio y es de 24.7° C y la mínima en enero con 8.3° C), la precipitación total anual es de 364.6 mm (con una máxima en junio de 66.3 mm y la mínima en febrero de 3.3). En la parte centro-sur y sur, predominan el clima semiseco templado con lluvias en verano (BS1kw), la temperatura media anual es de 14.8° C (máxima en mayo de 17.3° C y mínima en noviembre de 9.4° C). La precipitación total anual es de 543.4 mm, con una máxima en septiembre de 117.4 mm y una mínima en enero de 8.8 mm (Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, 2003; INEGI, 1992; <http://mapserver.inegi.gob.mx/geografia/espanol/estados/hgo/clim.cfm>).

La región se encuentra dentro de la provincia fisiográfica Sierra Madre Oriental, en la subprovincia Carso Huasteco. Los diferentes tipos de suelos presentes en esta zona tienen alto contenido de carbonatos, derivados de calizas por la acción de la precipitación y la temperatura. Dentro de la Barranca se encuentra también una zonificación geológica: la zona del río Venados, que está comprendida entre Metztlán y la Laguna de Metztlán, presenta principalmente aluviones; cerca de Metztlán y hacia el norte existen rocas sedimentarias y sedimentario volcánicas, principalmente calizas; al noreste de la laguna, hay una zona con rocas ígneas extrusivas y en la zona sur de la reserva, predominan los basaltos (INEGI, 1992). Los tipos de suelo varían también de acuerdo a la zona dentro de la Barranca (ver INEGI, 2002).

Sánchez-Mejorada (1978) utilizando la clasificación de Rzedowski (1968), reconoce para esta zona los siguientes tipos de vegetación: matorral submontano, matorral cactus-mezquite, matorral desértico calcícola, mezquital extradesértico y matorral desértico aluvial. Por su parte, González e Hiriart (1978) reconocieron siete tipos de vegetación: bosque de aciculifolios (pinar), bosque mixto de aciculi-coriacifolios (pino-encino), bosque bajo de escuamifolios (con *Juniperus*), matorral alto espinoso con crasicuales, matorral alto subinerme, pastizal y selva baja caducifolia.

La flora de la Reserva de la Biosfera Barranca de Metztlán pertenece en su mayoría a la provincia florística denominada altiplanicie por Rzedowski (1994), y una de sus características notables es la presencia de plantas endémicas, así mismo, predomina la vegetación de matorral submontano y matorral xerófilo. Una pequeña parte de la Reserva, cuya altitud es superior a los 2000 msnm, pertenece a la provincia florística Sierra Madre Oriental, donde la vegetación está conformada principalmente por bosque de pino-encino y bosque de encino.

La lista preliminar de especies de plantas comprende 465 taxa pertenecientes a 270 géneros y 83 familias. Dentro de las dicotiledóneas existen en la reserva 71 familias, 221 géneros y 392 especies, entre las familias más representadas se encuentran las siguientes: Asteraceae (44 géneros y 70 especies), Cactaceae (17 géneros y 57 especies) y Leguminosae (22 géneros y 42 especies; Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, 2003).

Esta es una zona de gran diversidad en plantas suculentas y resaltan las agrupaciones de las cactáceas de los géneros: *Opuntia*, *Cephalocereus*, *Stenocereus*, *Myrtillocactus*, *Ferocactus*, *Echinocactus* y *Mammillaria*, además del matorral espinoso formado por plantas de los géneros *Prosopis*, *Acacia*, *Mimosa* y *Fouquieria*, así como los izotales de *Yucca*, *Agave*, *Hechtia* y *Dasyilirion* (Sánchez-Mejorada, 1978; Rzedowski, 1994).

1.1.2 Diversidad de especies en zonas áridas y relevancia de los agaves

Las zonas ecológicas árida y semiárida son las más extensas de nuestro país, debido a que ocupan la mitad del territorio mexicano. Estas zonas se caracterizan por presentar una menor productividad y diversidad florística que otras zonas como las selvas y bosques, sin embargo son centros muy importantes de endemismos (Challenger, 1998). Las zonas áridas tienen una baja productividad y densidad vegetal, a lo que se debe su naturaleza abierta, misma que se refleja en que su diversidad biológica (en cuanto a número de especies por unidad de área) es inferior a la de la mayoría de otras zonas ecológicas en México. Sin embargo, las diferentes provincias florísticas de las zonas áridas y semiáridas tienen sus propios taxa, de tal forma que la diversidad total de la flora se ha calculado en 6000 especies (Challenger, 1998). De esta manera, la zona árida se ubica junto con la selva sub-húmeda en el segundo lugar en diversidad de especies de las zonas ecológicas del país, después del bosque de pino-encino, en que se calculan alrededor de 7000 especies (Rzedowski, 1991). Además del alto grado de endemismo, en las zonas áridas de México se ha reportado especiación explosiva en varias familias como Cactaceae, Poaceae y Asteraceae (Toledo y Ordóñez, 1993) y más recientemente en Agavaceae (ver capítulo 2 en este trabajo), esto se debe a las muchas especies neo-endémicas que se formaron como

respuesta a la expansión de su hábitat y las modificaciones ocasionadas por procesos ecológicos durante la formación de los desiertos mexicanos (Briones, 1994).

En los estados de Querétaro, Guanajuato e Hidalgo, la vegetación se relaciona estrechamente con el resto del desierto de Chihuahua (dentro de la provincia florística del altiplano). En particular, el desierto queretano-hidalguense se distingue por su alto grado de endemismo de especies, donde destaca la flora de la parte árida de Hidalgo, por ser más rica en especies endémicas que la de Querétaro (Challenger, 1998).

Un tipo importante de matorral xerófilo dominado por plantas suculentas está formado por especies que crecen en forma de roseta y Rzedowski (1994) lo llama matorral rosetófilo, mientras que Miranda y Hernández X (1963) lo denominan matorral crasirosulifolio espinoso. Estas comunidades predominan en las laderas de los cerros, donde se desarrollan en suelos ricos en carbonato de calcio, están dominadas por *Agave*, *Hechtia* y *Dasyilirion*, en estas comunidades también es común encontrar arbustos mayores como las yucas en cuyo caso se le denomina a la comunidad izotal.

1.1.3 Centros de riqueza y endemismo para el género *Agave*

Aunque los agaves se distribuyen desde el nivel del mar hasta los 3400 msnm, la mayor parte de las especies se encuentran entre los 1000 y 2000 msnm; el número de especies aumenta a ésta altura y hacia el centro del país. Los agaves son comunes en cañadas y márgenes escarpadas de ríos expuestas a la luz del sol; en general, las zonas con mayor diversidad de especies son las cuencas, en donde los agaves crecen de manera abundante en sus laderas (García-Mendoza, com. pers.). El subgénero *Agave* (*Agave*) se distribuye ampliamente desde Utah en estados Unidos hasta Colombia, incluyendo Centroamérica y las Antillas, y constituye un grupo con ecología muy amplia, mientras que el subgénero *Littaea* tiene una distribución mas restringida, desde Arizona hasta Guatemala, pero sin incluir Baja California (Gentry, 1982; Alvarez de Zayas, 1989; Eguiarte et al., 2000; García-Mendoza, 2002).

Los principales ambientes en donde se encuentran los agaves son el desierto o chaparral, el bosque de pino-encino y el bosque tropical deciduo. En México, la aproximación que se ha empleado para conocer la riqueza del género ha sido la propuesta

de García-Mendoza (1995), en la cual el país se divide en cuadros de un grado de longitud por un grado de latitud, y se cuenta el número de especies por cuadro. La región más rica en el número de especies y endemismos es el Valle de Tehuacán-Cuicatlán en el área centro-sur del país, con 15 especies de las cuales 8 son endémicas. El segundo lugar que menciona García-Mendoza se encuentra en la Sierra Madre Oriental, en donde en un cuadro existen 9 especies y 8 en otro, y en tercer lugar en el desierto de Chihuahua, con 9 especies en dos cuadros y 6 en otro (García-Mendoza, 1995; Tambutti, 2002). Si se toman en cuenta los valores mostrados en este trabajo, la Barranca de Metztitlán quedaría en segundo lugar de número de especies a nivel nacional con 11 (de las cuales las que se han identificado 9 y se listan en la Tabla 1). De manera particular, para el subgénero *Littaea*, García-Mendoza (1995) reconoce que el cuadro con mayor número de especies es la zona de Tehuacán con 6 especies, según esta información, para este subgénero la Barranca de Metztitlán se convierte en el primer lugar en número de especies con 8 (11.9% del total de especies de este subgénero en nuestro país).

La riqueza de 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 del género como la plasticidad genética, la tolerancia ecológica, la capacidad de dispersión, la germinación de sus semillas y las interacciones bióticas con otros organismos como los polinizadores (García-Mendoza, 2002).

1.1.4 Especies de *Agave* presentes en la Barranca de Metztitlán

En la Reserva de Metztitlán se reconocen actualmente 9 especies de *Agave* y dentro de ellas se incluye a *A. salmiana*, una especie cultivada que en algunas zonas puede tener individuos ferales (Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas, 2003). La primera revisión de las especies presentes en esta región fue realizada por Sánchez-Mejorada (1978) quien reconoció 10 especies, este autor además menciona a *A. americana* y a *A. macroacantha* (ésta última en realidad es endémica de Tehuacán y no se ha reportado nuevamente en estado silvestre en la zona). De manera que los listados originales describen de 8 a 10 especies, pero incluyen a las especies cultivadas.

Durante el desarrollo de este trabajo hemos identificado 9 especies silvestres de agaves además de otras dos especies que no han sido identificadas. En la tabla 1 se enlistan las primeras, así como a los grupos a los que pertenecen de acuerdo con la clasificación de Gentry (1982).

Tabla 1. Especies de *Agave* que se encuentran en la Barranca de Metztitlán

<i>Especie</i>	<i>Subgénero</i>	<i>Grupo</i>
<i>A. filifera</i>	<i>Littaea</i>	Filiferae
<i>A. celsii albicans</i> *	<i>Littaea</i>	Polycephalae
<i>A. striata</i> *	<i>Littaea</i>	Striatae
<i>A. difformis</i> *	<i>Littaea</i>	Marginatae
<i>A. lechuguilla</i>	<i>Littaea</i>	Marginatae
<i>A. xylonacantha</i> *	<i>Littaea</i>	Marginatae
<i>A. hidalguensis</i> *	<i>Littaea</i>	Marginatae
<i>A. garciae-mendozae</i>	<i>Littaea</i>	Marginatae
<i>A. applanatta</i>	<i>Agave</i>	Ditepalae

*Especies analizadas en este trabajo

En este trabajo se decidió hacer un análisis comparativo de cinco de las especies, que pertenecen a los grupos Polycephalae, Striatae y Marginatae. Las especies analizadas y su descripción (Gentry, 1982) se exponen a continuación:

a) *A. celsii* Hook. var. *albicans* (Jacobi): La especie *A. celsii* muestra una forma en roseta mediana (de 70 a 120 cm de diámetro) con hojas suculentas con ramificación axilar que invariablemente va formando grandes agregados que llegan a incluir alrededor de 25 rosetas. Las hojas son de color verde intenso y miden de 30 a 60 cm de largo y de 7 a 13 cm de ancho, son oblongas, ovaladas o espatuladas, su margen es liso u ondulado con dientes pequeños y separados entre sí, los dientes son bicúspides y a veces presentan crestas ciliadas. En el ápice de las hojas, se presentan espinas más bien débiles, aciculares, de 1 a 2 cm de largo. Las inflorescencias son típicas del subgénero *Littaea*, en forma de espigas y miden de 1.5 a 2.5 m de largo conteniendo de 100 a 150 flores, y se encuentran densamente bracteadas. La subespecie *A. celsii albicans* a diferencia de *A. celsii* presenta hojas glaucas

y pálidas, en sus flores los tépalos son más largos (en promedio 8 mm más largos que los de *A. celsii*).

Las únicas colonias silvestres que se conocen de esta subespecie, son las que se encuentran en la Barranca de Metztitlán, aunque en diferentes partes del mundo se les cultiva como planta de ornato.



Figura 2. *Agave celsii albicans*

b) *A. striata* Zucc. Esta especie, presenta rosetas de 40 a 80 cm de diámetro, que con la edad se van ramificando hasta formar conglomerados de varias rosetas, en ocasiones pueden formar un tallo corto. Las hojas son muy numerosas y en forma de láminas foliares muy aguzadas de color verde-grisáceo, de base triangular y llegan a medir hasta 45 cm de largo, en la superficie está provista de costillas que se encuentran separadas por surcos blanquecinos y cada hoja muestra una espina muy delgada que mide de 10 a 18 mm de largo. Su inflorescencia regularmente mide de 3 a 4 m de altura, está provista de escamas lineares y las flores son angostas y en comparación de otras especies, no son muy numerosas. El perianto es pequeño (25 a 30 mm de longitud) (Figura 3).



Figura 3. *Agave striata*

c) *A. difformis* Berger: Son plantas vigorosas, subacaulescentes con rosetas abiertas. Su roseta es estolonífera y los estolones escasos. Las hojas pueden medir hasta 80 cm de largo y hasta 6 cm de ancho. El caracter que más distingue a esta especie son las hojas ensiformes largas polimórficas, es decir, pueden ser tanto rectas como sinuosas, regularmente presentan una coloración que va desde verde hasta amarillo-verdoso y su margen es de color gris claro con dientes de forma y tamaño variable, generalmente miden de 5 a 10 mm de largo y se separan de 2 a 3 cm, pueden ser café oscuro o grises, en ocasiones son dobles y pueden también existir dientes intersticiales pequeños, o estar reducidos o incluso completamente ausentes. Esta especie se distribuye principalmente en suelos limosos y rocosos del lado desértico de la sierra Madre Oriental en San Luis Potosí e Hidalgo, en elevaciones entre 1560 y 1875 msnm (Figura 4).



Figura 4. *Agave difformis*

d) *A. xylonacantha* Salm. Esta especie es muy común en la Barranca de Metztitlán, presenta una rosetas abierta que puede medir hasta 1.3 m de diámetro. Las hojas son muy rígidas extendidas, sueltas y contrahechas, de 45 a 90 cm de largo por 5 a 10 cm de ancho, son muy irregulares, más anchas al centro, largas y acuminadas, pueden ser planas o cóncavas en el haz y redondas en el envés, de color verde grisáceo a pálido, en ocasiones pueden presentar una banda clara al centro. Los dientes son muy irregulares y confluentes, aplanados, frecuentemente tri- y penta-cúspides, se separan por una distancia de entre 2 a 5 cm, y llegan a medir hasta 15 mm de largo, son de color gris claro. Su inflorescencia espigada alcanza alturas de 3 a 6 m de largo, las brácteas son pedunculadas y muy angostas, sus flores se agrupan en pares o triadas, y miden de 40 a 50 mm de largo, la coloración va desde verde hasta amarillo pálido, con filamentos a veces rojos o púrpura, el ovario mide de 20 a 27 mm de largo y es fusiforme (Figura 5).



Figura 5. *Agave xylonacantha*

e) *A. hidalguensis*. Esta especie se encuentra distribuida en los lugares mas húmedos y cálidos de la Barranca es la de mayor talla del subgénero. Su roseta semiabierta llega a medir hasta 2.5 m de diámetro. Sus hojas son rectas y planas en el haz, que regularmente miden entre 70 a 90 cm de largo por 5 a 12 cm de ancho, su color verde es muy vivaz y presentan una franja clara al centro, el margen es dentado pudiendo variar en forma y tamaño y por lo general los dientes son de color rojizo a café. En el ápice de cada hoja se presenta una espina rígida de color oscuro que mide de 5 a 7 cm de largo. Distintivo de la especie es su enorme inflorescencia que puede alcanzar hasta 7 m de altura, sus brácteas pedunculadas son delgadas y separadas, a lo largo del escapo se distribuyen cientos de pares o triadas de flores tubulares de color amarillo con variantes en el color de los filamentos que pueden ir desde amarillo hasta marrón.



Figura 6. *Agave hidalguensis*

1.2 ¿Cómo coexisten las especies de *Agave*? Aspectos ecológicos de la coexistencia de especies simpátricas

1.2.1 Observaciones previas en la comunidad de agaves de Metztitlán

Como se ha mencionado, en la Barranca de Metztitlán se encuentran coexistiendo varias especies de *Agave* pertenecientes tanto al subgénero *Agave* como al subgénero *Littaea* (Sánchez-Mejorada, 1978; Gentry, 1982). En las primeras descripciones de la comunidad de agaves de la Barranca de Metztitlán se propone una distribución espacial diferencial de las especies en ciertos microhábitats o tipos de suelo y pendientes.

Según la descripción de Sánchez-Mejorada (1978) y las observaciones en la zona, los ambientes en los que se encuentran los agaves de la Barranca de Metztitlán son:

a) *A. celsii albicans*: Se presenta preferentemente en los cantiles de roca caliza, en ambientes con alta humedad. Altitudinalmente ocupan la parte baja y media de los acantilados donde el acceso es difícil para herbívoros. En algunas zonas se le encuentra asociado o aledaño a poblaciones de *A. xylonacantha*.

b) *A. striata*: Es muy abundante en la localidad, en particular en la zona centro de la Barranca, predomina en suelos calizos, calcitas o conglomerados calcáreos y en lutitas. Crece en lomeríos o faldas de cerros dispuestos a una alta radiación solar y se distribuyen en todo el rango altitudinal.

c) *A. difformis*: Especie cosmopolita con preferencia de suelos basálticos. Es muy abundante en las faldas de cordilleras donde forma densas poblaciones pero es frecuente observarla en la mitad superior de las laderas y en ocasiones hasta en las partes altas de la Barranca.

d) *A. xylonacantha*: Especie típica del paisaje al sur y centro de la Barranca, en la parte baja y media de laderas de esquistos y conglomerados de calizas. Forma grandes colonias en los suelos rocosos y secos de las cordilleras donde la radiación solar es intensa y difícilmente se le encuentra en suelos abiertos o en las partes altas de la Barranca.

e) *A. hidalguensis*: Esta especie es poco abundante en la Barranca, se localiza principalmente en cañadas al Norte y Noreste en las faldas y lomeríos húmedos, con suelos limosos ricos en material orgánico en un lecho de roca calcárea. Regularmente se encuentran grandes poblaciones en las partes medias y altas.

Estas primeras observaciones hacen pensar en una segregación espacial importante entre las especies, aunque teóricamente pueden existir otras explicaciones ecológicas para la coexistencia, las cuales se describirán a continuación.

1.2.2 La teoría del nicho y las curvas de utilización de recursos

Según plantea el propio Darwin en el origen de las especies, la lucha por la existencia es más severa en especies del mismo género debido a que tienen requerimientos ecológicos similares (Darwin, 1859). Una característica peculiar de la zona de estudio, es que existen varias especies pertenecientes al género *Agave* y la mayoría de éstas pertenecen al subgénero *Littaea*, incluso varias de ellas pertenecen al mismo grupo (grupo *Marginatae*, *sensu* Gentry, 1982); por lo tanto, se puede esperar que estas especies compartan requerimientos de recursos y que exista competencia entre ellas.

Para conocer el grado de similitud que puede existir en los requerimientos de las especies, es necesario retomar la teoría del nicho, del desplazamiento de caracteres y de los patrones de utilización de recursos.

El término nicho es usado para expresar la relación de los individuos o poblaciones con todos los posibles factores del medio ambiente (es decir, su papel ecológico dentro de la comunidad) (Ricklefs y Miller, 2000). La definición más utilizada a la fecha es la del hipervolumen multidimensional de Hutchinson (1957), que toma en cuenta todas las posibles condiciones (n dimensiones) que permiten que a largo plazo, las poblaciones de una especie puedan mantener una tasa reproductiva neta promedio ≥ 1 (Silvertown, 2004). Usando esta definición, se puede describir el rango de actividad de cualquier especie para cada dimensión del medio. Las dimensiones del nicho pueden ser todos los factores bióticos y abióticos como temperatura, humedad, intensidad de luz, salinidad, nutrientes, etc.

Como en la práctica el establecer el hipervolumen para cada especie ha sido muy difícil, la aproximación más pragmática ha sido analizar de manera conjunta las diferentes curvas de utilización de recursos. Las curvas de utilización de recursos son una medida alternativa de la amplitud del nicho y se representan usando la distribución de frecuencia a lo largo de un eje del recurso (Begon et al., 1996). Estas curvas de utilización tienen una importancia

práctica, porque se pueden comparar las curvas de diferentes especies que coexisten y por lo tanto predecir el grado de similitud en el uso de los recursos (Tokeshi, 1999).

1.2.3 Sobreposición del nicho y repartición de recursos

Los nichos se pueden sobreponer cuando dos especies presentan curvas de utilización de recursos similares, pero existen para cada especie tantas curvas como dimensiones del nicho y existen evidencias de que los nichos se superponen sólo parcialmente y no en su totalidad. La superposición de alguno o algunos de los ejes no necesariamente tiene un efecto importante en la coexistencia entre especies, debido a que la competencia puede actuar sólo sobre alguno de los ejes. A la fecha, las medidas de sobreposición del nicho son empleadas para predecir la intensidad de la competencia entre las especies por un recurso (Schoener, 1986).

La pregunta que surge entonces es ¿cómo determinar que ejes resultan importantes para medir la intensidad de la competencia entre especies que coexisten? Es muy importante incluir aspectos reproductivos en la definición de los ejes, porque el aislamiento reproductivo puede ser una consecuencia de la separación del nicho. Al haber sobreposición en alguna dimensión del nicho, la forma multidimensional de éste puede cambiar, y dos especies originadas de un ancestro, por separación geográfica y selección sexual pueden sobreponerse al estar en simpatria, en todas las dimensiones del nicho menos en el eje reproductivo (Pianka, 1975). En este caso, la coexistencia dependerá de si las dos especies están cerca de la capacidad de carga total o si compiten a una escala local. Pianka (1975) propone que la superposición del nicho está inversamente relacionada con la densidad de las especies, porque si se analizan los ejes del nicho cuando hay muchas especies, hay mas pares de especies que no interactúan.

En la teoría del nicho se ha acuñado el término de “similitud limitante” para referirse a la cercanía en requerimientos que pueden mantener dos especies en términos de la superposición del nicho, es decir, el grado de similitud en el uso del recurso y que les permita mantener la coexistencia (Abrams, 1983). Cuando las especies son muy similares y coexisten en un eje, se diferencian substancialmente en el uso de otros ejes, lo que se conoce como complementariedad del nicho.

La sobreposición del nicho puede ocurrir porque la diversificación a partir de un ancestro común ha conllevado a la diferenciación del nicho con respecto a caracteres diferentes al uso de recursos, mientras que por otro lado, las restricciones filogenéticas hacen que haya un uso similar del recurso por procesos de optimización ecológica o evolutiva (Tokeshi, 1999).

Se ha observado que como resultado de este uso común de los recursos, éstos son repartidos entre las especies que coexisten (Pianka, 1973). En las comunidades de lagartijas desérticas, el principal eje del nicho en que hay sobreposición es el hábitat, pero al tratarse de un recurso que se puede dividir en muchas escalas, se ha visto que este recurso termina por repartirse. La repartición de recursos se refiere a la reducción en la superposición en el uso de los recursos entre especies que coexisten, lo que contribuye a disminuir las interacciones competitivas y mantener la coexistencia. En comunidades de roedores Schoener (1974) también demuestra que la repartición ocurre de manera más frecuente en el eje del hábitat, después en el alimento y de manera más rara en la repartición temporal. Este patrón encontrado en comunidades animales puede que no necesariamente se repita en comunidades de plantas.

En plantas incluso se ha cuestionado la necesidad de un concepto del nicho (Chesson, 1991). Usando la definición de Hutchinson, se ha investigado cuál es el principal modo de diferenciación del nicho en las plantas y una de las propuestas que ha explicado mejor este problema ha sido la de Grubb (1977) del “nicho por regeneración”, según la cual las plantas coexisten a través de la diferencia en requerimientos para su regeneración, tales como su fenología, producción de semillas, dispersión, germinación y desarrollo. Además de lo anterior, otros factores que facilitan la coexistencia son la repartición en el espacio por el reclutamiento de individuos (Lavorel y Chesson, 1995) y las interacciones con polinizadores, dispersores de semillas, herbívoros, patógenos y simbiontes microbianos (Bazzaz, 1987). En el marco teórico del nicho por regeneración, la fenología reproductiva puede representar un eje muy importante para las plantas, para quienes el eje temporal del nicho parece ser más importante que lo que se ha observado en animales (Tokeshi, 1999).

1.2.4 Desplazamiento de caracteres en la morfología

Además de la segregación espacial, Grubb (1977) menciona que uno de los ejes del nicho que pueden tener mayor importancia es el del tamaño, ya que en algunos casos la diferenciación del nicho basada en la repartición de los recursos se puede inferir a partir de las relaciones de tamaño de los ensambles de especies. El tamaño corporal puede resumir e incorporar muchos de los diferentes caracteres del organismo relacionados con el uso de los recursos y puede ser usado como un sumario estadístico del modo de utilización de recursos (Tokeshi, 1999). Los ejemplos más claros de la diferenciación de tamaños se han obtenido de comunidades de roedores en el desierto (Brown, 1975); anteriormente Huxley (1942) y Lack (1944) sugirieron que las diferencias en tamaño son el resultado de la selección natural como una manera de evitar la competencia interespecífica. Después Brown y Wilson (1956) usaron el término de desplazamiento de caracteres para referirse a pares de especies cercanamente relacionadas que difieren más en simpatria que entre poblaciones alopátricas de la misma especie.

1.2.5 Enfoques alternativos en el estudio de la coexistencia y la competencia

Los modelos explicados en las secciones anteriores, están basados en la visión clásica formulada a partir del modelo Lotka-Volterra de competencia y en el principio de exclusión competitiva de Gause, en los que la coexistencia estable entre especies depende de la separación del nicho (Begon et al., 1996; Tokeshi, 1999). Sin embargo, los modelos de competencia han sido criticados en los últimos años y en muchas ocasiones no parecen haber diferencias claras entre los nichos cuando hay alta diversidad de especies en una comunidad, por lo que se ha cuestionado el papel de la competencia como fuerza modeladora de las comunidades. La manera más directa de probar la competencia es con experimentos de campo, en donde se remueve o agrega una especie a una comunidad y se monitorea la respuesta de las demás especies (Begon et al., 1996).

Una explicación alternativa a la competencia la dan los modelos nulos, cuyo principal exponente en los últimos años ha sido Hubbell (2001), quien en su teoría neutra propone que las especies son competitivamente equivalentes, que las diferencias del nicho son

irrelevantes y que la diversidad de especies es mantenida por procesos de deriva (similares a los de deriva génica que determinan la diversidad genética en loci neutros). Aunque el modelo propuesto por Hubbell aparentemente predice de manera muy precisa muchos atributos de comunidades biológicas, y lo hace particularmente bien para la distribución de abundancia de árboles tropicales (Abrams, 2001), algunas pruebas estadísticas han fracasado en demostrar el mejor ajuste de los modelos nulos de la estructura de las comunidades (McGill, 2003).

1.2.6 Coexistencia y especiación simpátrica

La teoría neutra considera que la estructura de las comunidades se debe tanto al ensamble histórico de las especies (extinción y migración) como a la evolución de las propias especies que co-ocurren y por lo tanto, a la especiación (Barot, 2004). Los modelos de especiación simpátrica podrían ayudar a predecir cuales mecanismos de coexistencia pueden ocurrir en comunidades con alta diversidad de especies.

La especiación simpátrica ha sido un proceso controvertido durante mucho tiempo porque supone que dentro de una misma población ocurre el aislamiento reproductivo sin una barrera geográfica (a diferencia de la especiación alopátrica). En este modelo es difícil entender una divergencia genética si continúa el flujo de genes entre los individuos, por lo que se ha sugerido que entre los grupos de individuos (especies incipientes) se comiencen a usar diferentes recursos previamente a la divergencia.

El propio Darwin propuso que la especiación se puede generar por especialización ecológica en ausencia de barreras geográficas. En simpatría las especies se originan al mismo tiempo que coexisten, en lugar de ocurrir un aislamiento geográfico (Tregenza y Butlin, 1999).

Las evidencias principales de simpatría se han encontrado en peces de lagos e insectos (Tregenza y Butlin, 1999). A diferencia de la especiación alopátrica, en donde se requiere de separación geográfica y de tiempo, en la especiación simpátrica y parapátrica ocurre un balance de diferentes fuerzas y la selección natural es lo suficientemente fuerte para contrarrestar el flujo génico (Turelli et al., 2001). Hay muchos más ejemplos de evidencia empírica de especiación alopátrica (Futuyma, 1998), aunque recientemente se ha valorado

el papel de la simpatria y se ha observado que es mucho mas común de lo que se pensaba (Via, 2001).

Aunque actualmente es común que especies cercanas vivan en simpatria, esto no significa que evolucionaron en ese lugar. Para demostrar la especiación sin aislamiento geográfico, se requiere tener la historia del contacto entre las especies. Actualmente esto se puede hacer usando herramientas nuevas como las de filogenia molecular (Page y Holmes, 1998).

1.2.7 Patrones de distribución espacial: niveles de rareza

Para definir los ensambles de especies que coexisten en una comunidad, es muy útil analizar sus patrones de distribución espacial y abundancia relativa. La abundancia “absoluta” de las especies está determinada por procesos ecológicos como nacimientos, muertes, inmigración y emigración (Begon et al., 1996), por otro lado, la abundancia relativa ha sido modelada por los procesos evolutivos durante la ocupación del nicho (Tokeshi, 1999).

Existen muchos modelos teóricos para analizar la abundancia relativa de las especies, pero en este trabajo sólo analizaremos el enfoque de la rareza de las especies. La rareza ha cobrado gran importancia recientemente en los estudios de conservación biológica, por esto, tanto los biólogos evolutivos, ecólogos de poblaciones y biólogos de la conservación se han enfocado a estudiar los procesos que propician que las especies sean raras (Gaston, 1994).

La historia de las especies es muy importante: al analizar diferentes especies habrá una gran diferencia entre aquellas especies raras que están sujetas a una regulación poblacional denso-dependiente, o bien aquellas que históricamente han sido raras o bien aquellas que por cambios ambientales han reducido drásticamente sus poblaciones recientemente (Rabinowitz, 1981; Falk, 1991). Estos diferentes orígenes de la rareza determinarán que las especies presenten atributos ecológicos contrastantes.

La clasificación en diferentes tipos de rareza que ha sido más aceptada en plantas es la que propuso Rabinowitz (1981). Ella definió los tipos de rareza de acuerdo a su abundancia local, rango geográfico y especificidad de hábitat en siete tipos. Esta clasificación se basa

en las diferentes combinaciones de las características anteriores, es decir, si son raras o abundantes localmente, si su distribución geográfica es amplia o restringida y si son muy específicas a su hábitat o no.

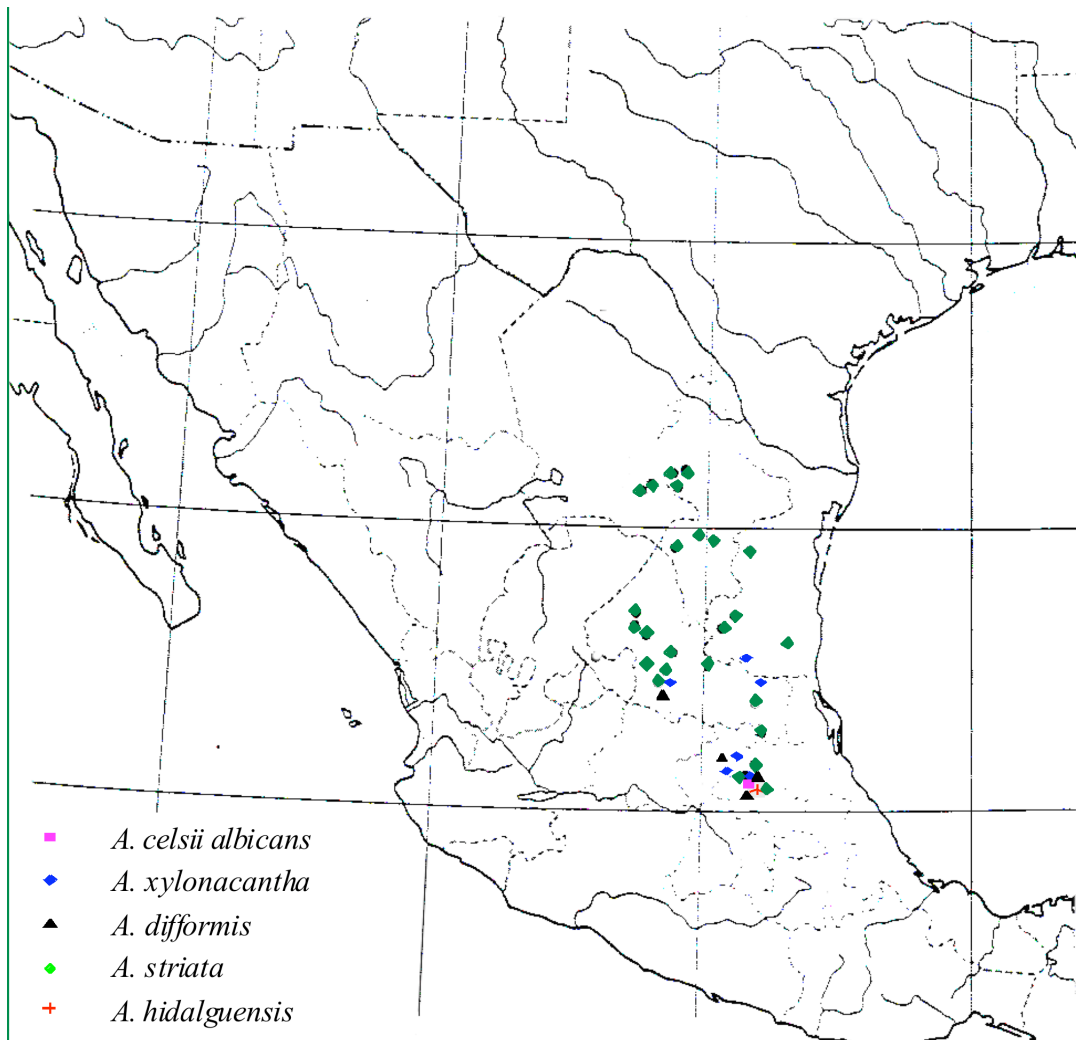
En la práctica, las características que se emplean con mayor frecuencia para hacer los análisis de rareza son el éxito reproductivo, la biología de la polinización, la habilidad competitiva, la variación fenotípica y la variación genética (Bevill y Louda, 1999).

Las razones por las cuales una especie llega a ser rara van desde características intrínsecas de la especie, sus interacciones, así como factores históricos. Fiedler y Ahouse (1992) proponen las diferentes causas que pueden determinar la rareza de las especies de plantas, y proponen una jerarquía en dichas causas, considerando factores ecológicos, evolutivos, históricos, taxonómicos y biológicos. De entre los más importantes podemos referirnos a la genética y edad del taxón, las interacciones con otros taxa, la historia evolutiva, estrategias del ciclo de vida, dinámica poblacional, biología reproductiva y eventos estocásticos (Fiedler y Ahouse, 1992).

Existen dos aproximaciones principales para los estudios de rareza. El primer caso será desarrollado en extenso en este trabajo, y se refiere a los estudios genéticos. Otra aproximación paralela es el análisis demográfico para encontrar los factores que limitan la dispersión de las especies raras (Schemske et al., 1994; Bevill y Louda, 1999). Para el caso de especies restringidas a poblaciones locales y pequeñas se espera que dependan más de los procesos demográficos que de los genéticos, y que estos primeros sean los que en mayor medida intervengan en el mantenimiento de la rareza.

En agaves, Tambutti (2002) hace una revisión de los patrones de distribución y abundancia para México y propone una clasificación de rareza basada en el esquema de Rabinowitz, y los datos de García-Mendoza (1995), sobretodo tomando en cuenta el rango de distribución de las especies. De acuerdo a esta propuesta, de las especies analizadas en este trabajo, existen cuatro especies raras a nivel global: *A. celsii albicans* y *A. hidalguensis* que se distribuyen en un solo cuadro; *A. xylonacantha* y *A. difformis* en tres cuadros; mientras que *A. striata* es una especie abundante al presentar una distribución muy amplia (Figura 7).

Figura 7. Distribución en México de las especies estudiadas



Datos y modificación de los mapas tomados de Gentry (1982)

1.3 Biología reproductiva

1.3.1 Evolución en los sistemas de polinización

Las interacciones entre insectos polinizadores y plantas han generado relaciones tan especializadas que se han convertido en los ejemplos clásicos de evolución adaptativa. El propio Darwin encontró evidencias a favor de la teoría de evolución por selección natural analizando la alta especialización entre las orquídeas y sus polinizadores (Darwin, 1862); desde entonces se han encontrado numerosos ejemplos de adaptaciones complejas y relaciones altamente especializadas entre insectos y plantas (Faegri y van der Pijl, 1966).

Los polinizadores pueden actuar como agentes selectivos de diversos caracteres reproductivos de las plantas y existen en la literatura numerosos ejemplos de selección ejercida por el polinizador (Nilsson, 1988; Cresswell y Galen, 1991; Campbell et al., 1997). En general, las plantas con sistemas generalistas son menos susceptibles de sufrir fuerte selección direccional en caracteres florales (Herrera, 1988), mientras que los sistemas especializados muestran mayor evidencia de selección (Galen, 1996). Existen evidencias de que las innovaciones florales fueron las principales promotoras de la alta especiación en angiospermas (Stebbins, 1970; Crepet, 1983). Sin embargo, existe discrepancia en la secuencia de eventos en esta rápida diversificación de las plantas con flor, porque la especiación pudo haber ocurrido antes que la especialización (Ollerton, 1996) y los mecanismos de aislamiento reproductivo pudieron ser originados por el proceso de divergencia adaptativa en especies alopátricas (Kearns et al., 1998). Por otro lado, la radiación adaptativa en muchos grupos de plantas parece haber sido consecuencia de los cambios en los polinizadores hacia una polinización especializada (Stebbins, 1970; Johnson et al., 1998). Por ejemplo, en un estudio en la orquídea del género *Disa*, Johnson et al. (1998) encontraron que la cladogénesis estaba asociada con los cambios en los sistemas especialistas de polinización.

1.3.2 Síndromes de polinización

Tradicionalmente ha existido una tendencia a pensar que los sistemas de polinización tienden hacia la especialización. A partir de estas ideas surge el concepto de síndrome de polinización para encontrar caracteres estructurales y funcionales en la flor que estén asociados con tipos particulares de polinizadores, lo que se ha tomado como evidencia de la adaptación de la flor a su polinizador (Faegri y van der Pijl, 1966). Presuntamente cada síndrome ejemplifica rutas adaptativas alternativas hacia diferencias entre grandes taxa (órdenes de insectos por ejemplo) por sus requerimientos nutricionales, habilidades sensoriales, movilidad y morfología (Faegri y van der Pijl, 1966).

Por otro lado, las observaciones en la naturaleza contradicen estas ideas en el sentido de que parece haber una incongruencia entre el síndrome de polinización de la planta y los polinizadores que realmente la visitan, debido a que las flores atraen más polinizadores de lo esperado. La respuesta a esta interrogante puede ser la idea del “principio del polinizador más efectivo” (Stebbins, 1970). Según este principio, las características florales son moldeadas por aquellos polinizadores cuyas visitas son más frecuentes y efectivas en la región donde están evolucionando. La propuesta es que aunque existan otros polinizadores, estos no van a detener sino tal vez retardar el proceso de la especialización, 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 de manera más eficiente. Para probar este principio, es importante medir la frecuencia y eficiencia de los polinizadores. De esta manera la mayoría de las plantas deberían ser polinizadas por un grupo reducido de especies eficientes, lo que se conoce como especialización adaptativa mediada por polinizadores (Thompson, 1994) y dado el tiempo suficiente, la mayoría de los sistemas de polinización deberían de tender hacia la especialización (Ollerton, 1996; Johnson y Steiner, 2000).

Entonces ¿es verdad que los sistemas tienden hacia la especialización? Existen dos puntos de vista contrastantes: que los sistemas efectivamente tiendan hacia la especialización o que por el contrario tiendan hacia la generalización. Ambas posturas serán tratadas en las secciones subsecuentes. Desde una perspectiva tipológica, la dicotomía supone dos soluciones opuestas y completamente disjuntas, lo cual supone una simplificación excesiva del problema (Gómez, 2002), más que una dicotomía, autores como

Johnson y Steiner (2000) proponen que los sistemas de polinización existen dentro de un continuo donde especialización y generalización se encuentran en los extremos.

1.3.3 Tendencia hacia la especialización

Los casos de especialización extrema a un sólo polinizador son extraordinariamente raros, aunque existen los ejemplos clásicos de coevolución entre higos y avispas y yucas y sus polillas. Las condiciones para que pueda existir este tipo de especialización son varias, por ejemplo, en el caso de la interacción entre las yucas y sus polillas, las polillas son mutualistas y antagonistas al mismo tiempo, así que además de tener un efecto positivo en el éxito reproductivo (medido con el “seed-set”) se requieren de otras condiciones como la sincronización del ciclo de vida del insecto con la fenología floral de plantas, quienes a su vez presentan ciclos de vida muy largos (Addicott et al., 1990). Los sistemas especialistas pueden ocurrir cuando los polinizadores son un recurso predecible (Johnson y Steiner, 2000), los polinizadores deben constituirse como agentes selectivos reales, debe existir selección natural mediada por el polinizador, es decir que afecte la adecuación de la planta habiendo una correlación significativa entre la frecuencia de la interacción con el polinizador y el número de descendientes dejados por la planta (Gómez, 2002). Los estimadores de adecuación a la fecha son muy incompletos, pues no se toman muchos estadios del ciclo de vida de la planta para hacer el análisis; lo más común es que sea en la fase de dispersión de polen o producción de semillas, pero no estadios post-dispersión. Por otro lado, debe haber una relación entre el valor de un rasgo y la adecuación, propiciando una selección fenotípica de dicho rasgo. Esto ocurre si el polinizador discrimina entre individuos de la misma especie, habiendo entonces una correlación entre la frecuencia de la interacción y el valor del rasgo floral que se selecciona (Gómez, 2002). El otro aspecto que maneja Gómez es el que el polinizador actúe como unidad selectiva bien definida, pues debe existir un mecanismo que permita a la planta diferenciar entre distintos visitantes florales. En principio, diferentes polinizadores deben tener un efecto diferencial en la adecuación de la planta y por otro lado que ocurra una diferencia en preferencia entre los polinizadores, de tal manera que un rasgo vegetal se podrá modificar para atraer a un determinado polinizador importante (Schemske y Bradshaw, 1999). Con este mecanismo

aumenta la frecuencia en la interacción planta-polinizador. Además la preferencia floral diferencial por parte de los polinizadores evitará cruzamientos indeseados (Kearns et al., 1998). Si comparamos dos sistemas de polinización altamente especializados como las yucas y la cactácea *Lophocereus schottii*, encontraremos muchas similitudes que sugieren que han evolucionado en respuesta a presiones de selección similares, como son selección en la reducción de la producción de néctar, estructuras especializadas recolectoras de polen y en el comportamiento de la polinización activa en las polillas (Fleming y Holland, 1998). Según las predicciones teóricas (Addicott et al., 1990; Thompson, 1994; Waser et al., 1996) ambos sistemas deben tener polinizadores cuyos ciclos de vida están íntimamente asociados con plantas de ciclos de vida largos y con floración estacional. Ante la paradoja de los sistemas de polinización, Waser et al. (1996) proponen que la especialización incluso debería ser seleccionada en contra porque aumenta la varianza en el éxito reproductivo.

1.3.4 Restricciones a la especialización y tendencias a la generalización

La falta de predicción espacio-temporal en la composición de los ensambles de polinizadores es uno de los factores más importantes que reducen las posibilidades de selección por polinizadores en los caracteres florales (Herrera, 1988, 1996). Las plantas presentan mosaicos espacio-temporales, cuya composición y abundancia varía entre años y localidades (Herrera, 1988), de manera que la evolución conjunta ocurre de manera difusa (Janzen, 1980; Schemske, 1983), además de que la distribución geográfica entre plantas y polinizadores rara vez coincide y las interacciones no son obligadas (Thompson, 1994). La fluctuación temporal en el gremio de polinizadores de una planta con ciclo de vida largo provocará que la eficacia biológica de un individuo cambie entre años, en especies anuales cambiará el número de individuos reclutados dependiendo de los caracteres morfológicos de los padres. La consecuencia es que un determinado carácter fenotípico se beneficia unos años y otros no (Gómez, 2002). En cuanto a la variación espacial, si diferentes poblaciones están sometidas a diferentes escenarios selectivos, las presiones que reciben son diferentes lo que generaría incongruencia en las presiones selectivas globales (Gómez, 2002).

La generalización ocurre entonces cuando las recompensas de las plantas son similares en especies diferentes, reduce el costo de viajar para el polinizador, impone pocas

restricciones en el comportamiento y la morfología, y el largo de la vida del polinizador es mayor al tiempo de floración de las especies individuales (Waser et al., 1996). Otras razones que favorecen la evolución hacia la generalización son que diferentes polinizadores ejercen la misma presión de selección, o bien la selección misma puede favorecer que se agreguen nuevos polinizadores sin perder los previos (Aigner, 2001). Waser et al. (1996) proponen un modelo en el que observan que la planta gana una ventaja en un espacio y tiempo determinado especializándose al polinizador más eficiente y/o abundante, pero la variación temporal en los servicios del polinizador hace que la especialización sea menos probable. Esto ocurre principalmente en plantas con pocos episodios reproductivos o que carecen de otra estrategia reproductiva, que pueden enfrentar extinción local si se especializan en un solo polinizador que desaparece por periodos de tiempo largos, incluso de varios años. Se espera la especialización en plantas grandes, con ciclos de vida largos, cuando la presencia del polinizador es más bien constante (Waser et al., 1996).

1.3.5 Sistemas de polinización en agaves

Retomando la discusión de sistemas especialistas y generalistas, pero usando la evidencia que hay a la fecha en agaves, es notorio que se haya planteado una dicotomía entre los subgéneros *Agave* y *Littaea*. Una profundización sobre los trabajos existentes en ambos subgéneros puede encontrarse en los capítulos 2 y 3 de esta tesis, así como en las revisiones de Eguiarte et al. (2000) y Slauson (2001). Las conclusiones a las que se ha llegado previamente han sido que *Agave* (de inflorescencias paniculadas), es polinizado por murciélagos principalmente de los géneros *Leptonycteris* y *Choeronycteris* (Howell, 1972; Gentry, 1982; Arizaga y Ezcurra, 1995; Arizaga et al., 2000a, b; Molina-Freaner y Eguiarte, 2003); (Tabla 2), mientras que las especies pertenecientes al subgénero *Littaea* (de inflorescencias espigadas o racemosas) son polinizadas principalmente por insectos (Schaffer y Schaffer, 1977; Kuban et al., 1983; Kuban, 1989; Eguiarte et al., 2000; Slauson, 2000, 2001; Silva-Montellano y Eguiarte, 2003a) (Tabla 3).

En todo el género se presentan características asociadas con la polinización por murciélago (quiropterofilia) tales como flores largas, abiertas, desde tubulares profundas hasta en forma de tazón, verticales, con tépalos gruesos, la producción de néctar es

nocturna y la concentración de azúcar baja (Gentry, 1982). El color de las flores generalmente es opaco y amarillento pálido, con tépalos desde blanquecinos hasta morados o rojizos. El olor es muy característico, parecido al que despide la fruta madura o en fermentación (Slauson, 2001). Se han reportado casos en los que existe una alta especialización a un polinizador específico: Howell y Roth demuestran que el costo en la reproducción sexual es muy alto para *A. palmeri*, y que un decremento en la población de su polinizador principal (*Leptonycteris*), puede poner en riesgo a la población completa del agave (Howell y Roth, 1981). De manera contrastante existen casos en que los agaves no sólo son polinizados de manera exclusiva por insectos, sino que han mostrado un cambio en los atributos florales, para parecerse más a un síndrome de polinización por insecto, dichos cambios son la presencia de tubos florales más angostos, producción de néctar menos abundante y con mayor concentración de azúcar y de un olor dulce, el color de las flores es más atractivo para los insectos, desde amarillo hasta naranja brillante (Schaffer y Schaffer, 1977; Slauson, 2000).

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 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).

Tabla 2. Biología reproductiva del subgénero *Agave*

<i>Especie</i>	<i>Visitantes florales</i>	<i>Volumen y concentración de néctar</i>	<i>Compatibilidad</i>	<i>Producción de néctar y liberación de polen</i>	<i>Resultados experimentos de polinización</i>	<i>Referencias</i>
<i>A. palmeri</i>	Murciélagos, esfíngidos, abejas grandes y colibríes	713µl/noche [14-19%]	Autocompatible	Dehiscencia nocturna	Igual eficiencia polinizadores diurnos y nocturnos	(Slauson, 2000)
<i>A. chrysantha</i>	Esfíngidos, polillas, abejas grandes y colibríes	470µl/noche [14-19%]	Autocompatible	Dehiscencia nocturna	Mayor eficiencia de polinizadores diurnos	(Slauson, 2000)
<i>A. salmiana</i>	Aves y murciélagos	102µl/2 h [12%]		Producción de néctar diurna		(Eguiarte et al., 2000)
<i>A. macroacantha</i>	Murciélagos, esfíngidos, abejas, colibríes, polillas	110µl/día			Murciélagos mas eficientes	(Arizaga et al., 2000a)
<i>A. havardiana</i>	Aves y murciélagos				Múltiples polinizadores por variación en los murciélagos	(Eguiarte et al., 2000)
<i>A. mckelveyana</i>	Abejas y avispas	Cociente de azúcares para murciélagos		Dehiscencia nocturna		(Sutherland, 1987)
<i>A. deserti</i> *	Aves y avispas			Dehiscencia diurna y nocturna		(Fulton, 1983)
<i>A. shawii</i>		[67%]		Dehiscencia diurna y nocturna		
<i>A. angustifolia</i>	Murciélagos, aves y abejas	180µl/noche [18-26%]		Dehiscencia nocturna		(Molina-Freaner y Eguiarte, 2003)
<i>A. subsimplex</i>	Abejas, palomillas y murciélagos	40µl/noche [22-25%]		Dehiscencia nocturna		(Molina-Freaner y Eguiarte, 2003)

* Estudio hecho fuera del rango de distribución de murciélagos nectarívoros

Tabla 3. Biología reproductiva del subgénero *Littaea*

<i>Especie</i>	<i>Visitantes florales</i>	<i>Volumen y concentración de néctar</i>	<i>Compatibilidad</i>	<i>Producción de néctar y liberación de polen</i>	<i>Resultados experimentos de polinización</i>	<i>Referencias</i>
<i>A. schottii</i>	Abejas, esfíngidos y colibríes	11.6µl/noche [18%]	Autocompatible	Dehiscencia nocturna		(Schaffer y Schaffer, 1977)
<i>A. toumeyana</i>	Abejas grandes	4.6µl/día [62.3%]		Dehiscencia nocturna Producción de néctar diurna		(Schaffer y Schaffer, 1977)
<i>A. parviflora</i>	Abejas grandes	0.9µl/día [37.4%]		Dehiscencia diurna		(Schaffer y Schaffer, 1977)
<i>A. utahensis</i>	Abejas grandes, esfíngidos y abejas					
<i>A. lechuguilla</i>	Esfíngidos y abejas grandes	20-190µl/ [12-52%]		Dehiscencia nocturna		(Silva-Montellano y Eguiarte, 2003a)
<i>A. garciae-mendozae</i>	Murciélagos, abejas y abejorros	66-68µl/noche [10-15%]		Dehiscencia nocturna		(González, 2004)

1.4 Genética de poblaciones

1.4.1 La diversidad genética y los mecanismos de la evolución

La evolución es fundamentalmente el resultado del cambio progresivo en la composición genética de una población. Existen fenómenos genéticos y ecológicos responsables de dicho cambio y la genética de poblaciones trata de comprenderlos y modelarlos (Hartl y Clark, 1989, 1997). Para comprender la evolución a nivel genético es necesario comenzar determinando los niveles de variación genética en las poblaciones, así como el origen de esta variación, su mantenimiento y distribución (Nei, 1987; Hartl y Clark, 1989).

La diversidad genética es la materia prima para la evolución, debido a que sólo si existe diversidad pueden ocurrir tanto la adaptación como la especiación. Los niveles altos de diversidad pueden dar a las poblaciones la habilidad para responder a enfermedades, parásitos, depredadores y cambios ambientales, es decir, la habilidad para evolucionar (Hedrick, 2001). La cantidad y el tipo de variación genética en una población es afectada por las fuerzas evolutivas como la selección natural, la endogamia, la deriva génica, el flujo génico y la mutación. Mientras que la mutación es la causante de aumentar los niveles de variación, la deriva génica y la endogamia la disminuyen. Por otra parte, la selección y el flujo génico pueden tanto aumentar como reducir la variación genética, dependiendo de la situación particular (Hedrick, 2000).

Para cuantificar los niveles de variación genética en las poblaciones se emplean los llamados marcadores moleculares, y cuando éstos producen un gran número de loci, las medidas más utilizadas para estimar la diversidad son la proporción de loci polimórficos y la heterocigosis promedio por locus (Nei, 1987). El porcentaje de loci polimórficos (P) es la proporción de loci en los cuales el alelo más común se encuentra en una frecuencia igual o menor a 0.95 (aunque se puede usar un valor de 0.99, ver más adelante); mientras que la heterocigosis promedio (que comúnmente es llamada medida de diversidad genética o H) es la proporción de loci heterocígos esperada en un individuo escogido al azar (Nei, 1987).

1.4.2 Métodos actuales para estimar la diversidad genética

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés: “Polymerase Chain Reaction”) ha cambiado radicalmente los métodos de análisis de la diversidad genética en los últimos años. Recientemente se han desarrollado marcadores inespecíficos que de manera rápida generan información cuando no se tiene un conocimiento previo de las secuencias de genes de las especies en estudio. Técnicas como RAPDs “Random Amplified Polymorphic DNA” (Williams et al., 1990), AFLPs “Amplified Fragment Length Polymorphism” (Vos et al., 1995) o ISSR “Inter-Simple Sequence Repeats” (Zietkiewicz et al., 1994), usan oligonucleótidos inespecíficos para amplificar regiones al azar en el genoma y al final se obtiene un patrón variable de bandas que representan las regiones amplificadas (Wolfe y Liston, 1998).

Sin embargo, estos marcadores presentan la desventaja de que se obtiene sólo la presencia de las bandas amplificadas o su ausencia, de manera que no se puede discernir entre el heterócigo portador de una copia y el homócigo portador de dos copias. Para cada locus el alelo positivo (presencia de la banda) domina sobre el alelo nulo (ausencia de la banda). Así, si la muestra de la población no tiene o tiene pocos homócigos nulos, estimar las frecuencias alélicas puede tener complicaciones estadísticas. Para evitar esto, se han realizado análisis de la progenie o de tejidos haploides (por ejemplo, megagametofitos en pinos) para cada individuo que porta el alelo dominante (Isabel et al., 1999), aunque esto requiere de gran cantidad de trabajo, o en el peor de los casos los tejidos haploides no están disponibles para hacer su análisis.

A este tipo de marcador lo llamamos dominante, y si por el contrario, el marcador nos permite diferenciar a los heterócigos de ambos homócigos, lo llamamos codominante. Cuando el marcador genético es codominante, se pueden calcular de manera más acertada las frecuencias alélicas dentro de las poblaciones, porque podemos medir la heterocigosis directamente de los datos.

En los primeros trabajos realizados con marcadores dominantes, para poder conocer las frecuencias alélicas se requería de un conocimiento previo del coeficiente de endogamia (Lynch y Milligan, 1994; Zhivotovsky, 1999), o bien tratar al fenotipo multilocus como un haplotipo y usar un índice de similitud o distancia euclidiana, para describir la distancia entre los haplotipos en un análisis de varianza molecular (Excoffier et al., 1992).

Lynch y Milligan (1994) proponen excluir a aquellos loci con menos de tres alelos, para que no se sesgue el cálculo de frecuencias alélicas. Sin embargo, se ha demostrado que cuando se tienen muchos loci polimórficos, y muchos individuos por población los estimadores tradicionales calculan de manera adecuada la heterocigosis (Krauss, 2000). Más adelante, en la sección de métodos del capítulo 4, se tratarán de manera más detallada los tipos de análisis que pueden efectuarse cuando el marcador es dominante.

1.4.3 Estructuración de la variación

Las poblaciones naturales por lo general muestran diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas de una región a otra, esto es debido a la variabilidad y falta de continuidad en todos los ambientes en los que puede mantenerse una especie, y las poblaciones responderán de manera diferencial a esta variabilidad. Debido a esto, las especies tienden a estar divididas y la diversidad genética a estar agrupada de manera jerárquica. Tras esta división, las poblaciones no necesariamente constituyen una unidad panmíctica donde los individuos se aparean al azar (Excoffier, 2001).

Cuando una población está subdividida geográficamente, las diferencias en las frecuencias alélicas y genotípicas de las subpoblaciones dependen principalmente del flujo génico que exista entre ellas. Si los niveles de flujo génico son altos, habrá una tendencia a homogeneizar la variación genética de las subpoblaciones. 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 (Nei, 1987).

Existen diferentes métodos para estimar el efecto de la subdivisión poblacional, pero el más utilizado ha sido el propuesto por Wright (1943; 1951; 1965; 1969). Wright y Malécot (1948) desarrollaron un método para dividir la variación genética en una población subdividida, el cual produce una buena descripción de la diferenciación a diferentes niveles. Los índices empleados se conocen como los estadísticos F de Wright (Nei, 1987) y se usan para distribuir la variación genética a nivel poblacional (T) de subdivisiones o subpoblaciones (S) y a nivel individual (I), los tres índices se conocen como F_{ST} , F_{IT} y F_{IS} (Hartl y Clark, 1989; Hedrick, 2000). Wright emplea al coeficiente de endogamia (f) para

describir la distribución de la diversidad genética debido que la endogamia puede ser el resultado de la fragmentación o subdivisión poblacional (Frankham et al., 2002).

Wright (1943; 1951) definió originalmente F_{ST} como la correlación entre dos gametos tomados al azar de cada subpoblación relativo al total y mide el grado de diferenciación genética de las subpoblaciones. F_{ST} es interpretado como una medida del avance de una subpoblación hacia la fijación de un alelo para un locus, y por eso es que también se le llama índice de fijación. Los valores de F_{ST} van de 0 (cuando no hay diferenciación entre las subpoblaciones) hasta 1 (cuando se han fijado los diferentes alelos en las subpoblaciones). Por otro lado, F_{IS} y F_{IT} miden la correlación entre dos gametos relativa a la subpoblación y la relativa al total respectivamente (Wright, 1969). F_{IS} y F_{IT} son medidas de la desviación de las proporciones de Hardy-Weinberg dentro de las subpoblaciones y en la población total respectivamente: valores positivos indican una deficiencia de heterocigos y valores negativos un exceso de heterocigos (Hedrick, 2000).

La aproximación empleada posteriormente por Nei (1977) fue formulada totalmente en términos de frecuencias alélicas y genotípicas en la población. El expresa los índices de fijación en términos de las proporciones de heterocigosis, además de que da una solución matemática al cálculo de los índices F para varios loci, por lo tanto, esta aproximación ha permitido calcular los estadísticos F a partir de datos obtenidos con marcadores moleculares multilocus (Nei, 1987). Posteriormente, Nei y Chesser (1983), proponen el cálculo de los estadísticos F para datos obtenidos de poblaciones reales, en las que las frecuencias alélicas y genotípicas son variables aleatorias, debido a que el número y tamaño de las subpoblaciones son finitos y pueden actuar en ellas otras fuerzas evolutivas.

Un índice que se considera análogo a la F_{ST} es la G_{ST} propuesta por Nei (1973), que es definida como la proporción de la diversidad genética que se encuentra entre poblaciones, y equivale a la F_{ST} cuando hay dos alelos por locus, de modo que para varios alelos la G_{ST} consiste en el promedio de F_{ST} para todos los alelos.

Cockerham (1969; 1973) y Weir (Weir y Cockerham, 1984; Cockerham y Weir, 1986) por su parte, demostraron como descomponer la varianza total de las frecuencias alélicas en componentes de la varianza asociados con diferentes niveles de subdivisión usando el marco teórico del análisis de varianza (ANOVA). Ellos propusieron emplear análisis de varianza y covarianza de ciertas variables indicadoras de los estados de los alelos y

relacionaron estos parámetros con los índices de fijación. El llamado coeficiente de coancestría (θ) propuesto por Cockerham (1969) representa la probabilidad de que dos genes tomados al azar provenientes de diferentes individuos sean idénticos por descendencia y es equivalente a la F_{ST} (Weir, 1996). La coancestría se incrementa con el tiempo, de tal manera que indica qué tan diferenciadas están las poblaciones. Para datos obtenidos con marcadores multilocus, estos autores sugieren usar técnicas de “bootstrap”, es decir, re-muestrear a partir de los datos para obtener una distribución empírica de F , usando submuestras del conjunto completo de datos. De esta manera se pueden obtener intervalos de confianza empíricos para la θ (Weir y Cockerham, 1984).

Una extensión del análisis de varianza anterior, es el AMOVA o análisis de varianza molecular, “Analysis of MOlecular VARIance” (Excoffier et al., 1992). Este análisis aprovecha el conocimiento generado con los nuevos marcadores de ADN, donde se tiene información no sólo de las frecuencias alélicas sino de los cambios entre los diferentes alelos. Este método calcula la distancia entre los diferentes haplotipos y produce estimaciones de los componentes de la varianza que son análogos de los estadísticos F . Los llamados estadísticos Φ , reflejan la correlación de la diversidad haplotípica en diferentes niveles de subdivisión jerárquica (Excoffier, 2001).

Una alternativa más que se tiene en el estudio de la repartición de la diversidad genética, es usar el índice de Shannon (Shannon y Weaver, 1949) que no es sensible a efectos del sesgo causado por la incapacidad de detectar heterócigos (Dawson et al., 1995; Bussell, 1999). Este índice usa la presencia/ausencia de bandas como fenotipos y no asume que la población está en equilibrio de Hardy-Weinberg. La estimación de diversidad fenotípica equivale aproximadamente a la diversidad genética (Lewontin, 1972; Whitkus et al., 1998).

Finalmente, los métodos empleados más recientemente son aquellos que hacen uso de la estadística bayesiana para calcular la diferenciación entre las poblaciones. Holsinger y colaboradores (2002) proponen un modelo bayesiano jerárquico para estimar la estructura genética a partir de datos de marcadores dominantes. Este método permite incorporar la incertidumbre sobre la magnitud de la endogamia al estimar la F_{ST} . Esta aproximación se basa en una distribución *posterior* de las frecuencias alélicas con la que se obtienen valores de probabilidad, mientras que la información de la muestra se usa para afinar el modelo

probabilístico a partir de una distribución de frecuencia *prior* seleccionada. Con los datos obtenidos de esta manera se hace una repartición de la variación en diferentes niveles jerárquicos (Holsinger, 1999; Holsinger et al., 2002; Holsinger y Wallace, 2004).

1.4.4 Análisis genéticos usando el criterio de rareza

Los niveles de variación genética están determinados en gran medida por ciertas características ecológicas intrínsecas a las poblaciones, tales como sus patrones de distribución. Las especies “raras” son aquellas que presentan tamaños poblacionales pequeños y están aisladas geográficamente (Barrett y Kohn, 1991). Las especies que normalmente tienen distribuciones en poblaciones pequeñas y esparcidas presentan sistemas genéticos que se ajustan a la endogamia y adaptaciones que compensan las desventajas de la rareza. Por ejemplo, cuando las especies son uniformemente raras a lo largo de toda su distribución, como el caso de ciertos árboles, tienen una tasa alta de entrecruzamiento. Por otro lado, las especies que han sufrido recientemente cuellos de botella por destrucción de su hábitat pueden presentar estrés genético debido a los tamaños poblacionales pequeños (Lande y Barrowclough, 1987).

Se han reportado niveles bajos de variación para especies raras y esto puede ser tanto causa como consecuencia misma de la rareza. Incluso Stebbins, quien consideraba en un inicio a las especies raras como depauperadas genéticamente, tras una serie de trabajos donde se encontraban altos niveles de variación reconsideró la idea de que puede existir una alta diversidad en especies raras (Stebbins, 1980; Gitzendanner y Soltis, 2000).

Los niveles altos de endogamia seguidos de selección contra los homócigos para alelos raros disminuye aun más la variación genética. Por eso se espera que las especies con un rango de distribución restringido tengan menor variación que las especies con una amplia distribución (Lande y Barrowclough, 1987).

En muchos trabajos se han hecho correlaciones entre la diversidad genética, el rango geográfico y la historia de vida y se han encontrado efectos tanto a nivel de especies como de poblaciones (Hamrick y Godt, 1989). Los efectos de la baja diversidad en la adecuación en plantas son variables, debido a los diferentes sistemas reproductivos de éstas y la carga

genética que mantienen (debida a los recesivos deletéreos y alelos letales que se generan continuamente por mutación) (Charlesworth y Charlesworth, 1987).

Los cuellos de botella, considerados como reducciones drásticas en los tamaños efectivos, pueden repercutir en la variación cuando unos pocos individuos llegan a poblar un hábitat desocupado (efecto fundador). Un cuello de botella a nivel genético es un evento único en el tiempo y si las poblaciones permanecen pequeñas por largos periodos de tiempo, el efecto de error de muestreo es acumulativo. Esto genera cambios al azar en las frecuencias alélicas debido al muestreo de algunos de los gametos en cada generación, es decir, la deriva génica (Hartl y Clark, 1997). Debido a que en poblaciones de mayor tamaño las fluctuaciones no son tan grandes, se espera que se mantengan niveles de variación mayores que en las poblaciones pequeñas.

Para poder entender la rareza en las especies de plantas, tradicionalmente se comparaban todo tipo de especies sobre las cuales existieran datos tanto de su ecología como de su genética (i. e. Hamrick y Godt, 1989). Desafortunadamente, las diferentes especies no son necesariamente ni directamente comparables entre sí, porque muchos factores covarían. Por ejemplo, de manera contrastante los árboles son longevos y generalmente tienen polinización cruzada, por lo que acumulan variación genética pero están poco diferenciados. Por otro lado, las herbáceas en su mayoría son anuales, además de que se autopolinizan, con la autopolinización se purgan los recesivos deletéreos, pero al mismo tiempo se reduce el movimiento de polen, ocasionando una alta diferenciación geográfica. Adicionalmente, se deben tomar en cuenta las relaciones de parentesco entre las especies, debido a que muchos parámetros se pueden compartir sólo por restricciones filogenéticas y similitud entre especies muy cercanas.

Para poder entender la relación entre la distribución de una especie y su genética es necesario conocer su historia evolutiva, lo cual se obtiene haciendo análisis que incluyan la filogenia. Kruckeberg y Rabinowitz (1985) proponen hacer análisis filogenéticos previos a la comparación de especies raras. Como sabemos, no siempre es factible tener las filogenias de los organismos estudiados y una alternativa práctica es hacer comparaciones de diferentes especies dentro de un mismo género. La sugerencia de estos autores es comparar la biología de especies raras con la de especies comunes que estén muy cercanas filogenéticamente.

El primer trabajo en donde se comparan los niveles de variación genética entre especies raras y comunes es el de Karron (1987). Este autor comparó once pares congénicos de especies endémicas contra abundantes y analizó la diversidad genética y las tasas de entrecruzamiento. La idea surgió a partir de la dificultad de comparar todo tipo de especies con diferentes historias de vida, pues surgían muchos errores en el análisis. Sus resultados indicaron que las especies raras tienen niveles de variación significativamente más bajos que sus congéneres con amplia distribución, pero no tenían tasas de entrecruzamiento más bajas.

Después del trabajo de Karron muchos autores han hecho la comparación entre especies de un mismo género y es sorprendente que mientras algunos siguen encontrando niveles bajos en las poblaciones raras, también hay casos en los que la variación es más alta para especies raras y, por otro lado, en algunos casos ambas especies (raras y comunes) tienen niveles muy altos o muy bajos de variación como en el caso de *Daviesia suaveolens* y *D. mimosoides* (Young y Brown, 1996).

Frankham (1995) comparó los niveles de variación en 38 especies en peligro y encontró que el 82% de ellas presentaban menor variación que sus congéneres que no se encontraban en peligro.

Gitzendanner y Soltis (2000) hacen una revisión de todos los trabajos reportados donde se hace la comparación entre especies raras y comunes. Este es un trabajo muy interesante porque además de ser una revisión exhaustiva, estos autores compararon el mayor número de parámetros posibles en cada caso y hacen pruebas estadísticas robustas, demostrando que las medidas de diversidad genética en general son menores para las especies raras. Sin embargo, resulta interesante que del 24 al 29% de las especies raras analizadas fueron igual o más variables que las comunes.

Una gran ventaja de comparar especies raras y comunes es el hecho de que esto ayuda a entender las causas históricas y de las historias de vida que generaron la rareza en el pasado. Ahora se comienzan a generar nuevas explicaciones para la rareza y los niveles bajos de diversidad (Gitzendanner y Soltis, 2000).

1.4.5 Genética de la conservación

Ante la evidencia de la importancia de la variación genética, los estudios de genética de la conservación se han incrementado en los últimos años con el objetivo de entender y disminuir los problemas genéticos enfrentados por las poblaciones pequeñas. A la fecha, existen numerosos ejemplos donde los factores genéticos parecen estar implicados en la disminución de poblaciones de animales como los pumas de Florida (*Felis concolor*), los pericos de Puerto Rico (*Amazona vittata*), los lobos de la isla Royal (*Canis lupus*), el borrego cimarrón (*Ovis canadensis*), el pájaro carpintero (*Dendrocopos medius*) y los leones asiáticos (*Panthera leo persica*), entre otros (O'Brien, 1994; Hedrick, 1995; Frankham et al., 2002). De entre los factores genéticos que se han reconocido, la pérdida de variación genética y la depresión por endogamia, parecen ser los más importantes.

Cuando las poblaciones son pequeñas son más propensas a la extinción, ya que los factores estocásticos (tanto genéticos, como demográficos, ambientales y catástrofes) aceleran su decline y llevan a las especies hacia los llamados vórtices de extinción (Primack, 2001; Frankham et al., 2002). Estos se inician cuando las poblaciones son pequeñas, con niveles altos de endogamia y demográficamente inestables. La disminución poblacional reduce la adecuación y se produce una retroalimentación negativa, lo que refuerza el decline, aumenta la depresión por endogamia y la susceptibilidad a eventos estocásticos reduciendo más aún el tamaño poblacional, esto sucesivamente hasta llegar a la extinción.

Otro problema que se ha descrito es el llamado colapso mutacional (o en inglés “mutational meltdown”). Lynch (1993) observó que las mutaciones deletéreas se acumulan más en poblaciones pequeñas, porque la selección es menos eficiente. Cuando las poblaciones son grandes, las mutaciones deletéreas son removidas por la selección natural y ésta elimina a los individuos con mayor carga genética. Si la población comienza a declinar, el número de individuos disponible para que se eliminen las mutaciones deletéreas disminuye, la purga se vuelve cada vez menos eficiente, aumenta la carga genética de la población y la adecuación disminuye (Lynch, 1993; Lande, 1995; Lynch et al., 1995). El resultado es una retroalimentación negativa similar al vórtice de extinción (Amos y Balmford, 2001).

Los cuellos de botella, por otra parte, son reducciones drásticas en los tamaños efectivos y pueden repercutir en los niveles de variación genética. Si las poblaciones permanecen pequeñas por largos periodos de tiempo, el efecto de error de muestreo es acumulativo. Esto genera cambios al azar en las frecuencias alélicas, es decir, deriva génica (Hartl y Clark, 1997). Debido a que en poblaciones de mayor tamaño las fluctuaciones no son tan grandes, se espera que se mantengan niveles de variación genética mayores que en las poblaciones pequeñas.

Para establecer estrategias de conservación también es importante tomar en cuenta la subdivisión poblacional a nivel genético. Debido a que por razones económicas y prácticas, no todas las poblaciones de las especies en peligro puede ser conservadas, deben establecerse prioridades de conservación y una manera de hacerlo es cuantificando la variación genética entre las poblaciones, que pueden dar información importante para apoyar acciones de reintroducción o de conservación *ex situ* (Gaudeul et al., 2000). Por ejemplo, si se desea conservar la mayor cantidad posible de variación genética, el esfuerzo debe recaer en conservar aquellas subpoblaciones más diferenciadas o diversas genéticamente (Holsinger y Gottlieb, 1991; Petit et al., 1998). Por otro lado, para evitar la depresión por exogamia seguida a la reintroducción de organismos desde una subpoblación externa, los individuos seleccionados para reintroducir deben escogerse de manera que sean similares ecológica y genéticamente a los de la subpoblación que se desea reforzar; esto con el fin de evitar una disrupción de complejos de genes coadaptados (Templeton, 1986).

1.5 Objetivos

Objetivo general

- Realizar un estudio comparativo de la biología reproductiva y de la genética poblacional en las cinco especies de *Agave* más representativas de la Barranca de Metztitlán: *A. celsii albicans*, *A. striata*, *A. xylonacantha*, *A. difformis* y *A. hidalguensis*, para sentar las bases para un futuro entendimiento de sus patrones de abundancia y distribución, de los factores que promueven la coexistencia de estas especies simpátricas y de los procesos microevolutivos que operan en ellas.

Objetivos particulares

- Realizar un análisis descriptivo detallado de la biología reproductiva en las cinco especies de agave.
- A partir de observaciones sistemáticas, determinar los principales visitantes florales para cada una de las especies.
- Realizar un análisis cualitativo de la fenología de las diferentes especies de *Agave* a lo largo del año.
- Analizar los patrones de producción y tipos de néctares, así como determinar la sincronía o asincronía en los picos de producción de néctar entre las especies.
- Identificar mediante experimentos controlados, el sistema de cruzas que emplea cada especie.
- Calcular los valores del éxito reproductivo para cada especie, a partir del número semillas viables por fruto y del número de frutos por inflorescencia.
- Identificar posibles ejes del nicho que muestren evidencias de repartición, sobre todo los relacionados con la alometría y el desplazamiento de caracteres.
- Describir la genética de las poblaciones naturales de las cinco especies de agaves, cuantificando los niveles de variación y estructura genética.

- Implementar la técnica multilocus de ISSRs como marcador molecular para el análisis de estas cinco especies.
- Obtener los parámetros de variación y de estructura genética con diferentes estimadores.
- Hacer la comparación de diferentes índices y métodos de análisis, incluyendo los desarrollados recientemente que incorporan estadística bayesiana.
- Calcular la repartición de la variación genética por medio de un análisis de AMOVA (Analysis of Molecular Variance).
- Estimar las distancias genéticas que separan a las poblaciones y esclarecer sus relaciones de similitud.
- Evaluar si las poblaciones de estas especies siguen un patrón de aislamiento por distancia.
- Realizar un análisis conjunto de todas las especies, comparando los diferentes índices de diversidad, estructura y agrupamiento de las poblaciones, para conocer la dinámica a nivel genético en esta comunidad de agaves.
- Interpretar los datos ecológicos y genéticos para que sean incorporados a los planes de conservación de estas especies en el manejo de la reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán.

CAPÍTULO 2

LA BIOLOGÍA REPRODUCTIVA Y LA RADIACIÓN ADAPTATIVA EN LA FAMILIA AGAVACEAE

Este segundo capítulo presenta el marco teórico de la evolución y la taxonomía de la familia Agavaceae. En este trabajo, se hace una recopilación de la información con la que contamos actualmente para suponer que la familia y particularmente el género *Agave* ha sufrido una rápida diversificación que creemos se ha visto favorecida por la interacción con sus polinizadores. En la familia existen dos géneros particularmente especiosos: *Yucca* y *Agave*, ambos presentan altas tasas de diversificación y un alto número de especies aunque estrategias reproductivas contrastantes. En particular para el género *Agave* existe evidencia para pensar que las adaptaciones fisiológicas, sus particulares historias de vida y la interacción con los polinizadores han facilitado la formación de tantas especies como las que actualmente encontramos en nuestro país.

2.1. Resumen

La familia Agavaceae es de origen americano y comprende alrededor de 300 especies que habitan en ambientes áridos y semiáridos y que se encuentran distribuidas principalmente en México. Esta familia es particularmente exitosa y muestra una serie de adaptaciones morfológicas, reproductivas y ecológicas. Algunas especies de esta familia pueden actuar como especies clave en los ecosistemas, principalmente por los abundantes recursos que ofrecen en la época de reproducción.

En este capítulo se analiza el conocimiento actual acerca de la ecología de la polinización en los diferentes géneros dentro de la familia y el papel que han desempeñado los sistemas de polinización en el éxito ecológico y filogenético del grupo.

Se reconocen varios cambios de sistemas generalistas hacia especialistas en sistemas de polinización en el género, y demostramos que la interacción con murciélagos nectarívoros (principalmente del género *Leptonycteris*) y con otros miembros de las comunidades áridas como las cactáceas columnares, han sido importantes en la evolución de los agaves. El enfoque en esta revisión es en el clado monofilético que llamamos *Agave* sensu lato (con ca. 208 spp) que incluye los dos subgéneros de *Agave* (*Agave* y *Littaea*), *Manfreda*, *Polianthes* y *Prochnyanthes*. En este grupo analizamos la radiación adaptativa dentro de la familia. Las estimaciones obtenidas usando datos moleculares con genes de cloroplasto fueron de 12 a 26 MA (millones de años) para el origen de la familia Agavaceae y de 10 MA para el clado de *Agave* sensu lato. Las tasas promedio de diversificación por millón de años fueron de $S = 0.32$ en *Agave* sensu lato y $D = 0.51$ eventos netos de especiación por millón de años (especies/MA), mientras que para *Yucca* son menores: D entre 0.2 y 0.15 especies/MA. Los valores que reportamos para *Agave* sensu lato son altos si los comparamos con otras radiaciones en plantas y animales, de modo que sugerimos que el proceso de desertificación en Norte América, que comenzó hace alrededor de 15 MA ha sido crítico en la radiación de *Agave* sensu lato.

2.2 Biología de la polinización y radiación adaptativa de la Familia Agavaceae, con especial énfasis en el género *Agave*

Aliso, 22(1), pp. 327–342

© 2006, by The Rancho Santa Ana Botanic Garden, Claremont, CA 91711-3157

POLLINATION BIOLOGY AND ADAPTIVE RADIATION OF AGAVACEAE, WITH SPECIAL EMPHASIS ON THE GENUS *AGAVE*

MARTHA ROCHA,^{1,7} SARA V. GOOD-ÁVILA,² FRANCISCO MOLINA-FREANER,³ HÉCTOR T. ARITA,¹
AMANDA CASTILLO,¹ ABISAÍ GARCÍA-MENDOZA,⁴ ARTURO SILVA-MONTELLANO,⁵ BRANDON S. GAUT,⁶
VALERIA SOUZA,¹ AND LUIS E. EGUIARTE¹

¹*Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología UNAM, Apartado Postal 70-275, México, D. F. CP 04510, Mexico;* ²*Department of Biology, Acadia University, Wolfville, Nova Scotia B0P 1X0, Canada;* ³*Departamento de Ecología Funcional, Instituto de Ecología UNAM, Apartado Postal 1354, Hermosillo, Sonora CP 83000, Mexico;* ⁴*Jardín Botánico Exterior, Instituto de Biología, UNAM, Apartado Postal 70-614, México, D. F. CP 04510, Mexico;* ⁵*Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo Apartado Postal 69, Pachuca, Hidalgo, CP 42001, Mexico;* ⁶*Ecology and Evolutionary Biology, 321 Steinhaus Hall, University of California, Irvine, California 92697, USA* ⁷*Corresponding author (mrocha@ecologia.unam.mx)*

ABSTRACT

Agavaceae is an American family that comprises nine genera and ca. 300 species distributed in arid and semiarid environments, mainly in Mexico. The family is very successful and displays a wide array of ecological, reproductive, and morphological adaptations. Many of its members play important roles as keystone species, because they produce abundant resources during the reproductive season. In this paper we analyze the current knowledge about the pollination ecology of the different genera in the family and the role that pollination systems have played in the ecological and phylogenetic success of the group. After providing an overview of each of the genera in the family, we discuss in detail aspects of the reproductive ecology of species in the genus *Agave* s.l., which is composed of ca. 208 species and includes subgenera of *Agave* (*Agave* and *Littaea*), *Manfreda*, *Polianthes*, and *Prochnyanthes*. Finally, we describe the results of analyses to test the hypothesis that there has been an adaptive radiation in the genus *Agave*. Using chloroplast and nuclear DNA sequences we estimate the age of the Agavaceae family and the genus *Agave* to be 12–26 millions of years ago (MYA) and 10 MYA, respectively, and show that mean rates of diversification were higher in the genus *Agave* than the genus *Yucca*. The values we report for rates of diversification in *Agave* s.l. are high when compared to other radiations in plants and animals. We suggest that the desertification of North America, which started ca. 15 MYA was critical in the radiation of agaves and that the generalist pollination system of *Agave* has been more successful in generating new species than the extreme specialization of *Yucca*.

Key words: adaptive radiation, Agavaceae, *Agave*, bats, *Leptonycteris*, pollination, reproductive ecology, *Yucca*.

THE AGAVACEAE FAMILY

Agavaceae are an American family distributed in arid to semiarid environments; the majority of species are found in Mexico. Currently nine genera and ca. 300 species are recognized in the family (see Bogler et al. 2005 and Table 1). All members of the family exhibit a similar basic structure in the arrangement of their rosette, flowers, and inflorescences. Moreover, they all share a basic chromosome number (karyotype), consisting of five large chromosomes and 25 very small ones. The only exceptions to this karyotype occur in polyploid species, which have two or more copies of the basic haploid chromosome set.

Traditional classification systems placed *Agave* and related genera as part of Amaryllidaceae based on the shared characteristic of the inferior position of the ovaries, while *Yucca* and the species related to it were classified as part of Liliaceae because their ovaries are superior. While the original classification of Agavaceae by Hutchinson (1934) included a wide diversity of species, more recent detailed morphological (Dahlgren et al. 1985; Alvarez de Zayas 1987; Hernandez 1995) and molecular studies (Eguiarte et al. 1994, 2000; Bogler and Simpson 1995, 1996; Bogler et al. 1995; Eguiarte

1995) have shown that the definition of Agavaceae should be restricted to include the genera and species found in Table 1. For a detailed account of Agavaceae and related taxa see Eguiarte et al. (2000).

Some other genera in the monocotyledons, such as *Hosta* Tratt. (Hostaceae) (Kubitzki 1998) found in Korea, China, and Japan, and some perennial bulbs from North America, such as *Chlorogalum* Kunth, *Hesperocallis* A. Gray, and *Camassia* Lindl., are now considered to be part of Hyacinthaceae, and are very closely related to Agavaceae. Detailed taxonomic studies are needed to determine if these genera should be considered part of Agavaceae or just closely related to the group (see Bogler et al. 2005).

Members of Agavaceae display a wide array of ecological, reproductive, and morphological adaptations to arid environments. The family has been important for people living in the Americas since prehistoric times, with various species providing clothes, rope, food, and beverages (both nonalcoholic and alcoholic) to humans. Currently, the family is of huge economic importance to Mexico because both tequila and mezcal are produced from *Agave* plants. In addition, fibers of significant economic importance are still de-

Table 1. Genera and species number in Agavaceae.

Genera	No. of species	No. of species in Mexico
<i>Agave</i> L.	166	125
<i>Beschorneria</i> Kunth	7	7
<i>Furcraea</i> Vent.	25	11
<i>Hesperaloe</i> Engelm.	5	5
<i>Hesperoyucca</i> (Engelm.) Baker	1	1
<i>Manfreda</i> Salisb.	28	27
<i>Polianthes</i> L.	13	13
<i>Prochnyanthes</i> S. Watson	1	1
<i>Yucca</i> L.	49	29
Total	293	217

rived from various species of the family, such as henequen and sisal from the *Agave* genus, as well as other fibers from *Yucca* and potentially from *Hesperaloe*.

GENERAL ECOLOGY OF THE FAMILY

Owing to a suite of morphological and physiological adaptations, members of Agavaceae are especially successful in arid and semiarid environments in the deserts and mountains of the Americas and play an important role as keystone species in these habitats because they produce abundant resources, mainly during the reproductive season, as will be discussed below.

While all Agavaceae species form rosettes, there is considerable variation in the extent of woodiness among species such that some are considered to be woody perennials, in particular species in *Agave* (i.e., *A. karwinskii* Zucc.), *Furcraea*, and *Yucca*, while others are completely herbaceous, producing leaves and inflorescences from a subterranean bulb, like all species in *Manfreda*, *Polianthes*, and *Prochnyanthes*. Most of the species are long-lived succulents, though leaf thickness can vary among species. Perhaps the most spectacular adaptation is in their reproductive ecology, as almost all *Agave*, *Furcraea*, and *Hesperoyucca* are monocarpic (semelparous); the rosette grows for several years, usually more than ten (see Eguiarte et al. 2000, for some estimates) and after producing a huge inflorescence, the rosette dies. However, though individual rosettes exhibit monocarpy, many species also reproduce clonally, such that a genet may survive for many generations. Though these three genera are monocarpic, all the other species (the group Striatæ of *Agave*, *Beschorneria*, *Manfreda*, *Polianthes*, *Prochnyanthes*, and *Yucca*) are polycarpic (iteroparous).

Although data on self-compatibility are scarce, most species are believed to be self-compatible. However, there is evidence that *Hesperaloe* is self-incompatible (Pellmyr and Augenstein 1997) and a few studies in *Agave* (Eguiarte et al. 2000; Molina-Freaner and Eguiarte 2003) have suggested that there may be some prezygotic barriers to reproduction although it is difficult to rule out intense inbreeding depression (Eguiarte et al. 2000; Slauson 2001).

The family displays a wide variation in pollination ecology, which we will describe in detail below; but briefly, most species are pollinated by nocturnal animals, some are pollinated mostly by moths, and in some species, hawkmoths (family Sphingidae) play an important role. *Yucca* and *Hes-*

peroyucca whipplei (Torr.) Trel. are only pollinated by *Tegeticula* and *Parategeticula* moths (Pellmyr 2003). The *Yucca*–*yucca* moth coevolution is considered, along with the fig–fig wasp interaction, as the premier example of extreme specialization and codependent pollination. Another set of species, mostly in *Agave*, is also pollinated during the night by bats, in particular by the genus *Leptonycteris* (Eguiarte et al. 2000). However, the bat pollination syndrome is “leaky” (that is, open to exploitation and usage by other visitors), since a large number of other animals is usually also involved in pollination (Proctor et al. 1996). Some other *Agave* species are primarily pollinated by bees, hummingbirds, and perching birds, in particular orioles (Ornelas et al. 2002).

Undoubtedly, pollination ecology has played an important role in the ecological and phylogenetic success of the group, but interestingly the most species-rich genera in the family, *Yucca* and *Agave*, have contrasting reproductive strategies. In *Yucca*, the pollination system is very restrictive (it includes only a set of specialized yucca moths), and involves a shift in rewards, from pollen and nectar to the developing ovules wherein the yucca moths lay their eggs. On the other hand, most species in the most diverse genus *Agave*, with ca. 166 species, have been selected to produce very large amounts of nectar and pollen, and are visited by a large coterie of pollinators, ranging from small insects to relatively large vertebrates such as perching birds and bats. While some species of *Agave* attract diverse pollinators, it has been suggested that *Agave* and bats are also an example of coevolution and mutualism (Gentry 1982; Arita and Humphrey 1988). In this paper, we analyze what is known about the pollination ecology of the different genera in Agavaceae and discuss their evolution in terms of what we know about the phylogeny and evolution of the family using molecular evolution and statistical tools.

PHYLOGENY OF THE FAMILY

Members of Agavaceae have been the object of several phylogenetic studies, both morphological (Alvarez de Zayas 1987; Hernández 1995) and molecular, using either chloroplast *rbcL* sequences (Eguiarte et al. 1994; Eguiarte 1995), restriction enzymes analyses of the chloroplast genome (Bogler and Simpson 1995), or ITS nuclear sequences (Bogler and Simpson 1995, 1996; Bogler et al. 1995; Eguiarte et al. 2000). The basic relationships among the main groups have been found to be congruent in the majority of the studies, and are shown in Fig. 1 (see also Bogler et al. 2005). In contrast, it has been very difficult to resolve the phylogeny within most genera and in *Agave* s.l. (which includes the genera *Agave* s.s., *Manfreda*, *Polianthes*, and *Prochnyanthes*), because little genetic variation is found at the sequence level in chloroplast and single copy nuclear markers. This is testimony to the relatively recent origin of the group, as we will explain later. Given the recent origins of many species in *Agave* s.l., the phylogenetic relationship among the species may be unresolvable because of either insufficient time for lineage sorting or hybridization and introgression, which also seem to be important within genera (Gentry 1982; Clary and Simpson 1995; Valverde et al. 1996).

The consensus tree of the phylogenetic relationship in

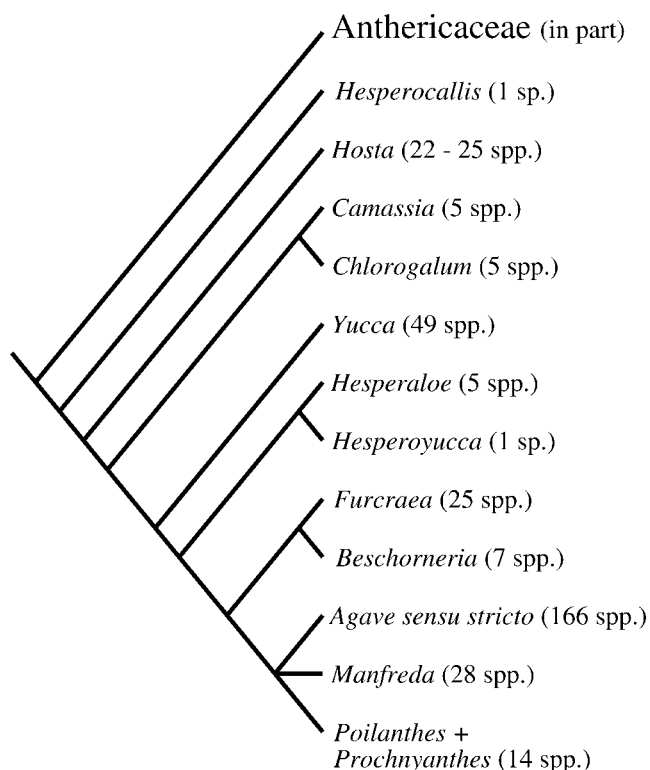


Fig. 1.—Agavaceae phylogeny.

Agavaceae, as depicted in Fig. 1, indicates that *Yucca* is the sister group of the remainder of the family. In most phylogenies, *Furcraea* and *Beschorneria* form a group, and they are a sister group to *Agave* s.l., which includes the subgenera of *Agave* (*Agave* and *Littaea* [Tagl.] Baker), and the herbaceous genera—*Manfreda*, *Poilanthes*, and *Prochnyanthes*—that represent the more derived lineages in the family.

ECOLOGY, NATURAL HISTORY, AND POLLINATION ECOLOGY OF EACH GENUS

Yucca

This is the second largest genus of the family (after *Agave*), with 49 species. It has the most northern distribution of any genus in the family, and various species can withstand cold climates extending as far north as the border between the USA and Canada and into the Midwest of the USA (Fig. 2A).

The genus is divided into three groups based on the structure of the fruit:

(a) *Clistocarpa* is defined by the presence of spongy fruits, but contains only one species, *Y. brevifolia* Engelm. (the Joshua tree), which is found in the deserts of southern California, Nevada, and a small section in Arizona.

(b) *Sarcocarpa* includes ca. 25 species with fleshy fruits (dates). These species are found throughout the southeastern USA and most of Mexico (except in sections of the west coast and the Yucatan Peninsula, where no *Yucca* species are found), and into the Lacandonian rain forest.

(c) *Chaenocarpa* contains ca. 25 species with dry fruits. They have a primarily northern distribution reaching up to

Canada and are widely distributed through the mid- and southern USA and northern Mexico.

Species of *Yucca* are long-lived perennials, usually with a trunk; some species grow very tall and become almost treelike with branches. The flowers of *Yucca* produce little or no nectar and are believed to be pollinated only by specialized moths of the genus *Tegeticula* and *Parategeticula* (but see Pellmyr 2003, for an extensive discussion). Originally, only three species of *Tegeticula* were documented (one that pollinated *Y. brevifolia*, another for *Hesperoyucca whipplei*, and another for the remaining *Yucca* species), but recently several new species of *Tegeticula* and *Parategeticula* have been recognized (Pellmyr 2003). Despite this greater diversity of yucca moths, all species are thought to behave in similar ways. *Yucca* moths actively collect pollen from several yucca plants, thereby pollinating the flowers, and then ovipositing in the developing ovules. Their larvae feed on the developing ovules, but rather than sacrificing future generations of *Yucca*, there is strong evidence that the ovules do not develop into seeds if there is an absence of yucca moths (Pellmyr 2003). In some *Yucca* species, cheater yucca moths have evolved that do not facilitate pollination, but only oviposit within the flowers and kill the seeds. Pellmyr and Leebens-Mack (1999) have examined in detail the molecular evolution and phylogenetics of *Tegeticula* moths, and estimated that they evolved ca. 40 MYA based on molecular clock analyses of mitochondrial genes in the moths. The fossil species *Protoyucca shadishii* Tidwell & Parker, from the Middle Miocene, has been interpreted as being close to the genus, because of its similarity to *Y. brevifolia* (Tidwell and Parker 1990).

Hesperoyucca

This genus includes only one species, *H. whipplei* (formerly known as *Yucca whipplei*, but it has been suggested that it is sufficiently distinct as to warrant generic rank), from California, Arizona, and northwestern Mexico (Fig. 2B). This trunkless yucca produces a compact *Agave*-like inflorescence and interestingly dies after reproduction, i.e., is monocarpic like most *Agave* species. It is also pollinated by a species of yucca moth, but has a relatively disjunct distribution that warrants further study—in particular, the Mexican populations in the middle of Baja California. Given the phylogenetic position of *H. whipplei*, which is more closely related to the genus *Hesperaloe* than to other *Yucca* species (Fig. 1), Bogler et al. (1995) argued that yucca moth pollination was either lost in the *Hesperaloe* genus or evolved twice, once in *Yucca* and again in *Hesperoyucca*.

Hesperaloe

This small genus, with five species, is closely related to *Yucca* (Fig. 1). The genus is restricted to northern Mexico and southern Texas (Fig. 2C). The plants are perennial, iteroparous, but without a trunk. Hawkmoths have been suggested to be the most important pollinators for the majority of species in the genus, but Pellmyr and Augenstein (1997) demonstrated that hummingbirds pollinate *Hesperaloe parviflora* J. M. Coult., while Engard (1980) reported bat visitation and large amounts of diluted nectar in *H. nocturna* Gentry. Experimental hand-pollinations by Pellmyr and Au-

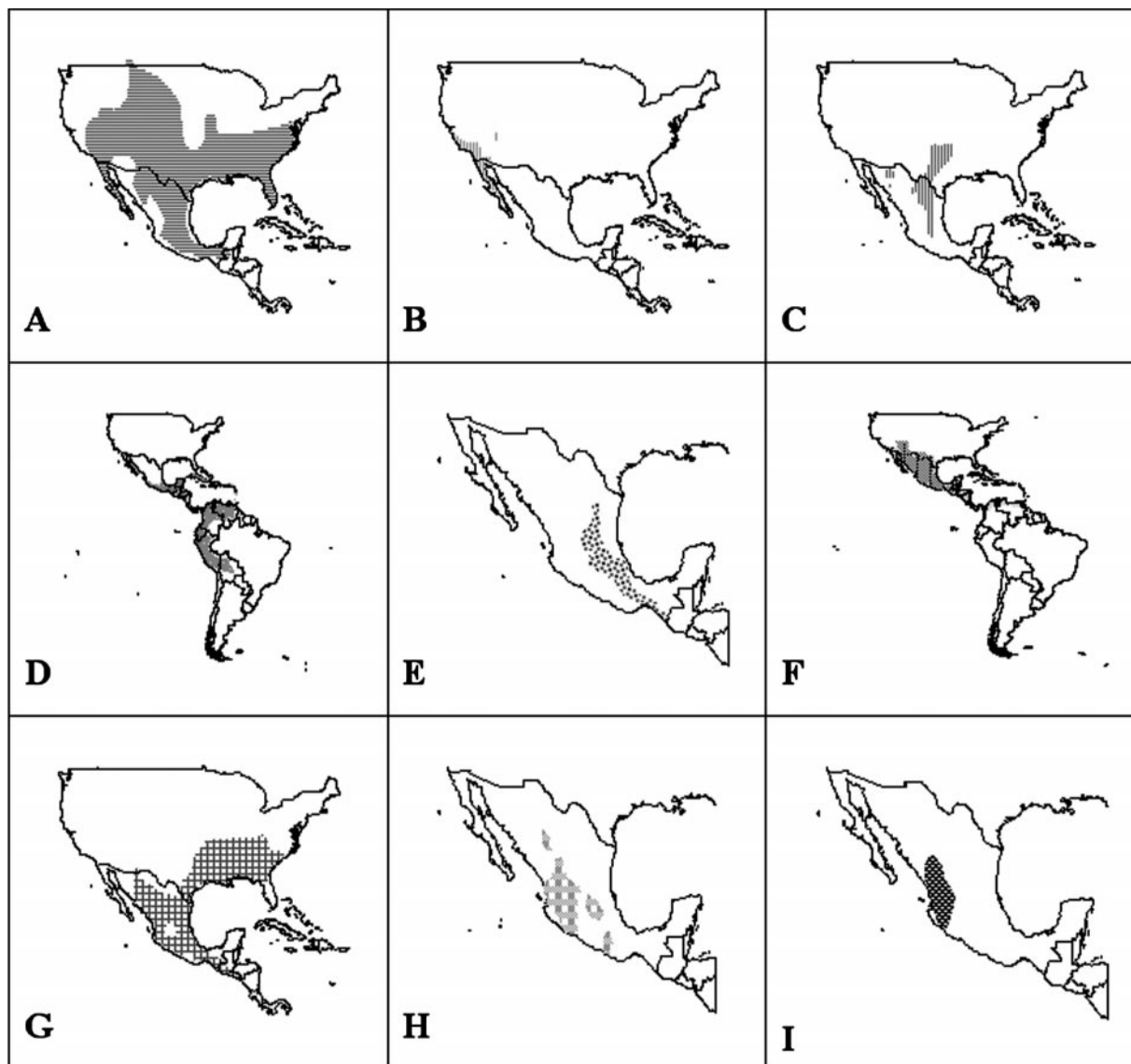


Fig. 2.—Distribution maps of the genera in Agavaceae. A. *Yucca*. B. *Hesperoyucca*. C. *Hesperaloe*. D. *Furcraea*. E. *Beschorneria*. F. *Agave* s.s. G. *Manfreda*. H. *Polianthes*. I. *Prochnyanthes*.

genstein (1997) indicated that *H. parviflora* might be self-incompatible. *Hesperaloe* species produce large numbers of flowers, but have a low fruit set (0.5–4.0%), so they appear to be obligate outcrossers.

Furcraea

This genus includes 25 species with its southernmost range reaching as far south as the Andes mountains (García-Mendoza 1999) (Fig. 2D). The genus is divided in two subgenera: *Roezlia* Baker and *Furcraea*. Subgenus *Roezlia* includes four species distributed from central Mexico to Guatemala, and has seedlings with one long cotyledon. The adults form large trunks with toothed leaves. Subgenus *Furcraea* has 21 species found from Mexico to Bolivia. Plants in this subgenus form rosettes with or without a trunk, bearing toothed or entire leaves and the seedlings have a short cotyledon.

Mexico is probably the center of origin for the genus and

contains 13 species (52%), nine of which are endemic. The rosettes in this genus are very large, similar to some of the largest in *Agave*, and some species have very thick, rigid, and spiny leaves, confused with those on agaves, while others have soft, nonspiny leaves, similar to those of some *Yucca*. All of the species are monocarpic, and most species display a trunk when mature (García-Mendoza 2001). Their inflorescences are massive, and measure from 3–12 m, but have a very different structure from the inflorescences of other genera. Inflorescences can be lax or dense. Dense inflorescences are divided into many branches and flowers. *Furcraea longaeva* Karw. & Zucc. can have up to 100 primary branches, from 30–50 secondary branches, and possess more than 58,000 flowers. In contrast, lax inflorescences, such as those in *F. quicheensis* Trel., possess from 40–80 branches and ca. 3000 flowers (García-Mendoza 2001). The flowers are large, radially symmetrical, and bell-shaped with pale coloration (white to pale green). Their sweetly fragrant

flowers open and release pollen and nectar at dusk and during the night. Given these characteristics, the flowers are suspected to be moth pollinated; moreover, the nectar is secreted in the mouth of the nectary and appears as droplets as in other insect-pollinated plants (Faegri and van der Pijl 1979; Percival 1979). However, there have been few observations of pollination in the field or in botanical gardens and no moth visitations have been documented (Eguiarte et al. 2000; García-Mendoza pers. obs.). Hummingbirds have been observed visiting *Furcraea* during the day, although no nectar or pollen production was observed during these times (García-Mendoza, pers. obs.). Many of the species in the genus have small, clonal populations, often occurring on mountain tops, and fruit set is very low; non-pollinated flowers can develop into bulbils that are dispersed around the maternal plant, and may contribute to the formation of clonal populations. Each plant can produce thousands of bulbils: *F. macdougallii* Matuda produces more than 15,000 bulbils that persist on the inflorescence even after the plant has died (García-Mendoza 2001). It is believed that the species propagates primarily by bulbil production. Of the 25 species of *Furcraea*, 23 produce bulbils, but only 15 can reproduce in this way. Even if the inflorescences produce many flowers, they can generate hundreds of bulbils, but only 4–30 fruits (García-Mendoza 2001). It is believed that the treelike form of the genus is ancestral and that species have become progressively more herbaceous. Concomitant with the decrease in overall size, has been a decrease in the complexity of the inflorescence (García-Mendoza 2001).

Beschorneria

This is another small and poorly understood genus, with only seven species found in the Sierra Madre Oriental and central Mexico (Fig. 2E). The plants have soft leaves, few spines, and some species may produce a trunk and are found in rocky habitats, from 1900–3400 m. Hummingbirds have been suggested as the primary pollinators for most species, given the reddish color and the tubular shape of the flowers, but at least some species may be hawkmoth pollinated. All species are considered to be polycarpic, but fieldwork and detailed studies are needed in all the species.

Agave Sensu Stricto

This is the largest genus in the family, with ca. 166 species. Most of the species are found in Mexico (ca. 125 species). Of the remaining species, some are found in the southwestern USA, with ca. 15 species, mostly from Arizona, 12 in the Antilles (Alvarez de Zayas 1987; Rogers 2000), and the rest in Central America and northern South America (i.e., Colombia, Peru, and Venezuela) (Fig. 2F). The highest diversity of *Agave* occurs in central Mexico, in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, the canyon “Barranca de Mezquital,” the Sierra Madre Occidental, and the Chihuahuan Desert regions (García-Mendoza 2002; Tambutti 2002). This area is called Megamexico 3 (Rzedowski 1993) and may be the center of origin for the genus. An important fact is that most species of *Agave* have narrow endemic ranges, and are typically only found in a few specific habitats and mountain ranges. For instance, García-Mendoza (1995) and Tambutti (2002) estimated that most Mexican *Agave* s.s. species are only found

in three or less squares of one degree of latitude per one degree of longitude. As each square represents ca. 12,100 km², the total spatial distribution of most species is found in areas of less than 36,100 km², the equivalent to a square of 190 × 190 km. Obviously, a species never covers the entire area and its real distribution is much smaller. There are some exceptions, species such as *A. cerulata* Trel. in Baja California, *A. angustifolia* in all of Mexico, and *A. lecheguilla* and *A. scabra* (Ortega) McVaugh in the Chihuahuan Desert not only have large distributions, but also are composed of several million individuals (Gentry 1982).

Agave has been traditionally divided in two subgenera (Berger 1921; Gentry 1982), defined on the basis of the inflorescence type: subgen. *Littaea*, which has an unbranched spike or racemose inflorescence, containing ca. 53 species with a more restricted distribution, primarily in Mexico, and subgen. *Agave*, whose species possess branched (paniculate) inflorescences, i.e., large umbelliferous aggregates of flowers (Gentry 1982) with ca. 102 species (see Fig. 2F). *Agave* subgen. *Littaea* was proposed to represent the ancestral form of the genus (Gentry 1982), although recent data suggest that subgen. *Agave* is paraphyletic (Bogler and Simpson 1996; Eguiarte et al. 2000; Good-Ávila et al. submitted). Also, it must be remembered that the genus *Agave* is paraphyletic, because within the *Agave* clade are found the genera *Manfreda*, *Polianthes*, and *Prochnyanthes*. Because it is currently unclear whether paraphyly at the molecular level is caused by insufficient time for lineage sorting to have occurred, we retain the traditional genera.

Manfreda

This is also a poorly understood genus, with ca. 28 species, most of which occur in Mexico (Fig. 2G), *M. brachystachya* (Cav.) Rose (= *M. scabra* Ortega) is found from central Mexico down to Central America, and *M. virginica* (L.) Salisb. ex Rose is found in the southeastern USA. *Manfreda virginica* grows on limestone outcrops, in juniper glades, and in open woods from West Virginia to Illinois, and south to Florida and Texas.

This genus is closely related to *Agave* as their flowers are very similar, although the leaves of the *Manfreda* species are soft, unlike the hard spiny leaves of most *Agave* species. *Manfreda* leaves are drought deciduous with new leaves and inflorescences produced the following year (using stored nutrients from their rhizomes) so the plants are iteroparous. There are two detailed studies of *Manfreda* species, one for *M. brachystachya* growing in central Mexico (Eguiarte and Búrquez 1987, 1988; Eguiarte et al. 2000), and another for *M. virginica* by Groman and Pellmyr (1999). Both species are visited during the day and night, but in doing diurnal vs. nocturnal exclusion experiments, both studies demonstrated that the primary pollinators are nocturnal animals. In *M. brachystachya* the main pollinators were nectarivorous bats such as *Leptonycteris curasoae* and *Anoura geoffroyi*. Additionally, hawkmoths were observed in *M. brachystachya*, while hawkmoths and medium-sized moths were the most important pollinators in *M. virginica*. In general, it has been suggested that the genus is adapted to moth and hawkmoth pollination (Cruden et al. 1983; Eguiarte et al. 2000). Experi-

ments done by Eguiarte and Búrquez (1987) indicated that *M. brachystachya* is self-compatible.

Polianthes

This is another small genus, comprising 13 species, all from Mexico, most of which are from the State of Jalisco (Fig. 2H). This genus is closely related to *Manfreda*, but is more herbaceous, with more delicate leaves and inflorescences. Most species have whitish flowers, but *P. geminiflora* (Lex.) Rose, has reddish-orange flowers, and *P. densiflora*, yellow ones. The species *P. tuberosa* L. is widely cultivated for its flowers and fragrance (tuberose, *nardo* in Spanish). Hawkmoth pollination has been suggested for most species except for *P. geminiflora*, which has been considered to be pollinated by hummingbirds, not only for its color but also because it produces nectar in the late afternoon (Cruden et al. 1983). Verhoek (1975) demonstrated that *P. geminiflora* is self-compatible.

Prochnyanthes

This monotypic genus, *Prochnyanthes mexicana* Rose, has a relatively wide distribution in west-central Mexico, from Durango and Nayarit to Michoacan (Fig. 2I). The species is very closely related to *Polianthes* and possibly belongs to that genus. The primary difference between the two genera being that the flowers of *Prochnyanthes* have a very distinct structure with a narrow tubular corolla that widens markedly in the middle. The flowers are whitish or pale green and produce nectar with a volume and sugar concentration suggesting pollination by hawkmoths or other moths, yet the structure of the flowers is more suggestive of bee pollination (Cruden et al. 1983; Eguiarte et al. 2000).

Other Genera Closely Related to Agavaceae

Camassia.—*Camassia* bulbs produce clumps of slender green leaves and their flowers are formed in spikes. The inflorescence is usually dense and produces a stalk, which bears as many as 100 star-shaped flowers that are loosely clustered and large (4–5 cm). The flowers vary in color from white to blue or purple, but are usually pale lavender, and give off a delicate and sweet scent (McGary 2001).

Hesperocallis.—This monotypic genus, *Hesperocallis undulata* A. Gray, is found in some of the most arid regions of North America (Pires et al. 2004). Its leaves are blue-green with white margins, undulate, basal, and 20–50 cm long. Flowers are large (4–5 cm), trumpet-shaped, and white to cream with a silver or green midstripe. Their fragrance is delicate (Munz 1962; McGary 2001).

Chlorogalum.—This genus comprises five species. *Chlorogalum purpureum* Brandege (purple amole) forms a basal rosette of typically 4–7 bright green leaves that are linear and flat at the base that produces a stem with multiple branches that supports a few bluish-purple flowers. In contrast, the common soap plant (*C. pomeridianum* Kunth) has white flowers that open in the twilight or at night. Reproduction is primarily by seed, with increased seed set apparent with insect pollination. Another species, *C. parviflorum* S. Watson, is found in dry, coastal sage scrub from central

and southern California to northern Baja California. In this species, flowers open at dawn, but last only one day and have an unpleasant aroma consistent with fly pollination (McGary 2001).

Hosta.—This genus is endemic to eastern Asia and contains approximately 22–25 species. Also known as plantain lily or funkia, several species are grown primarily for their attractive foliage, which comes in a wide range of colors including green, green variegated with white, cream or yellow, blue-green, golden yellow, and greenish yellow. Many hostas produce spikes of tubular-, trumpet- or bell-shaped flowers in different shades of purple or white, some of which are very fragrant, consistent with their pollination bybumblebees (Aden 1988; Eguiarte et al. 2000).

FLORAL BIOLOGY AND REPRODUCTION IN AGAVACEAE: *YUCCA* AND *AGAVE*

As discussed before, members of Agavaceae present a wide range of reproductive strategies. Species can vary from extreme floral specialization, such as occurs between *Yucca* and yucca moths, to apparent generalization in the case of *Agave*, especially species such as *A. marmorata* Roetzl that has an impressive list of floral visitors and pollinators.

An interesting question in plant evolutionary biology is how highly specialized or generalized plant–pollinator interactions influence the evolution of reproductive structures and patterns and ultimately population structure and rates of speciation. In Agavaceae, specialized plant–pollinator interactions in the *Yucca*–yucca moth relationship appear to have evolved as a response to selection pressures mutually imposed by both plants and pollinators (Pellmyr et al. 1996), which has left a very efficient pollination syndrome even if it is open to some exploitation by cheaters. Highly specialized morphological structures or reproductive strategies have developed on both the yucca moths and yucca flowers, such as the specialized complex tentacles of the yucca moth which facilitate pollen collecting (Pellmyr and Krenn 2002) and a reduction in locule egg mortality to reduce moth damage by yucca flowers (Addicott and Bao 1999).

On the other hand, plants are expected to adopt a more generalized pollination syndrome when plant rewards are similar among different species, when traveling is costly for pollinators, and their life span is longer than flowering time in the plant species (Waser et al. 1996). Although these general plant–pollinator interactions may also be a consequence of adaptation to some “messy” visitors such as bats. The broad, evolutionary trends in plant–pollinator relationships that have evolved in Agavaceae are summarized in Pellmyr et al. (1996). Fruit production is resource limited across the family (Sutherland 1982); nocturnally opening flowers and high nectar production are common in most species, but nectar production has been lost in yuccas. Local host specificity, an important precursor for the evolution of pollination specialization, is common in moths of the Prodoxidae. Oviposition into flowers has evolved two to three times in this family, and limited larval seed destruction is widespread. Passive pollination has evolved twice within moths of the genus *Greya*, which is the sister genus to yucca moths, but active pollination has evolved only once in the ancestor of yucca moths *Tegeticula* and *Parategeticula*. Only active pol-

lination and mouth parts specialized for collecting pollen are unique to yucca moths (Pellmyr et al. 1996).

In contrast, there is variation in the floral morphology among the many species in *Agave*, but in general their flowers are robust, of pale color, varying from light green to yellow, or even red. Pollen and nectar are produced mainly at night, nectar is abundant, sugar concentration is low (between 12–25%), protein content of the pollen is high, and sometimes the flowers emulate the smell of ripening fruit. Most species are protandrous: the anthers dehisce and shed pollen prior to stigma receptivity (Howell 1972; Gentry 1982; Eguiarte et al. 2000; Slauson 2001). All of these floral traits suggest adaptation to bat pollination or chiropterophily (Faegri and van der Pijl 1966, 1979).

Systematic pollination studies in *Agave* started in the 1970s; the first studies were performed mainly in the southwestern USA and suggested that subgen. *Agave* was predominantly pollinated by bats and sometimes by hawkmoths (Howell 1972; Faegri and van der Pijl 1979; Gentry 1982). An account of the results obtained to date for other species is found in Table 2. On the other hand, Schaffer and Schaffer (1977b) suggested that agaves in subgen. *Littaea* were primarily pollinated by insects. Floral traits associated with insect pollination syndrome are indeed present in some species in subgen. *Littaea*, where floral tubes are smaller and in a horizontal position (making the insects more efficient pollinators), nectar production is less abundant, sugar concentration is high, floral color is more attractive to insects, and flowers are sweet smelling. In fact, there have been reports of species in this subgenus pollinated primarily by bees and sometimes by hummingbirds (Schaffer and Schaffer 1977b; Slauson 2001); and Eguiarte et al. (2000) suggested that hawkmoths are the most important visitors. A list of floral attributes and visitors reported in *A.* subgen. *Littaea* is found in Table 3.

Several other more detailed studies have been published recently describing the dynamic of pollination assemblages for species in both subgenera and include more data from different Mexican populations (Tables 2 and 3). Apparently the traditional view of pollination syndromes in subgen. *Agave* and *Littaea* is being challenged (see below).

RECENT ADVANCES IN THE POLLINATION
ECOLOGY OF AGAVE

Agave angustifolia and *A. subsimplex*

Molina-Freaner and Eguiarte (2003) analyzed the pollination biology of two paniculate species: *Agave angustifolia* and *A. subsimplex* in Sonora in northwestern Mexico. *Agave angustifolia* has the widest distribution, ranging from El Salvador and Honduras to central Sonora, while *A. subsimplex* has a localized distribution in the coastal regions of central Sonora and on the Island of Tiburon. *Agave angustifolia* flowers from January to late May, with a peak in March, while *A. subsimplex* flowers from early April to early June, with a peak in May. *Agave angustifolia* flowers produce more nectar (ca. 180 μ L per night) than *A. subsimplex* (ca. 40 μ L per night), although nectar concentration was similar in the two species (from 18–26% in *A. angustifolia*, and from 22–25% in *A. subsimplex*). Hand pollination experiments suggest that both species are self-incompatible. Pol-

Table 2. Major features in the pollination biology of paniculate agaves [*A.* subgen. *Agave*].

Species	Nectar volume	Nectar concentration	Anther dehiscence	Major visitors	Reference
<i>Agave angustifolia</i> Haw.	180 μ L/night	18–26%	nocturnal	bats, birds & bees	Molina-Freaner and Eguiarte 2003
<i>A. chrysantha</i> Peebles	470 μ L/night	14–18%	nocturnal	large bees, hummingbirds, & hawkmoths	Slauson 2000
<i>A. havardiana</i> Trel.	?	?	?	birds & bats	Eguiarte et al. 2000
<i>A. macroacantha</i> Zucc.	110 μ L/day	?	nocturnal	bats, hawkmoths, & bees	Arizaga et al. 2000
<i>A. mckelveyana</i> Gentry	?	?	nocturnal	bees & wasps	Sutherland 1987
<i>A. palmeri</i> Engelm.	713 μ L/night	14–19%	nocturnal	hawkmoths, large bees, & hummingbirds	Slauson 2000
<i>A. salmiana</i> Otto	102 μ L/2 hr	12%	nocturnal	bats & birds	Eguiarte et al. 2000
<i>A. subsimplex</i> Trel.	40 μ L/night	22–25%	nocturnal	bees, moths & bats	Molina-Freaner and Eguiarte 2003

Table 3. Major features in the pollination biology of spicate agaves [*A. subgen. Littaea*].

Species	Nectar volume	Nectar concentration	Anther dehiscence	Major visitors	Reference
<i>Agave</i> sp.					
<i>A. celsii albicans</i> Hook var. <i>albicans</i> (Jacobi) Gentry	91.5 μ L/day 132.5 μ L/day	13.6% 14.7%	nocturnal nocturnal	bees, large bees, & bats bees, large bees, bats, hawkmoths & hummingbirds	Rocha et al. 2005 Rocha et al. 2005
<i>A. difformis</i> A. Berger	83 μ L/day	13%	nocturnal	bees, large bees, & bats	Rocha et al. 2005
<i>A. garciae-mendozae</i> Galván & L. Hern.	124 μ L/day	10–15%	nocturnal	bees, large bees, & bats	González 2004
<i>A. lecheguilla</i> Torr.	50–190 μ L/day 0.9 μ L/day	12–52% 37.4%	nocturnal diurnal	hawkmoths, large bees, & hummingbirds large bees	Eguiarte et al. 2000 Schaffter and Schaffter 1977b
<i>A. parviflora</i> Torr.					Schaffter and Schaffter 1977b
<i>A. schottii</i> Engelm.	11.6 μ L/day	18%	nocturnal	bees, hawkmoths, & hummingbirds	Schaffter and Schaffter 1977b
<i>A. striata</i> Zucc.	218.8 μ L/day	19.3%	diurnal	bees, large bees, bats, hawkmoths & hummingbirds	Rocha et al. 2005
<i>A. toumeyana</i> Trel.	4.6 μ L/day	62.3%	nocturnal	large bees	Schaffter and Schaffter 1977b
<i>A. xylonacantha</i> Salm-Dyck	117.6 μ L/day	24.6%	nocturnal	bees, large bees, bats, hawkmoths & hummingbirds	Rocha et al. 2005

linator exclusion experiments, direct observation, and bat capture demonstrated that *Leptonycteris curasoae* was the most effective pollinator in *A. angustifolia*, but for *A. subsimplex* diurnal (bees, in particular *Apis mellifera*) and nocturnal pollinators (mainly moths and some visits by *L. curasoae*) were equally effective. Populations of *A. angustifolia* that lie within the foraging range of their bat pollinators have high rates of sexual reproduction while populations at the limits of the foraging range exhibit significant variation in reproductive output and change from sexual to asexual reproduction (Molina-Freaner and Eguiarte 2003). We hypothesize that *A. subsimplex* is, in part, less frequently visited by *Leptonycteris* bats because its flowering time coincides with that of several local columnar cacti, which produce larger amounts of nectar per flower (i.e., *Pachycereus pringlei* Britton & Rose and *Carnegiea gigantea* (Engelm.) Britton & Rose; Molina-Freaner pers. obs.).

Agave marmorata: Oriole Pollination in Subgenus Agave?

Ornelas et al. (2002) studied floral biology and pollinator diversity and efficiency in this species in the Tehuacán Valley in Puebla (central Mexico). The inflorescences of *A. marmorata* are ca. 6 m in height; their flowers are bright yellow and bear small tubular corollas (14–16 mm). Pollen is released at night, as in most agaves, and most nectar production also occurs then (576.6 μ L per flower per night), even though the species produces a “considerable amount during the day” (Ornelas et al. 2002). Nectar concentration ranges widely (9–37% “Brix” or sucrose equivalents). At night *Choeronycteris mexicana*, *Leptonycteris nivalis*, and hawkmoths visit the flowers, but are not considered to be pollinators by the authors because “bats used flowers by flying to and instantaneously sitting on the perianth of the peripheral flowers, making no contact with anthers and stigmas” (Ornelas et al. 2002). During the day, hummingbirds accounted for 50.2% of the diurnal visits, and at least six species visited the flowers. In addition, nine different species of perching birds accounted for another 42.5% of the visits. Carpenter bees (*Xylocopa* sp.) accounted for the remaining 7.3% of diurnal visits. Because hummingbirds captured during the study had no visible pollen on their bodies and were observed to forage primarily along peripheral flowers, it was concluded that they were not important pollinators, while orioles fed mostly while sitting on the top and center of the umbels, coming into contact with the anthers and were observed to be dusted with pollen. For these reasons, perching birds, in particular orioles, are considered by Ornelas et al. (2002) the legitimate pollinators of *A. marmorata*. Unfortunately, no controlled diurnal vs. nocturnal pollinator experiments were performed and, for the moment, we can only conclude that orioles may be important pollinators, but more detailed experiments from more plants in diverse localities are required.

Geographic Changes in the Reproductive Ecology in Agave Subgenus Littaea

To date, the most detailed study published on the reproductive biology of a species of subgen. *Littaea* is for *A. lecheguilla* (Silva-Montellano 2001; Silva-Montellano and Eguiarte 2003a, b). *Agave lecheguilla* has a broad distribu-

tion throughout the Chihuahuan Desert, ranging from north of the Valley of Mexico City to southern Texas and New Mexico (Gentry 1982; Briones 1994). Silva-Montellano and Eguiarte (2003a) and Cadaval-Narezo (1999) studied ten populations encompassing most of the natural distribution of the species. Through a latitudinal gradient from 20°N to 32°N they studied populations at approximately every latitudinal degree. They found that the accumulated nectar volume per flower decreased along the latitudinal gradient (Silva-Montellano 2001). They also observed a latitudinal change in the shape and color of flowers: flowers in northern populations are shorter and the corolla is more splayed than in southern populations. Flower color varied from pale light green (glaucous) in the south to deep red in the north (Silva-Montellano and Eguiarte 2003a). They also identified a wide variation in the number of visits per flower and in the identity of the floral visitors, including hawkmoths, hummingbirds, and bees. On average, flowers in the south had greater rates of visitation than flowers in the north and greater fruit set, i.e., higher pollinator efficiency. During a total of 54 hours of nocturnal observation, they did not observe a single bat visit (Silva-Montellano and Eguiarte 2003b). Detailed diurnal vs. nocturnal controlled pollination experiments showed that nocturnal visitors were the most important pollinators in southern populations (moths, mainly the hawkmoth *Hyles lineata*), while in central populations the nocturnal were as important as the diurnal pollinators (mainly large bees such as *Bombus* and *Xylocopa*, as well as hummingbirds). On the other hand, genetic analyses suggested that rates of outcrossing were high in the south, intermediate in the central populations, and low in northern populations (Silva-Montellano 2001).

These studies underscore two important facets of plant reproductive ecology. First, even in a single species there can be ample variation in reproductive ecology, floral traits and the suite of pollinators that mediate them among populations. Second, although *Agave lecheguilla* appears to be adapted to nocturnal pollination, no bat visitors were found, which supported the classic hypothesis for the pollination syndrome in *A.* subgen. *Littaea*.

Bat Pollination in a Group of Sympatric Agave Subgenus Littaea in Central Mexico

In contrast to *Agave lecheguilla*, we have data for six species in *A.* subgen. *Littaea*, which suggest that bats, in particular *Leptonycteris curasoae* (but also *Choeronycteris mexicana* and *Glossophaga* sp.), are important pollinators. This study was carried out in the Metzütlán Canyon in central Mexico, in one of the richest regions of *Agave* diversity (González 2004; Rocha et al. 2005). These species in *A.* subgen. *Littaea* have more localized distributions than *A. lecheguilla* and, in addition to having different microhabitats in the same locality (i.e., some species are found in steeper, rockier, and dryer areas than others), they exhibit diverse flowering phenologies: *A. xylonacantha* and *A. celsii* var. *albicans* (Jacobi) Gentry flower in spring; *Agave* sp. (which is currently being described) flowers in the autumn, while the remaining three species, *A. difformis*, *A. garciae-mendozae* Galván & L. Hern., and *A. striata* flower in summer at overlapping times. In addition, a different coterie of pol-

linators visits each species. The pollinators also vary between years and localities within the study area (Rocha et al. 2005). For instance, in *A. difformis* we observed that bees were the most frequent visitors in 2001, while in 2002 we recorded a higher frequency of bat visitors. In *A. garciae-mendozae* bees and bats seemed to be similarly abundant (González 2004). *Agave xylonacantha*, *A. celsii* var. *albicans*, and *A.* sp. show a similar pattern: bats are the most important pollinators, but there are minor visits from other animals. Finally, *A. striata* showed the most diverse range of pollinators and the highest overall visitation rates, including visits from honeybees, bumblebees, hawkmoths, hummingbirds, and bats. *Agave* sp., *A. xylonacantha*, *A. celsii* var. *albicans*, *A. garciae-mendozae*, and *A. difformis* are nocturnal nectar producers, whereas *A. striata* begins to produce nectar early in the afternoon. The volume and concentration of nectar were high in all species and similar to that in other bat-pollinated plants (see Table 3). Our observations suggest that species are potential competitors, as they share floral visitors. But, in order to reduce competition, plants may change their phenology (as we see in *A. xylonacantha* or in *Agave* sp.), or use different pollinator assemblages (such as *A. striata*). Alternatively, one species (*A. garciae-mendozae*) is isolated geographically (in the higher sections of the canyon). *Agave striata* and *A. difformis* share the same microhabitats, but *A. striata* relies more on asexual reproduction and its fruit set is very low (Rocha et al. 2005). These results suggest that in more complex communities with diverse but variable pollinating fauna, *Agave* species may show complex patterns of interaction with multiple pollinators.

EVOLUTION OF THE POLLINATION SYSTEMS IN AGAVE: GENERALIZATION OR COADAPTATION TO *LEPTONYCTERIS*?

These recent studies represent an important advance in our understanding of the evolution of *Agave* and underscore that, as more data accumulates, the simple patterns originally proposed for the genus will probably not hold. On the one hand, some agaves in subgen. *Littaea* may indeed be pollinated primarily by insects (either by bees or hawkmoths), while others are clearly pollinated by *Leptonycteris* bats (Table 3) as was previously shown in *Manfreda brachystachya* by Eguiarte and Búrquez (1987). On the other hand, birds, particularly perching birds and hummingbirds, may indeed be the most important pollinators in species of subgen. *Agave* (Table 2). But still, *Leptonycteris* has been reported in detailed studies (Eguiarte et al. 2000; Slauson 2001; Rocha et al. 2005) and in most cases is not only relevant, but the single most important pollinator.

We suggest the following scenario, based on what is known of the adaptive radiation of *Agave* s.l. (see below) and about the phylogeny of Phyllostomid bats (Wetterer et al. 2000; Simmons and Wetterer 2002). Nectar feeding New World bats are estimated to have evolved no more than 15 MYA (Proctor et al. 1996) and Wilkinson and Fleming (1996), using mitochondrial sequences of the control region, estimated that *Glossophaga* and *Leptonycteris* shared a common ancestor about 2.4 MYA and that the two *Leptonycteris* species diverged ca. 1 MYA. We suggest that ca. 10–11 MYA (Eguiarte 1995; Good-Ávila et al. submitted, and see below), a moth-pollinated lineage of Agavaceae started to

specialize to a generalist Phyllostomid bat (for a review of bat adaptations to agave and cactus pollination see Howell 1972, Howell and Hodgkin 1976, and Flemming and Nassar 2002, and for a discussion of agave adaptations to bat pollination see Slauson 2001). The bats selected for a large floral display, a larger volume of nectar, and increased reproductive effort (Schaffer and Schaffer 1977a). While pollination by bats is efficient in producing high-quality outcrossed seeds, bat pollination of early agaves may have been so costly that it killed the plant: all of the modern species in subgen. *Agave* has delayed reproduction, monocarpy, and massive flowering (see also Schaffer and Schaffer, 1977a; in other species, such as some of those in Bombacaceae, columnar cacti, and *Manfreda* that are bat pollinated, the plants also display synchronous, massive flowering [Eguiarte et al. 1987; Eguiarte and Búrquez 1987; Flemming et al. 2001]). In time, the bat lineages evolved into two nectarivorous species, *Leptonycteris nivalis* in the central Mexican highlands and the more tropical *L. curasoae* (see Arita 1991), which initiated an adaptive radiation of *Agave* in response to diverse habitat selection that occurred in synchrony with a radiation of bat-pollinated columnar cacti in Mexico and northern South America (see below). As noted earlier, the bat pollination system is in general a leaky system, open to exploitation and usage by other visitors. Thus, secondarily and very recently, some *Agave* species have evolved to rely on other pollinators. These *Agave* species include *A. lecheguilla*, *A. marmorata*, the species in subgen. *Littaea* from Arizona described by Schaffer and Schaffer (1977b), and hawkmoth-, bee-, and hummingbird-pollinated species in *Manfreda*, *Polianthes*, and *Prochnyanthes* (see below). These hypotheses involve the mutual adaptation of a few bat species with a large number of *Agave* and columnar cactus species, and interactions with a large guild of possible secondary and minor pollinators, as well as nectar and pollen robbers. A clear advantage of generalization for pollination services for the animals is that they can use other plants, such as cacti, when for some reason resources in *Agave* flowers are not available.

COLUMNAR CACTI: ANOTHER PIECE IN THE PUZZLE

Bat pollination occurs mainly in the tropics, and bats are found mainly where there is a succession of suitable flowers for them all year-round (Arita 1991; Proctor et al. 1996). Phenological data from paniculate agaves and columnar cacti suggest that both groups form a nectar corridor during bat migration (Gentry 1982; Arita 1991; Fleming et al. 1993; Molina-Freaner and Eguiarte 2003). Columnar cacti belong to the tribe Pachycereeae, which contains 58 species (Dávila-Aranda et al. 2002), in which 70% of the species present a bat pollination syndrome: nocturnal dehiscence, white flowers, production of high volumes of nectar and pollen, and a putrid smell (Valiente-Banuet 2002). These cacti are strictly bat pollinated in south-central Mexico, whereas bats, insects, or birds are the effective pollinators of these species in the Sonoran Desert (Fleming 2000). Pollination systems of cardon (*Pachycereus pringlei*), organ pipe (*Stenocereus thurberi* [Engelm.] Buxb.) and saguaro (*Carnegiea gigantea*) are more generalized than those of their bat-pollinated relatives. In the case of columnar cacti, diurnal visitors are not effi-

cient pollinators, probably because the stigmas of these flowers lose their receptivity during daytime or because the flowers actually close before sunrise. Valiente-Banuet et al. (1996) suggested that pollination generalization is favored along the northern distribution limits of columnar cacti because of year-to-year variation in the abundance of migratory nectar-feeding bats. It has been shown that, at least in Mexico and the southwestern USA (i.e., Megamexico 3 according to Rzedowski 1993), sexual reproduction of columnar cacti from tropical deserts depends almost exclusively on nectar-feeding bats, whereas bats and diurnal pollinators are important in extratropical deserts near or beyond the limits of distribution for *L. curasoae* (Fleming et al. 2001; Valiente-Banuet 2002). The dependence of tropical columnar cacti on *L. curasoae* has also been documented in Venezuela by Nassar et al. (1997, 2003). Previous evidence suggested that this pattern could be found in *A.* subgen. *Agave*, i.e., that within the tropics, agaves tend to be more specialized to bat pollination by *Leptonycteris* and show moderated generalization outside the tropics (see Table 2; and Arizaga et al. 2000; Slauson 2000, 2001).

NECTAR FEEDING BATS IN MEXICO

As confirmed before, *Agave* species mainly occur within the distribution range of nectarivorous bats (although some *Agave* species in the USA are out of the range of any nectarivorous bats). Mexico has a high diversity of nectar-feeding bats—12 species (Phyllostomidae subfamily Glossophaginae): *Anoura geoffroyi*, *Choeroniscus godmani*, *Choronycteris mexicana*, *Glossophaga soricina*, *G. morenoi*, *G. comissarisii*, *G. leachii*, *Hylonycteris underwoodi*, *Leptonycteris nivalis*, *L. curasoae*, *Lichonycteris obscura*, *Musonycteris harrisoni*, most of which are associated with tropical and subtropical dry areas (Santos and Arita 2002). The wealth of nectar-feeding bat species in Mexico reaches maximum values along the Pacific versant (the Balsas region) and decreases with latitude (Arita and Santos-del-Prado 1999; Rojas-Martínez et al. 1999). Of these species, the degree of nectarivory (and pollinivory) varies, from some occasional nectar-feeding species, such as *Glossophaga soricina* (Reid 1998) to the genus *Leptonycteris*, which depends almost exclusively on nectar and pollen. Two species of *Leptonycteris* are generally recognized, *L. curasoae* and *L. nivalis*, and both feed mainly on agaves and columnar cacti (Arita and Humphrey 1988; Rojas-Martínez et al. 1999), although in the dry forest they may feed mostly on tropical tree species, such as *Ceiba* Mill. and *Pseudobombax* Dugand (Alvarez and González-Quintero 1970; Ceballos et al. 1997). Available evidence indicates that *L. curasoae* is resident year-round in the tropics and migrates to extratropical areas. This species is locally abundant and is usually the most common bat visiting agave and columnar cacti in Mexico and Venezuela and has a widespread distribution, from Arizona to Honduras and El Salvador in central America to northern Venezuela and northeastern Colombia in South America and adjacent islands (Reid 1998; Arita and Santos del Prado 1999; Rojas-Martínez et al. 1999). The abundance of *L. curasoae* in the Sonoran Desert varies significantly within and among years (Fleming et al. 2001; Molina-Freaner et al. 2003). Bat unpredictability has been suggested as the major

ecological force behind the evolution of (perhaps secondary) generalized pollination systems in northern columnar cacti (Valiente-Banuet 2002) and we might expect the same pattern in *Agave*.

Given the similar distribution of *Agave* and *Leptonycteris* species, the dependence of many species of columnar cacti on bats and similar patterns in phenology and migration, the *Leptonycteris*–columnar cactus–*Agave* association may represent a complex but very successful case of diffuse coevolution (Gentry 1982; Arita 1991; Valiente-Banuet et al. 1996, 1997; Valiente-Banuet 2002).

ADAPTIVE RADIATION OF *AGAVE* SENSU LATO

Using the available molecular phylogenies (for example, see Bogler et al. 2005), it is impossible to separate subgenera of *Agave* (*Agave* and *Littaea*) from *Manfreda*, *Polianthes*, and *Prochnyanthes*. As mentioned above, we will call this large monophyletic clade *Agave* s.l. Thus, *Agave* s.l. comprises *Agave* s.s. (166 spp.), *Manfreda* (28 spp.), *Polianthes* (13), and *Prochnyanthes* (1) for a total of at least 208 species.

Our chloroplast sequences (*rbcL* [1428 bp], a region of the *trnL* intron [768 bp] and a spacer between *trnL* and *trnF* [534 bp], Good-Ávila et al. submitted) and nuclear sequences (ITS1 and ITS2 [772 bp]) show generally low levels of genetic differentiation among species of *Agave* s.l., suggestive of a very recent origin for the group (Eguiarte 1995; Eguiarte et al. 2000; Good-Ávila et al. submitted). In contrast, our population genetics studies indicate large levels of genetic variation within populations (except domesticated species) with little or no inbreeding, except for example, on the periphery of a species' range (Eguiarte et al. 2000).

As stated above, plant-pollinator interactions may influence the rates of speciation of a group (Simpson 1953; Schluter 2000). In order to examine the evidence for a radiation of the agaves, we have performed a series of analyses using molecular data as described in Good-Ávila et al. (submitted). First, we used *rbcL* sequence data (from GenBank), and performed analyses on 334 monocot sequences. With this database, we used two methods to estimate the age of the Agavaceae family and the group *Agave* s.l. First, we used the method of linearized trees following Takezaki et al. (1995). This method estimates the divergence times on a phylogenetic tree by removing all of the slow- and fast-evolving species on the phylogeny and then imposes a constant rate of molecular evolution. We constructed a minimum evolution (distance based) tree (Rzhetsky and Nei 1993) using the *rbcL* data described above and calibrated the molecular clock on the tree using a crown group age of 132 MYA for the origin of the angiosperms, as suggested from fossil data described in Brenner (1996) and Magallón and Sanderson (2001). Using this method, we estimated an age of 12.75 MYA for the origin of Agavaceae and one of 10.2 MYA for the *Agave* s.l. clade.

To calculate an estimate of the age that does not force the use of a molecular clock, we used the method of penalized likelihood developed by Sanderson (2002), which allows different evolutionary rates to be estimated on different branches of a phylogenetic tree but imposes a penalty for changing rates too quickly. To perform these analyses, we first gen-

erated a phylogeny of the monocots based on the *rbcL* data described above using maximum parsimony and then estimated the branch lengths on this tree using maximum likelihood methods, again constraining the crown age of all angiosperms to be 132 MYA but this time adding four internal calibration points based on fossil data (for details, see Good-Ávila et al. submitted). This method generated similar dates of 11.73 MYA of age for the Agavaceae family and 10.25 MYA for the extant *Agave* s.l. clade. How trustworthy are these dates? Earlier, Eguiarte (1995) estimated the age of the *Agave* family to be 14 MYA, using more basic methodology and *rbcL* sequences, and Eguiarte et al. (2000) estimated the age of *Agave* s.l. to be 8 MYA and that of *Yucca* to be 6 MYA. On the other hand, Pellmyr and Leebens-Mack (1999) examined *Yucca*–*yucca* moth coevolution, using COI and COII mtDNA molecular markers combined with biogeographic and paleontological data to calibrate their molecular clock, and suggested an age of 41.5 MYA for the origin of Agavaceae. In contrast, the *yucca*-like fossil found in Mexico was estimated to be 14 MYA (Tidwell and Parker 1990) and Palacios and Rzedowski (1993) reported Agavaceae-like fossil pollen to be in the range of 15–25 MYA; there are also *Agave* and *Yucca* fossils from the Late Miocene in the Chihuahuan Desert (Wells 1974; Tidwell and Parker 1990). The oldest Asparagales fossils are estimated to be 37.5 MYA according to Magallón and Sanderson (2001). The possibility that rates or patterns of molecular evolution are significantly different in *yucca* moths than in Agavaceae is worth exploring.

There are inherent difficulties in using molecular sequence data to calibrate times of diversification, and *rbcL* data, in particular, has been criticized because it exhibits considerable variation in the rate of substitution between first and second vs. third base pair (bp) positions—the latter becoming saturated much earlier than the former (Sanderson and Doyle 2001). For this reason, we also estimated the time of origin of Agavaceae using the same methods but other genes. In particular, we generated and then analyzed 768 bp of sequence data from the chloroplast intergenic spacers of the *trnL* intron (primers C and D of Taberlet et al. 1991) in 26 species of *Agave* s.l., four species of *Yucca* and analyzed this data set along with sequences from 35 other monocots (most of these from the GenBank) using *Acorus* L. as an outgroup. We also obtained 534 bp of sequence (some from our laboratory, some from GenBank) from 77 species of the chloroplast intergenic region between *trnL* and *trnF* (using the primers E and F of Taberlet et al. 1991). Using the method of linearized trees described above, we calculated an age of 25.8 ± 2.1 MYA for the origin of the family and 10.1 ± 1.7 MYA for *Agave* s.l. using these data sets; i.e., an older age for the family than that suggested by the *rbcL* data set, but almost the same age for the group *Agave* s.l. The apparent cause for this discrepancy in age was a change in the phylogenetic position of the *Yucca* clade with respect to other members in Asparagales using the intron and intergenic spacer chloroplast data sets. In particular, the *Yucca* clade groups more closely to genera outside Agavaceae, such as *Camassia* and *Chlorogalum*. Thus, these results suggest that if *Yucca* is more closely related to *Camassia* and *Chlorogalum* then the date of origin for *Yucca* may be older than indicated by the *rbcL* data, a date of 10.0 ± 2 MYA for the

origin of the genus *Agave* is in agreement with other analyses.

In order to understand the tempo and mode of speciation events in *Agave* s.l. our next approach was to compare rates of speciation/cladogenesis in *Agave* s.l. to rates of speciation within *Yucca*. We calculated the absolute rates of diversification in *Agave* s.l. using two methods, one based on a Yule process with the Kendall/Moran estimator (Nee et al. 1992; Baldwin and Sanderson 1998; Good-Ávila et al. submitted). The first gives rise to an estimate of the rate of speciation in millions of years using the information inherent in the branch lengths of a phylogenetic tree and incorporates both birth and death, speciation and extinction processes into an estimator defined as (S). The second method simply uses the time of origin of a clade (T) and the number of extant species (N) to derive an estimate of the absolute rate of diversification (D) assuming no extinction.

Using these methods, we calculated mean rates of diversification per million years in *Agave* s.l. to be $S = 0.32$ net speciation events per million years (species/MY) and $D = 0.51$ species/MY. We then compared diversification rates of *Agave* s.l. with those estimated in *Yucca*.

Since we do not have a detailed phylogeny of *Yucca*, we can only calculate D: using our estimates of 11.83–25 MYA for the origin of the family, and given that there are ca. 50 extant species of *Yucca* we calculate rates of D either at 0.2 or 0.15 species/MY. These values of D are less than half of our estimates in *Agave* using the same method, suggesting that the generalist resources-rich pollination system of *Agave* has been more successful generating species than the extreme form of specialized pollination found in *Yucca*.

COMPARISON TO OTHER KNOWN ADAPTIVE RADIATIONS

Are these rates of diversification high compared to other organisms? In particular, are rates of diversification in *Agave* s.l. sufficiently high to justify our assertion that it represents a notable radiation (0.32–0.51 species/MY)? Eriksson and Bremer (1992) estimated rates of diversification for different families of angiosperms and suggested a median value of 0.12 to a maximum value of 0.39 species/MY. In a similar study, Magallón and Sanderson (2001) found an average of 0.077–0.089 net speciation events per million years across angiosperms, with the highest values in Asterales estimated to be between 0.27–0.33 species/MY. In all these “average” comparisons, Agavaceae rates continue to be relatively high. A more equitable comparison may be with the Hawaiian silversword alliance, a group that has undergone one of the most impressive diversification and morphological adaptations known in plants. Baldwin and Sanderson (1998) estimated rates of diversification to be of 0.56 ± 0.17 species/MY, higher than our estimates in *Agave*, albeit the total number of species in *Agave* s.l. is far higher (208 spp. in ca. 10 MY, than the total in the silversword group, of 28 spp. in ca. 5 MY).

A longterm goal of our work in the *Agave* genus is to compare rates of diversification and the role of plant–pollinator coevolution in influencing speciation rates in different subsections or geographic regions. There has been some debate about whether overall rates of diversification are lower in plants than in animals. If this is true, this will be an im-

portant consideration when we compare rates of diversification in agaves and their pollinators. For instance, recently Webb et al. (2004) resolved the phylogeny of 37 species of Goodeidae fish in Mexico, a group that appears to have undergone an adaptive radiation with an estimated age of 16 MY, thus we can calculate $D = 0.217$ species/MY for this group. Stanley (1979) estimated rates of diversification for families of rodents to be 0.22–0.35 species/MY, with the highest values for murid rodents. Considering these estimates, the values we report for *Agave* s.l. appear to have similar or even higher values than those reported for several radiation events in animals.

While estimates of rates of diversification are useful for comparative purposes, a more interesting use of molecular phylogenies aims to infer when rates of speciation were elevated and whether periods of elevated diversification can be associated with other factors. For example, in the case of agaves, our fieldwork predicts that rates of speciation would be elevated at the same time that columnar cacti, nectarivorous bats, birds, and/or hawkmoths diversified in Mexico. Using the DNA sequence data for the *trnL* intron and the spacer between *trnL* and *trnF*, we performed preliminary analyses to test whether rates of speciation have been decelerating or accelerating toward the present using both lineage-through-time plots and the statistic γ developed by Pybus and Harvey (2000). These analyses indicated that rates of diversification were higher early in the evolution of the group *Agave* s.l. (Good-Ávila et al. submitted). In the future, we would like to test specific hypotheses concerning the patterns of speciation in both *A.* subgen. *Agave*, and *Littaea* and to correlate patterns of speciation in agaves with different pollinators or different levels of pollinator specialization.

We can conclude from this review that, at least in terms of timing and the absolute number of species, we have evidence for a radiation in *Agave* s.l. (and an impressive, though not an especially high one in *Yucca*). We are currently in the process of understanding what evolutionary forces may have contributed to these high rates of diversification, e.g., adaptation. From our field studies and from hypotheses suggested by other authors, we propose a series of factors that appear to have been instrumental in driving the evolution of the agaves, the relative importance of each of these will be addressed in future studies.

THEN, WHY SO MANY SPECIES IN AGAVE?

The desertification of North America started between 8–15 MYA, as higher temperatures and reduced availability of water occurred in all of North America in the Middle Miocene (Axelrod 1979). This desertification, coupled with intense volcanic activity, generated the complex topography that dominates present Mexico and created extensive environmental heterogeneity. The heterogeneous topology and diversity of ecological niches that resulted are central to understanding the adaptive radiation of *Agave*. Agaves are adapted to semiarid deserts, which are relatively open niches not only because they are abundant in Mexico, but also because these habitats present relatively few plant competitors. The ability to colonize these environments, coupled with remarkably heterogeneous habitats throughout Mexico, acts as a natural barrier to gene flow. Thus, promoting population

processes (genetic isolation and genetic drift) that are believed to facilitate speciation, thereby accelerating rates of speciation in *Agave* s.l. (Martinez-Palacios et al. 1999; Eguiarte et al. 2000; Navarro-Quezada et al. 2003). Furthermore, the very recent evolution of herbaceous taxa within *Agave* s.l. (*Manfreda* and *Polianthes*) has allowed the group to explore more mesic environments that have developed more recently in central Mexico.

Other authors have suggested that plant–pollinator interactions may also precipitate adaptation or diversification. For example, Fleming and Holland (1998) concluded that arid regions of North America appear to promote the evolution of obligate pollination mutualisms involving nocturnal moths in self-incompatible plants whose fruit set is resource limited. As predicted by Pellmyr et al. (1996), active pollination can evolve in a specialized pollinator in the presence of effective co-pollinators. Fleming and Holland (1998) described that a columnar cactus, *Lophocereus schottii* Britton & Rose (senita), is mainly pollinated by a specialized moth, *Upiga virescens* (Pyralidae, senita moth), and the system is similar to the *Yucca*–*yucca* moth system, as the moth oviposits into the flowers and the larvae eat a substantial portion of the developing seeds. Greater pollination reliability makes senita moths more effective pollinators although the system remains open to other pollinators such as bees, which sometimes act as redundant, but other times may also contribute to reproductive success of the plant (Holland and Fleming 2002).

In addition to the role that the interaction between *Agave* spp. and their pollinators may have had, and the processes mentioned above, there are some interesting adaptations in *Agave* s.l. that may have contributed to their high rates of speciation:

(1) Morpho-physiological adaptations: enable *Agave* to resist dry conditions (e.g., CAM photosynthesis, very succulent leaves/rosette, water storage) and colonize dry habitats (Nobel 1988). *Agave* s.s. is the most arid-tolerant of all genera in Agavaceae.

(2) Shape: the physical structure of the leaves into a rosette enables the capture of water, both because the rosette serves as a funnel and because species with thin long leaves can condense mist humidity (Martorell and Ezcurra 2002). The shape of the plant also offers protection from extreme variation in temperature (Nobel 1988).

(3) Roots: are very widespread and superficial in *Agave*; Gentry (1982) suggested that this represents an adaptation for efficient water capture.

(4) Protection against large herbivores: Janzen (1986) suggested that *Agave* is extremely well armed; having large, strong, very sharp spines, hard borders, teeth, very hard fibers, raphides (calcium oxalate crystals) (Salinas et al. 2001), and a vast array of chemical compounds that protect it from medium to large herbivores, which perhaps represents a “fossil” adaptation to the extinct Pleistocene megafauna.

(5) Efficient (albeit suicidal) reproduction: the huge inflorescences of *Agave* attract large numbers of animals, which insure animal pollination and high rates of outcrossing and gene flow. Agaves also maintain large, effective population sizes: the combination of large population size with high

outcrossing rates allows for efficient natural selection to occur.

(6) Extensive clonal propagation: allows successful genotypes to survive, and is an efficient “escape” in case the suicidal reproductive effort fails. In some conditions, clonal propagation also enables *Agave* spp. to colonize harsh environments or dominate large areas where pollinator abundance may be low or unreliable.

(7) Adaptation to microecological conditions: different species within *Agave* s.l. are adapted to contrasting conditions of soil rockiness and humidity.

(8) Diversity of life-history traits: species in *Agave* s.l. range from self-compatible almost annual herbs to long-lived completely outcrossing, nonclonal species.

This diversity of morphological and life-history strategies is sufficiently broad that it has enabled agaves to be successful in most of the environmental conditions found in Mexico. The focus of our future studies will be to understand how specific reproductive or morphological features have evolved over distinct geographic or environmental habitats and how the evolution of agaves has been influenced by their pollinators or by other plant species (such as cacti).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Aldo Valera for extraordinary lab and field technical assistance. MR received a Ph.D. scholarship from Conacyt. MR, FM, and LE received financial aid to support participation in the Monocots III Conference from host organizers at Rancho Santa Ana Botanic Garden. Support for our research in *Agave* was provided by Conacyt 27983-N, Semarnat-Conacyt 2002-C01-0246, CONABIO V038, and Papiit UNAM IN211997 grants to LE.

LITERATURE CITED

- ADDICOTT, J. F., AND T. BAO. 1999. Limiting the costs of mutualism: multiple modes of interaction between yuccas and yucca moths. *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B, Biol. Sci.* **266**: 197–202.
- ADEN, P. 1988. *The Hosta* book. Timber Press, Portland, Oregon, USA. 133 p.
- ALVAREZ, T., AND L. GONZÁLEZ-QUINTERO. 1970. Análisis polínico del contenido gástrico de murciélagos Glossophaginae de México. *Anales Esc. Nac. Ci. Biol.* **18**: 137–165.
- ALVAREZ DE ZAYAS, A. 1987. Sistemática y filogenia de la familia Agavaceae Endlicher. Ph.D. dissertation, Universidad de la Habana, La Habana, Cuba. 210 p.
- ARITA, H. T. 1991. Spatial segregation in long-nosed bats *Leptonycteris nivalis* and *Leptonycteris curasoae*, in Mexico. *Journal of Mammalogy* **72**: 706–714.
- , AND S. R. HUMPHREY. 1988. Revisión taxonómica de los murciélagos magueyeros del género *Leptonycteris* (Chiroptera: Phyllostomidae). *Acta Zool. Mex.* **29**: 1–60.
- , AND K. SANTOS-DEL-PRADO. 1999. Conservation biology of nectar-feeding bats in Mexico. *Journal of Mammalogy* **80**: 31–41.
- ARIZAGA, S., E. EZCURRA, E. PETERS, F. R. DE ARELLANO, AND E. VEGA. 2000. Pollination ecology of *Agave macroacantha* (Agavaceae) in a Mexican tropical desert. II. The role of pollinators. *Amer. J. Bot.* **87**: 1011–1017.
- AXELROD, D. I. 1979. Age and origin of the Sonoran Desert. *Occas. Pap. Calif. Acad. Sci.* **132**: 1–74.
- BALDWIN, B., AND M. J. SANDERSON. 1998. Age and rate of divisi-

- fication of the Hawaiian silversword alliance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 9402–9406.
- BERGER, A. 1921. *Die Agaven*. Springer-Verlag, Jena, Germany. 285 p.
- BOGLER, D., J. L. NEFF, AND B. B. SIMPSON. 1995. Multiple origins of the *Yucca*-*yucca* moth association. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 6864–6867.
- , J. C. PIRES, AND J. FRANCISCO-ORTEGA. 2005. Phylogeny of Agavaceae based on *ndhF* and ITS sequences: implications of molecular data for classification, pp. xx–xx. *In* J. T. Columbus, E. A. Friar, J. M. Porter, L. M. Prince, and M. G. Simpson [eds.], *Monocots: comparative biology and evolution*, 2 vols. Rancho Santa Ana Botanic Garden, Claremont, California, USA.
- , AND B. B. SIMPSON. 1995. A chloroplast DNA study of the Agavaceae. *Syst. Bot.* **20**: 191–205.
- , AND ———. 1996. Phylogeny of the Agavaceae based on ITS rDNA sequence variation. *Amer. J. Bot.* **83**: 1225–1235.
- BRENNER, G. J. 1996. Evidence of the earliest stage of angiosperm pollen evolution: a paleo-equatorial section from Israel, pp. 91–115. *In* D. W. Taylor and L. J. Hickey [eds.], *Flowering plant origin, evolution and phylogeny*. Chapman and Hall, New York, USA.
- BRIONES, O. 1994. Origen de los desiertos mexicanos. *Ciencia (México)* **45**: 263–279.
- CADAVAL-NAREZO, A. 1999. Estudio evolutivo de los azúcares del néctar de *Agave lechuguilla* en el desierto de Chihuahua. Undergraduate dissertation, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, D. F., Mexico. 61 p.
- CEBALLOS, G., T. H. FLEMING, C. CHAVEZ, AND J. NASSAR. 1997. Population dynamics of *Leptonycteris curasoae* (Chiroptera: Phyllostomidae) in Jalisco, Mexico. *Journal of Mammalogy* **78**: 1220–1230.
- CLARY, K. H., AND B. B. SIMPSON. 1995. Systematics and character evolution of the genus *Yucca* L. (Agavaceae): evidence from morphology and molecular analyses. *Bol. Soc. Bot. México* **56**: 77–78.
- CRUDEN, R. W., S. M. HERMANN, AND S. PETERSON. 1983. Patterns of nectar production and plant-pollinator coevolution, pp. 80–125. *In* B. Bentley and T. Elias [eds.], *The biology of nectarines*. Columbia University Press, New York, USA.
- DAHLGREN, R. M. T., H. T. CLIFFORD, AND P. F. YEO. 1985. *The families of the monocotyledons*. Springer-Verlag, Berlin, Germany. 520 p.
- DÁVILA-ARANDA, P., S. ARIAS-MONTES, R. LIRA-SAADE, J. L. VILLASEÑOR, AND A. VALIENTE-BANUET. 2002. Phytogeography of the columnar cacti (Tribe Pachycereeae) in Mexico, a cladistic approach, pp. 25–41. *In* T. H. Fleming and A. Valiente-Banuét [eds.], *Columnar cacti and their mutualists*. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona, USA.
- EGUIARTE, L. E. 1995. Hutchinson (Agavales) vs. Huber y Dahlgren: análisis moleculares sobre la filogenia y evolución de la familia Agavaceae sensu Hutchinson dentro de la monocotiledoneas. *Bol. Soc. Bot. México* **56**: 45–56.
- , AND A. BÚRQUEZ. 1987. Reproductive ecology of *Manfreda brachystachya*, an iteroparous species of Agavaceae. *S. W. Naturalist* **32**: 169–179.
- , AND ———. 1988. Reducción en la fecundidad de *Manfreda brachystachya* (Cav.) Rose, una agaveacea polinizada por murciélagos: los riesgos de la especialización en la polinización. *Bol. Soc. Bot. México* **48**: 147–149.
- , C. MARTÍNEZ DEL RÍO, AND H. ARITA. 1987. El néctar y el polen como recursos: el papel ecológico de los visitantes a las flores de *Pseudobombax ellipticum* (H. B. K.) Dugand. *Biotropica* **19**: 74–82.
- , M. R. DUVALL, G. H. J. LEARN, AND M. T. CLEGG. 1994. The systematic status of the Agavaceae and Nolinaceae and related Asparagales in the monocotyledons. *Bol. Soc. Bot. México* **54**: 35–56.
- , V. SOUZA, AND A. SILVA-MONTELLANO. 2000. Evolución de la familia Agavaceae: filogenia, biología reproductiva y genética de poblaciones. *Bol. Soc. Bot. México* **66**: 131–150.
- ENGARD, R. G. 1980. *Hesperaloe*: potential crop for aridlands, pp. 115–123. *In* Centro de Investigaciones en Química Aplicada y Comisión Nacional de las Zonas Áridas (CIQA) [ed. & publ.], *Yucca*. Saltillo, Coahuila, Mexico.
- ERIKSSON, O., AND B. BREMER. 1992. Pollination systems, dispersal modes, life forms, and diversification rates in angiosperm families. *Evolution* **46**: 258–266.
- FAEGRI, K., AND L. VAN DER PIJL. 1966. *The principles of pollination ecology*. Pergamon, Oxford, UK. 248 p.
- , AND ———. 1979. *The principles of pollination ecology*, Ed. 3. Pergamon, Oxford, UK. 244 p.
- FLEMING, T. H. 2000. Pollination of cacti in the Sonoran Desert. *Amer. Sci.* **88**: 432–439.
- , AND J. N. HOLLAND. 1998. The evolution of obligate pollination mutualisms: senita cactus and senita moth. *Oecologia* **114**: 368–375.
- , AND J. M. NASSAR. 2002. Population biology of the lesser long-nosed bat *Leptonycteris curasoae*, in Mexico and Northern South America, pp. 283–305. *In* T. H. Fleming and A. Valiente-Banuét [eds.], *Columnar cacti and their mutualists*. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona, USA.
- , R. A. NUÑEZ, AND L. S. 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.
- , C. T. SAHLEY, J. N. HOLLAND, J. D. NASON, AND J. L. HAMRICK. 2001. Sonoran Desert columnar cacti and the evolution of generalized pollination systems. *Ecol. Monogr.* **71**: 511–530.
- GARCÍA-MENDOZA, A. 1995. Riqueza y endemismos de la familia Agavaceae en México, pp. 59–83. *In* E. Linares, P. Davila, F. Ching, R. Bye, and T. Elias [eds.], *Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques*. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, D. F., Mexico.
- . 1999. Una nueva especie de *Furcraea* (Agavaceae) de Chiapas, Mexico. *Novon* **9**: 42–45.
- . 2001. Revisión del género *Furcraea* (Agavaceae). Ph.D. dissertation, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, D. F., Mexico. 342 p.
- . 2002. Distribution of *Agave* (Agavaceae) in Mexico. *J. Cact. Succ. Soc. Amer.* **74**: 177–186.
- GENTRY, H. S. 1982. *Agaves of continental North America*. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona, USA. 670 p.
- GONZÁLEZ, A. 2004. Biología reproductiva y genética de poblaciones del *Agave garciae-mendozae*. Undergraduate dissertation, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, D. F., Mexico. 88 p.
- GROMAN, J. D., AND O. PELLMYR. 1999. The pollination biology of *Manfreda virginica* (Agavaceae): relative contribution of diurnal and nocturnal visitors. *Oikos* **87**: 373–381.
- HERNÁNDEZ, L. 1995. Análisis cladístico de la familia Agavaceae. *Bol. Soc. Bot. México* **56**: 57–68.
- HOLLAND, J. N., AND T. H. FLEMING. 2002. Co-pollinators and specialization in the pollinating seed-consumer mutualism between senita cacti and senita moths. *Oecologia* **133**: 534–540.
- HOWELL, D. 1972. Physiological adaptations in the syndrome of chiropterophily with emphasis on the bat *Leptonycteris lydekker*. Ph.D. dissertation, University of Arizona, Tucson, Arizona, USA.
- , AND N. HODGKIN. 1976. Feeding adaptations in the hairs and tongues of nectar feeding bats. *J. Morphol.* **148**: 329–336.
- HUTCHINSON, J. 1934. *The families of flowering plants*, Vol. 2. Macmillan and Company, London, UK. 243 p.

- JANZEN, D. H. 1986. Chihuahuan Desert nopaleras: defaunated big mammal vegetation. *Annual Rev. Ecol. Syst.* **17**: 595–636.
- KUBITZKI, K. 1998. The families and genera of flowering plants, Vols. 3 and 4. Springer-Verlag, New York, USA. 478 p.
- MAGALLÓN, S., AND M. J. SANDERSON. 2001. Absolute diversification rates in angiosperm clades. *Evolution* **55**: 1762–1780.
- MARTINEZ-PALACIOS, A., L. E. EGUIARTE, AND G. R. FURNIER. 1999. Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan Desert. *Amer. J. Bot.* **86**: 1093–1098.
- MARTORELL, C., AND E. EZCURRA. 2002. Rosette scrub occurrence and fog availability in arid mountains of Mexico. *J. Veg. Sci.* **13**: 651–662.
- MCGARY, J. 2001. Bulbs of North America. Timber Press and North American Rock Garden Society, Singapore. 251 p.
- MOLINA-FREANER, F., M. CERVANTES-SALAS, D. MORALES-ROMERO, S. BUCHMANN, AND T. H. FLEMING. 2003. Does the pollinator abundance hypothesis explain geographic variation in the breeding system of *Pachycereus pringlei*? *Int. J. Pl. Sci.* **164**: 383–393.
- , AND L. E. EGUIARTE. 2003. The pollination biology of two paniculate agaves (Agavaceae) from northwestern Mexico: contrasting roles of bats as pollinators. *Amer. J. Bot.* **90**: 1016–1024.
- NASSAR, J., H. BECK, L. S. L. STERNBERG, AND T. H. FLEMING. 2003. Dependence on cacti and agaves in nectar-feeding bats from Venezuelan arid zones. *Journal of Mammalogy* **84**: 106–116.
- , N. RAMIREZ, AND O. LINARES. 1997. Comparative pollination biology of Venezuelan columnar cacti and the role of nectar-feeding bats in their sexual reproduction. *Amer. J. Bot.* **84**: 918–927.
- NAVARRO-QUEZADA, A., R. GONZALEZ-CHAUVET, F. MOLINA-FREANER, AND L. E. EGUIARTE. 2003. Genetic differentiation in the *Agave deserti* (Agavaceae) complex of the Sonoran Desert. *Hereditas* **90**: 220–227.
- NEE, S., A. MOOERS, AND P. H. HARVEY. 1992. Tempo and mode of evolution revealed from molecular phylogenies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 8322–8326.
- NOBEL, P. S. 1988. Environmental biology of agaves and cacti. Cambridge University Press, New York, USA. 270 p.
- ORNELAS, J. F., M. ORDANO, A. HERNANDEZ, J. C. LOPEZ, L. MENDOZA, AND Y. PERRONI. 2002. Nectar oasis produced by *Agave marmorata* Roezl. (Agavaceae) lead to spatial and temporal segregation among nectarivores in the Tehuacan Valley, Mexico. *J. Arid. Environm.* **52**: 37–51.
- PALACIOS, R., AND J. RZEDOWSKI. 1993. Estudio palinológico de las floras fósiles del mioceno inferior y principios del mioceno medio de la región de Pichucalco, Chiapas, México. *Acta Bot. Mex.* **24**: 1–96.
- PELLMYR, O. 2003. Yuccas, yucca moths, and coevolution: a review. *Ann. Missouri Bot. Gard.* **90**: 35–55.
- , AND E. J. AUGENSTEIN. 1997. Pollination biology of *Hesperaloe parviflora*. *S. W. Naturalist* **42**: 182–187.
- , AND H. W. KRENN. 2002. Origin of a complex key innovation in an obligate insect-plant mutualism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 5498–5502.
- , AND J. LEEBENS-MACK. 1999. Forty million years of mutualism: evidence for Eocene origin of the yucca–yucca moth association. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 9178–9183.
- , J. N. THOMPSON, J. M. BROWN, AND R. G. HARRISON. 1996. Evolution of pollination and mutualism in the yucca moth lineage. *Amer. Naturalist* **148**: 827–847.
- PERCIVAL, M. S. 1979. Floral biology. Pergamon Press, Oxford, UK. 243 p.
- PIRES, J. C., I. J. MAUREIRA, J. P. REBMAN, G. A. SALAZAR, L. I. CABRERA, M. F. FAY, AND M. W. CHASE. 2004. Molecular data confirm the phylogenetic placement of the enigmatic *Hesperocalallis* (Hesperocallidaceae) with *Agave*. *Madroño* **51**: 307–311.
- PROCTOR, M., P. YEO, AND A. LACK. 1996. The natural history of pollination. Timber Press, Portland, Oregon, USA. 479 p.
- PYBUS, O. G., AND P. H. HARVEY. 2000. Testing macro-evolutionary models using incomplete molecular phylogenies. *Proc. Roy. Soc. London, Ser. B, Biol. Sci.* **267**: 2267–2272.
- REID, F. 1998. A field guide to the mammals of Central America and southeast Mexico. Oxford University Press, Oxford, UK. 334 p.
- ROCHA, M., A. VALERA, AND L. E. EGUIARTE. 2005. Reproductive ecology of five sympatric *Agave Littaea* (Agavaceae) species in central Mexico. *Amer. J. Bot.* **92**: 1330–1341.
- ROGERS, G. K. 2000. A taxonomic revision of the genus *Agave* (Agavaceae) in the Lesser Antilles, with an ethnobotanical hypothesis. *Brittonia* **52**: 218–233.
- ROJAS-MARTINEZ, A., A. VALIENTE-BANUET, M. C. ARIZMENDI, A. ALCANTARA-EGUREN, AND H. T. ARITA. 1999. Seasonal distribution of the long-nosed bat (*Leptonycteris curasoae*) in North America: does a generalized migration pattern really exist? *J. Biogeogr.* **26**: 1065–1077.
- RZEDOWSKI, J. 1993. Diversity and origins of the phanerogamic flora of Mexico, pp. 129–144. In T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot, and J. Fa [eds.], Biological diversity of Mexico. Oxford University Press, New York, USA.
- RZHETSKY, A., AND M. NEI. 1993. Theoretical foundation of the minimum-evolution method of phylogenetic inference. *Molec. Biol. Evol.* **10**: 1073–1095.
- SALINAS, M. L. 2001. Irritant contact dermatitis caused by needle-like calcium oxalate crystals, raphides in *Agave tequilana* among workers in tequila distilleries and agave plantations. *Contact Dermatitis* **44**: 94–96.
- SANDERSON, M. J. 2002. Estimating absolute rates of molecular evolution and divergence times: a penalized likelihood approach. *Molec. Biol. Evol.* **19**: 101–109.
- , AND J. A. DOYLE. 2001. Sources of error and confidence intervals in estimating the age of angiosperms from *rbcL* and 18S rDNA data. *Amer. J. Bot.* **88**: 1499–1516.
- SANTOS, M., AND H. T. ARITA. 2002. Priority areas for the conservation of New World nectar-feeding bats, pp. 342–363. In T. H. Fleming and A. Valiente-Banuet [eds.], Columnar cacti and their mutualists. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona, USA.
- SCHAFFER, W. M., AND M. V. SCHAFFER. 1977a. The adaptive significance of variations in reproductive habit in the Agavaceae, pp. 261–276. In B. Stonehouse and C. M. Perrins [eds.], Evolutionary ecology. MacMillan, London, UK.
- , AND ———. 1977b. The reproductive biology of Agavaceae, Vol. 1. Pollen and nectar production in four Arizona agaves. *S. W. Naturalist* **22**: 157–168.
- SCHLUTER, D. 2000. The ecology of adaptive radiation. Oxford University Press, Oxford, UK. 288 p.
- SILVA-MONTELLANO, A. 2001. Ecología reproductiva y genética de poblaciones de *Agave lechuguilla* (Torr.) en un gradiente latitudinal. Ph.D. dissertation, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, D. F., Mexico. 142 p.
- , AND L. E. EGUIARTE. 2003a. Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. I: Floral characteristics, visitors, and fecundity. *Amer. J. Bot.* **90**: 377–387.
- , AND ———. 2003b. Geographic patterns in the reproductive ecology of *Agave lechuguilla* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. II: Genetic variation, differentiation, and inbreeding estimates. *Amer. J. Bot.* **90**: 700–706.
- SIMMONS, N. B., AND A. L. WETTERER. 2002. Phylogeny and convergence in cactophilic bats, pp. 87–121. In T. H. Fleming and A. Valiente-Banuet [eds.], Columnar cacti and their mutualists. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona, USA.
- SIMPSON, G. G. 1953. The major features of evolution. Columbia University Press, New York, USA. 434 p.

- SLAUSON, L. A. 2000. Pollination biology of two chiropterophilous agaves in Arizona. *Amer. J. Bot.* **87**: 825–836.
- . 2001. Insights on the pollination biology of *Agave* (Agavaceae). *Haseltonia* **8**: 10–23.
- STANLEY, S. M. 1979. Macroevolution: pattern and process. W. H. Freeman, San Francisco, California, USA. 332 p.
- SUTHERLAND, S. D. 1982. The pollination biology of paniculate agaves: documenting the importance of male fitness in plants. Ph.D. dissertation, University of Arizona, Tucson, Arizona. 53 p.
- . 1987. Why hermaphroditic plants produce many more flowers than fruits: experimental tests with *Agave mckelveyana*. *Evolution* **41**: 750–759.
- TABERLET, P., L. GIELLY, G. PAUTOU, AND J. BOUVET. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Pl. Molec. Biol.* **17**:1105–1109.
- TAKEZAKI, N., A. RZHETSKY, AND M. NEI. 1995. Phylogenetic test of the molecular clock and linearized trees. *Molec. Biol. Evol.* **12**: 823–833.
- TAMBUTTI, M. 2002. Diversidad del género *Agave* en México: una síntesis para su conservación. Undergraduate dissertation, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México, D. F., Mexico. 53 p.
- TIDWELL, W. D., AND L. R. PARKER. 1990. *Protoyucca shadishii*, gen. et. sp. nov., an arborescent monocotyledon with secondary growth from the Middle Miocene of northwestern Nevada, U. S. A. *Rev. Palaeobot. Palynol.* **62**: 79–95.
- VALIENTE-BANUET, A. 2002. Vulnerability of pollination systems of columnar cacti of Mexico. *Revista Chilena Hist. Nat.* **75**: 99–104.
- , M. C. ARIZMENDI, A. ROJAS-MARTÍNEZ, AND L. DOMÍNGUEZ-CANSECO. 1996. Ecological relationships between columnar cacti and nectar feeding bats in Mexico. *J. Trop. Ecol.* **12**: 103–119.
- , A. ROJAS-MARTÍNEZ, M. C. ARIZMENDI, AND P. DÁVILA. 1997. Pollination biology of two columnar cacti (*Neobuxbaumia mezcalensis* and *Neobuxbaumia macrocephala*) in the Tehuacán Valley, central Mexico. *Amer. J. Bot.* **84**: 452–455.
- VALVERDE, P. L., F. VITE, AND J. A. ZAVALA-HURTADO. 1996. A morphometric analysis of a putative hybrid between *A. marmorata* Roezl and *Agave kerchovei* Lem.: *Agave peacockii* Croucher. *Bot. J. Linn. Soc.* **122**: 155–161.
- VERHOEK, S. E. 1975. A study of the tribe Poliantheae (including *Manfreda*) and revisions of *Manfreda* and *Prochnyanthes* (Agavaceae). Ph.D. dissertation, Cornell University, Ithaca, New York, USA. 401 p.
- WASER, N. M., M. V. CHITTKA, M. V. PRICE, N. M. WILLIAMS, AND J. OLLERTON. 1996. Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology* **77**: 1043–1060.
- WEBB, S. A., J. A. GRAVES, C. MACIAS GARCIA, A. E. MAGURRAN, D. O. FOIGHIL, AND M. G. RITCHIE. 2004. Molecular phylogeny of the live bearing Goodeidae (Cyprinodontiformes). *Molec. Phylogen. Evol.* **30**: 527–544.
- WELLS, P. V. 1974. Post-glacial origin of the present Chihuahuan Desert less than 11,500 years ago, pp. 67–83. In D. H. Riskind [ed.], Transactions of the symposium on the biological resources of the Chihuahuan Desert region, United States and Mexico. Department of the Interior, National Park Service, Washington, D. C., USA.
- WETTERER, A. L., M. V. ROCKMAN, AND N. B. SIMMONS. 2000. Phylogeny of phyllostomid bats (Mammalia: Chiroptera): data from diverse morphological systems, sex chromosomes, and restriction sites. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* **248**: 4–200.
- WILKINSON, G. S., AND T. H. FLEMING. 1996. Migration and evolution of lesser long-nosed bats *Leptonycteris curasoae*, inferred from mitochondrial DNA. *Molec. Ecol.* **5**: 329–339.

CAPÍTULO 3

BIOLOGÍA REPRODUCTIVA EN LA COMUNIDAD DE AGAVES DE LA BARRANCA DE METZTITLÁN

Este capítulo fue publicado en la revista *American Journal of Botany* en Agosto de 2005. En el trabajo se resumen tres años de trabajo de campo de observaciones de visitantes florales, de experimentos de polinización y de medidas comparativas de las diferentes especies. En este tiempo, se encontraron patrones interesantes de la biología de polinización en el subgénero *Littaea*, en el cual hasta ahora los trabajos han sido muy escasos, creemos que se trata de una contribución importante al conocimiento de la biología reproductiva de éste subgénero.

3.1 Resumen

En este trabajo estudiamos una comunidad de especies de *Agave* que coexisten en la Barranca de Metztitlán en el centro de México. Durante 2001, 2002 y 2003 analizamos los caracteres florales y la alometría de las rosetas en cinco especies pertenecientes al subgénero *Littaea*: *A. celsii albicans*, *A. xylonacantha*, *A. difformis*, *A. striata*, y *Agave* sp.; además de que se observaron los visitantes florales para cada especie. Por primera vez reportamos la presencia de murciélagos visitando especies del subgénero *Littaea* y encontramos que éstos (*Leptonycteris curasoae*, *Choeronycteris mexicana* y *Glossophaga* sp.) son los principales polinizadores en cuatro de las cinco especies. También fueron comunes las abejas, abejorros, colibríes y esfingidos. Proponemos que la presencia de polinizadores diurnos de alguna manera incrementa el éxito reproductivo de la planta al ofrecer recursos adicionales a los que aporta el polinizador co-adaptado. Además encontramos evidencias de presiones de selección hacia la semelparidad, ya que los polinizadores seleccionan las inflorescencias de mayor tamaño en tres de las cinco especies. Encontramos además complementariedad fenológica en la comunidad debido a que los periodos de floración de las especies se distribuyen a lo largo de todo el año, aunque en algunos meses la floración de dos o más especies se puede sobreponer. Finalmente, encontramos evidencias de desplazamiento de caracteres en los tamaños de las rosetas y separación espacial y temporal en el uso de recursos de la composición de polinizadores entre las especies.

3.2 Ecología reproductiva de cinco especies simpátricas de *Agave Littaea* (Agavaceae) en el centro de México

American Journal of Botany 92(8): 000–000. 2005.

REPRODUCTIVE ECOLOGY OF FIVE SYMPATRIC *AGAVE* *LITTAEA* (AGAVACEAE) SPECIES IN CENTRAL MEXICO¹

MARTHA ROCHA,² ALDO VALERA, AND LUIS E. EGUIARTE

Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Apartado Postal 70-275, México D.F. CP 04510, Mexico

We studied a community of *Agave* species that coexist in the Metztitlán Canyon in Central Mexico. During 2001, 2002, and 2003, we analyzed floral traits and rosette allometry in five species belonging to the subgenus *Litsea*: *A. celsii albicans*, *A. xylonacantha*, *A. difformis*, *A. striata*, and *Agave* sp.; and observed floral visitors for each species. We report the first evidence of bat visitation in the subgenus *Litsea* and find that bats (*Leptonycteris curasoae*, *Choeronycteris mexicana*, and *Glossophaga* sp.) are the primary pollinators in four species. Honeybees, hummingbirds, bumblebees and hawkmoths were also common visitors. We propose that the presence of diurnal pollinators may increase the reproductive success of the plant when offering pollinator services additional to the coadapted pollinator. We also found evidence of selection pressures toward semelparity because pollinators are selecting for taller inflorescences in three of the five species. There is phenological complementarity in this community because the flowering periods of the five species span the entire year, although there are some periods when pairs of species overlap. Additionally, we found evidence for character displacement in rosette sizes and separation of spatial and temporal resource use in pollinator composition among species.

Key words: Agavaceae; *Agave*; bat pollination syndrome; coexistence; Metztitlán; phenological complementarity; pollination biology; semelparity.

Agaves show one of the most spectacular floral displays in nature: most of them reproduce only once in their life, and they die after producing tremendous amounts of floral resources in a very large inflorescence. Even though agaves are considered typical examples of semelparity (Schaffer and Schaffer, 1977a; Young, 1990), there are some species that show an iteroparous life history (Gentry, 1982). According to the reproductive effort model, semelparity may evolve when inflorescence height affects attractiveness to pollinators and they select for larger inflorescences (Schaffer and Schaffer, 1977a; Aarssen, 1995; Donnelly et al., 1998); subsequently, plants may progressively increase their reproductive effort until the resources allocated to floral displays reach the maximum, causing the death of the plant (Schaffer and Rosenzweig, 1977). Schaffer and Schaffer (1977a) suggested that pollinators have reinforced this reproductive strategy in agaves by selecting only the largest floral displays when attracted to the taller plants, which as a result may receive greater pollen deposition or greater outcrossing rates (Aarssen, 1995).

This singular and massive event of reproduction in agaves attracts a vast and diverse group of animals, ranging from true pollinators to nectar and pollen robbers or to animals that use inflorescences as shelter. Thus, agaves may be considered as

keystone species in arid environments by offering abundant resources to pollinators, which in turn have a substantial effect on the reproductive success of the plant. Even though diurnal visitors can act as pollinators, agaves usually depend on nocturnal pollinators to set fruits (Arizaga et al., 2000b; Eguiarte et al., 2000; Slauson, 2001; Molina-Freaner and Eguiarte, 2003).

In general, floral traits of *Agave* suggest adaptation to bat pollination or “chiropterophily” (Faegri and van der Pijl, 1966); they present robust and pale flowers (usually yellow or white-green), which produce protein-rich pollen and abundant diluted nectar mainly at night, and they smell like ripening fruit (Howell, 1972; Eguiarte et al., 2000; Slauson, 2000).

The genus *Agave* is grouped according to the inflorescence type in two subgenera: *Litsea* species have rosettes with spicate or racemose inflorescences, while members of the subgenus *Agave* possess paniculate inflorescences (Gentry, 1982). Classical pollination studies of *Agave* suggested that paniculate species were predominantly pollinated by bats (Howell, 1972; Gentry, 1982), while spicate agaves were mainly insect-pollinated (Schaffer and Schaffer, 1977b). Interestingly, floral traits associated with insect pollination syndromes are indeed present in some spicate species; for example, floral tubes are smaller, nectar production is less abundant, sugar concentration is high, floral color is attractive to insects, and flowers are sweet-smelling (Slauson, 2000, 2001). Furthermore, there are no reports of bat visitation to *Litsea* species thus far.

However, the relationship between *Agave* and the pollinators is not so straightforward. Several studies have shown that chiropterophilous agaves (from the subgenus *Agave*), occupying habitats at the edge or outside the distribution of nectarivorous bats are pollinated by other animals such as insects or birds (Sutherland, 1987; Kuban, 1989; Molina-Freaner and Eguiarte, 2003). Secondly, the relative importance of bat pollination varies geographically: paniculate agaves show more specialized pollination within the tropics and moderate generalization outside the tropics where they are pollinated by a variety of diurnal and nocturnal pollinators (Arizaga et al., 2000b; Slauson, 2000).

¹ Manuscript received 24 September 2004; revision accepted 13 May 2005.

The authors thank the directives and staff of the “Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán” who kindly provided facilities to develop this work; Mr. Erasto Badillo for invaluable hours of field assistance; Andrea González, Jaime Gasca, Ricardo Colín, Xitlali Aguirre, Roberto Trejo, Arturo Silva, Antonio Cruz, Eugenio Mancera, Yani Monges, Andrés Ocampo, Cristian Torres, Sergio Montiel, and Sara Good-Ávila, for enthusiastically looking for hours at inflorescences and helping with experiments; Dr. Francisco Molina-Freaner, Dr. Sara Good-Ávila, and Dr. Juan Nuñez-Farfán for reading the manuscript; Dr. Alberto Rojas-Martínez for helping with bat capture and identification; Dr. Abisai García-Mendoza for identifying *Agave* species; M.Sc. Olivia Yañez-Ordoñez for identifying insects. M. R. received a Ph.D. scholarship from CONACyT and DGEP-UNAM and financial help from PAEP-UNAM. This work was supported by the CONACyT-SEMARNAT grant number COI-0246/A-1.

² Author for correspondence (e-mail: mrocha@miranda.ecologia.unam.mx)

TABLE 1. Geographical references of the selected populations of *Agave* (subgenus *Littaea*).

Species	Latitude	Longitude	Location name
<i>A. celsii albicans</i>	20°36.68' N	98°50.03' W	Te Cruz Cozapa
<i>A. xylonacantha</i>	20°33.12' N	98°44.86' W	Jilotla
<i>A. difformis</i>	20°31.34' N	98°40.43' W	El Durazno
<i>A. striata</i>	20°28.00' N	98°40.75' W	Puente Venados
<i>Agave</i> sp.	20°40.30' N	98°48.30' W	Tesisco

The highest diversity of *Agave* occurs in Central Mexico (García-Mendoza, 2002; Tambutti, 2002), but few studies on the pollination biology of *Agave* have been carried out in this area (Arizaga et al., 2000a, b; Ornelas et al., 2002; Silva-Montellano and Eguiarte, 2003). The present study was carried out in the Metztitlán Canyon, which is considered the area of highest *Littaea* species diversity in Mexico. Thus, this site was ideal to analyze basic aspects of the reproductive ecology of *Agave Littaea* species and to compare the patterns among species. We used this community of agaves as a model to test both the evolution of semelparity and the evolution of plant-pollinator interactions in the subgenus *Littaea*.

In particular, we were interested in comparing the characteristics of four semelparous and one iteroparous (*A. striata*) species. Another important goal of this study was to establish the degree of pollinator specialization that occurs in this group of coexisting *Littaea* species. Because of the geographic location of the Metztitlán Canyon in central Mexico, we can also test whether the geographic trend toward greater bat pollination in the tropics for the *Agave* subgenus is true even for the subgenus *Littaea*.

MATERIALS AND METHODS

Study area—The “Reserva de la Biosfera Barranca de Metztitlán” is a national protected area located in the state of Hidalgo in Central Mexico. It comprises a large depression called Metztitlán Canyon that is located between the parallels 98°23'00" and 98°57'08" W and 20°14'15" and 20°45'26" N. Elevation ranges from 1000 to 2000 m, and the total area of the reserve is 96 042 ha. It is an arid region, which represents the southernmost limit of the Chihuahuan desert in Mexico, and it is recognized as a high endemism zone, mainly for cacti and succulents (Sánchez-Mejorada, 1978).

Study species—Several species of *Agave* have been reported in the region (Sánchez-Mejorada, 1978; Galván and Hernández-Sandoval, 2002). After extensive exploration of the area, we have identified 11 species of *Agave*, making the Barranca de Metztitlán the area of second highest diversity of species in the country, after the Tehuacán-Cuicatlán valley (also in Central Mexico), and the first place in number of *Littaea* species (eight species, representing

ca. 11% of the total in the subgenus). We chose the five most abundant species and sampled the largest populations in order to observe a large number of inflorescences each season. The species selected and their groups according to Gentry (1982) were: *A. striata* Zucc. (Group Striatae), the endemic *A. celsii* Hook. var. *albicans* (Jacobi) Gentry (Group Polycephalae), *A. xylonacantha* Salm., *A. difformis* Berger, and a new species *Agave* sp. (which is currently being described, A. García-Mendoza, Institute of Biology-National Autonomous University of Mexico, personal communication) (the last three belonging to the group Marginatae). From these five species only *A. striata* is iteroparous, and the rest are semelparous. One population per species was selected and their locations are shown in Table 1.

Floral phenology—We visited the area regularly during 2001 and 2002 (every 2 wk approximately) and noted the presence of inflorescences for each species. We documented the presence/absence of inflorescences in all populations as observed from the roads in each locality. Due to difficulties in accessing the majority of populations (they grow in steep hillsides or cliffs), we did not carry out quantitative analyses of floral phenology.

Rosette sizes and allometry—For each of the populations in Table 1, we marked at least 15 flowering individuals that were accessible to be measured and manipulated. In 2001, we worked with *A. difformis*, *A. striata*, and *Agave* sp.; in 2002 with *A. xylonacantha*, *A. striata*, and *Agave* sp.; and in 2003 with *A. celsii albicans*, *A. xylonacantha*, and *A. difformis*. The total number of individuals per species is shown in Table 2. We measured rosette width and height, height of the inflorescence (measured from the top of the rosette), and the number of active flowers (i.e., open flowers in staminate or pistillate phase that produce nectar).

We compared the size of the rosette of the five different species and made basic allometric comparisons: we analyzed rosette width vs. inflorescence height and rosette width vs. number of active flowers for each species, and inflorescence height vs. fruit set. We performed a correlation analysis on the floral characters listed and performed an analyses of covariance (ANCOVA) to test whether the slopes were significantly different among the species for each of the comparisons.

Floral traits—**Nectar production**—To determine the amount and concentration of nectar, we monitored nectar production over a 16-h period for each species. Twenty-five flowers from five individuals (5 flowers/individual) were covered at noon with a soft mesh fabric bag to exclude pollinators from consuming the nectar. Beginning at 1600 hours we visited each flower every hour and recorded the onset of the nectar production until production finished. Once the flower began to produce nectar, we removed, measured, and discarded the nectar with a micropipette every 2 h and determined the concentration (as sucrose equivalents) with a handheld field refractometer. We called this measure “extracted-nectar production” or “E”). Additionally, for each individual, three flowers were bagged at noon and remained bagged overnight; the next morning, when nectar production had finished, we determined total volume and concentration of nectar (and we named this measure “non-extracted nectar production” or “N-E”). A one-way ANOVA was used to compare nectar volume and concentration among species.

TABLE 2. Basic morphological measures of the reproductive individuals of five *Agave* species. Data in boldface type represent the highest and lowest values of sizes and number of characters. All measures were significantly different among species. Values reported are means with standard errors in parentheses.

Species	Number of individuals	Year	Rosette width (cm)	Rosette height (cm)	Inflorescence height (cm)	Number of active flowers
<i>A. celsii albicans</i>	16	2003	46.93 (6.24)	34.20 (4.12)	137.27 (9.64)	34.00 (3.78)
<i>A. xylonacantha</i>	50	2002, 2003	129.13 (3.35)	66.03 (2.21)	368.55 (10.55)	111.71 (6.95)
<i>A. difformis</i>	36	2001, 2003	144.70 (4.41)	90.33 (2.91)	505.83 (10.78)	93.80 (9.15)
<i>A. striata</i>	51	2001, 2002	104.15 (6.70)	73.30 (4.43)	288.53 (9.66)	77.15 (13.91)
<i>Agave</i> sp.	35	2001, 2002	189.45 (3.82)	120.97 (2.52)	524.75 (12.03)	173.59 (7.93)
<i>F</i>			107.24	108.92	99.95	26.65
<i>df</i>			4, 187	4, 187	4, 187	4, 187
<i>P</i>			<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

August 2005]

ROCHA ET AL.—REPRODUCTIVE ECOLOGY OF *AGAVE LITTAEA*

Floral morphometry—In each population, we randomly selected three plants and 10 floral buds (that were expected to open the next day) in each plant. The next day, we measured pistil, stamen, anther, corolla, and ovary length and ovary and corolla diameter on each flower using calipers. Over the next 7 d, we followed the development of each flower and recorded the changes in the structures over time by repeating the measurements every day.

Natural fruit and seed production—We measured natural fruit set and seed set as estimators of reproductive success. In general, most plants produced fewer fruits than flowers in a given season, indicating that several factors may limit fruit formation (Sutherland, 1986). On a sample of 15 individuals per species (that had flowered the preceding year), we measured inflorescence height and counted the number of mature fruits and floral scars. The sum of the latter two equals the total number of flowers in the inflorescence in the previous year, and the division of the number of mature fruits by this total is an estimate of fruit set. Seed set was calculated as the proportion of ovules that develop into viable seeds; this was calculated by counting the viable seeds (black ones) and the unviable seeds (white ones) in a total of 25 fruits (five fruits from each plant in five different plants per species).

Pollination experiments—To determine the relative importance of diurnal vs. nocturnal pollinators, we conducted exclusion experiments on five flowers per plant (5–10 plants/species depending on availability) by bagging flowers with immature pistils. We performed four pollination treatments: (1) control, in which flowers were available at all times to both nocturnal and diurnal pollinators, (2) flowers bagged prior to anthesis and covered throughout the experiment, (3) flowers available to nocturnal visitors all night but bagged before sunrise, and (4) flowers available to diurnal pollinators but bagged at night and unbagged before sunrise. In addition, to determine the relative success of self- vs. cross-pollination, we performed two additional treatments. (5) For self-pollination, we manually deposited pollen from other flowers of the same plant onto the stigma of the focal flower (geitonogamy) when the stigma was receptive (i.e., stigmatic exudates was present). (6) For cross-pollination, a mixture of pollen from four different plants at least 100 m from the experimental plant was deposited using the method in treatment (5).

Floral visitors—The number of hours that an inflorescence was observed varied according to accessibility of the inflorescence, the number of days of observation, and the number of observers. An average of 20 inflorescences per species per season was selected (Table 2). Each focal individual was observed at 10-min intervals, and all animal visits were recorded. Everyday we began the observations 2 h before sunset, continued during the night, and stopped when visitor activity decreased. We started again 30 min before sunrise and continued until pollinator activity decreased. Additionally, for each species we stayed one complete night (3–5 plants/night) to record the activity of visitors. Night observations were performed without artificial light, staying as close to the plant as possible to use natural sources (moonlight) for illumination and to prevent bat perturbation. We carefully observed the behavior of visitors, noting the presence of nectar and pollen robbers, which were subsequently excluded from the analyses. For all observations, we calculated the frequency of visitors per minute per flower and an average at every 30 min of the day (i.e., the average frequency at 0530 hours, 0600 hours, 0630 hours, and so on, but only for observation hours) and for each group of pollinators. Using this estimate, we determined the time that when visits were most frequent in order for comparison with peaks in nectar production. Finally, using the same estimate of frequency per minute per flower, we calculated the proportion of all visits for each group of visitors. All calculations included day and night observations.

Niche overlap—To estimate the degree of pollinator specificity per species, we calculated the proportional similarity (PS) index for pollinator assemblages between species pairs. This index takes into account both the identity of pollinators and their relative visitation rates. It is calculated as

$$PS = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n |P_{ai} - P_{bi}|}{2}$$

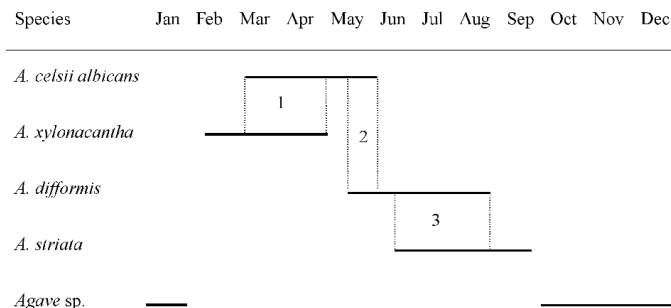


Fig. 1. Floral phenology of five *Agave* species observed in several populations in Metztitlán in Central Mexico during 2001 and 2002. Black lines show the months in which inflorescences were observed. Dashed lines show the overlap between pairs of species. There are three overlaps during the year: overlap 1 corresponds to the pair *A. celsii albicans*–*A. xylonacantha*; overlap 2 occurs at the end of flowering of *A. celsii albicans* and the beginning of *A. difformis*; overlap 3 occurs between *A. difformis* and *A. striata*.

where P_{aj} and P_{bj} are the proportion of the total visitors of taxon i for plant species a and b , respectively (Kay and Schemske, 2003). Additionally, we estimate the niche overlap index suggested by Pianka (1975) by assuming that pollinators are a resource that can be shared between *Agave* species. The index is calculated as

$$a_{jk} = a_{kj} = \frac{\sum_{i=1}^n P_{ij}P_{ik}}{\sqrt{\sum_{i=1}^n P_{ij}^2 \sum_{i=1}^n P_{ik}^2}}$$

where P_{ij} and P_{ik} are the proportions of the i th resource used by the j th and the k th species, respectively (Pianka, 1975).

Statistical analyses—All statistical analyses were conducted using the JMP package (SAS Institute, 1997). Percentages and proportions were arcsine transformed prior to analysis.

RESULTS

Floral phenology—The flowering periods of the *Agave* species in the Metztitlán Canyon are distributed throughout the entire year. There are three periods when two species overlap in flowering time (Fig. 1). Early in the spring, flowering occurs at the same time in *A. celsii albicans* and *A. xylonacantha*, and later *A. celsii albicans* and *A. difformis* flower in May and June. In the summer, we find a third temporal overlap between *A. difformis* and *A. striata*. Only *Agave* sp. flowers in winter. Nevertheless, there are still some periods when *A. xylonacantha* (February), *A. celsii albicans* (May), and *A. striata* (September) do not overlap with the others.

Rosette measures and allometry—The measurements for all reproductive individuals in the five species are shown in Table 2. A one-way ANOVA for all the measurements demonstrated that rosette width and height, inflorescence height, and number of active flowers are significantly different between species (for all cases, $P < 0.0001$). Using Tukey's multiple comparison test, we found that the biggest rosettes with the highest inflorescences are those of *Agave* sp., and the smallest rosettes with shortest inflorescences are those of *A. celsii albicans*. Similarly, *Agave* sp. produces more flowers and *A. celsii albicans* fewer. For all the measures, the species were ranked in the same order from the smallest to the highest as follows: *A. celsii albicans*, *A. striata*, *A. xylonacantha*, *A. difformis*, and

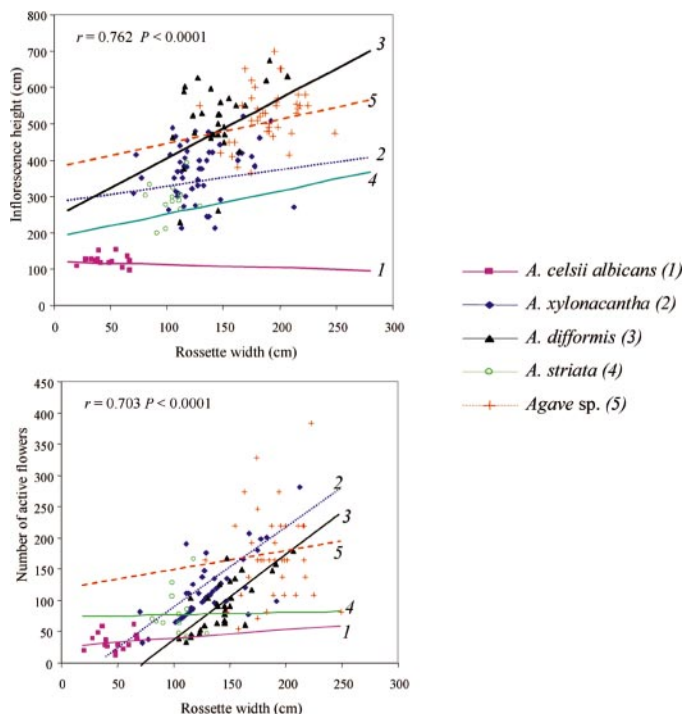


Fig. 2. Allometric relationships between plant size and inflorescence length and flower number in five *Agave* species. The correlation line for each species (numbered 1 to 5) and the correlation coefficient for the complete set of data (the five species together) are shown.

Agave sp. The only exception is rosette height: *A. striata* is larger than *A. xylonacantha*. After comparing all measures to each other, we chose rosette width as the best predictor of plant size. Plant size is positively correlated with inflorescence length ($r = 0.762$, $P < 0.0001$) and to the number of flowers ($r = 0.703$, $P < 0.0001$) (Fig. 2). Analysis of covariance indicated significant differences among slopes (ANCOVA $P < 0.0001$), demonstrating that differences in the allometric relationships among species were significant.

Floral traits—**Nectar production**—Comparative volume and concentration of nectar is shown in Table 3. When the nectar was extracted every 2 h, the total production was higher than in the N-E treatment and sugar concentration was lower, except for *A. difformis* (in which sugar concentration was higher in the N-E treatment). All species are nocturnal nectar producers, although *A. striata* begins nectar production earlier, in the late afternoon. Comparative patterns of extracted nectar production are depicted in Fig. 3. The total accumulated volume is significantly different among species ($F = 16.11$, $df = 4$, 121 , $P < 0.0001$). The largest amount of nectar per flower is produced by *A. striata* and the lowest by *Agave* sp. (Tukey's multiple comparison test $P < 0.001$; see Table 3). No significant differences in total nectar production exist among the three species: *A. difformis*, *A. xylonacantha*, and *A. celsii albicans*, whose values are intermediate ($F = 2.58$, $df = 2$, 73 , $P = 0.08$).

In the case of species pairs that flower in the same season, we observed that the time of higher nectar production does not overlap. For example, the maximum volume is produced in *A. celsii albicans* at 2200 hours, and at 2400 hours in *A. xylonacantha*. The pattern is more obvious in *A. difformis* vs.

TABLE 3. Comparative floral traits for all the species of *Agave*. Values are means with standard errors in parentheses. See Materials and Methods: Floral traits section for explanation of nonextracted (N-E) and extracted (E) treatments.

Species	Mean nectar volume (N-E) (μL) ^a	Total nectar volume (E), cumulative of 2-h extraction (μL) ^b	Nectar concentration (N-E) (%) ^a	Mean nectar concentration (E) (%) ^b	Maximum stamen length (mm) ^{cd}	Maximum pistil length (mm) ^{cd}	Ovary length (mm) ^{cd}	Corolla length (mm) ^{cd}	Day of anther dehiscence	Day of stigma receptivity
<i>A. celsii albicans</i>	132.5 (20.29)	184.04 (13.62)	14.76 (1.06)	13.77 (0.32)	35.03 (0.94)	37.73 (1.18)	44.63 (1.21)	17.32 (0.19)	2	3
<i>A. xylonacantha</i>	117.68 (10.84)	175.42 (9.43)	24.67 (0.57)	17.74 (0.22)	22.77 (1.33)	39.95 (1.67)	18.89 (0.33)	18.97 (0.24)	3	4
<i>A. difformis</i>	82.85 (21.69)	220.73 (16.87)	13.10 (1.13)	14.29 (0.39)	46.92 (1.22)	42.39 (1.53)	18.17 (0.92)	15.85 (0.28)	3	4
<i>A. striata</i>	218.80 (18.14)	255.10 (14.61)	19.32 (0.95)	18.25 (0.34)	47.7 (0.54)	51.3 (1.45)	—	30.6 (0.84)	3	4–5
<i>Agave</i> sp.	91.50 (12.83)	106.16 (13.06)	13.66 (0.67)	11.57 (0.32)	38.12 (1.09)	39.47 (1.37)	16.62 (0.71)	15.89 (0.24)	6	8

^a $N = 25$.

^b $N = 15$.

^c $N = 30$.

^d Differences were significant ($P < 0.001$).

August 2005]

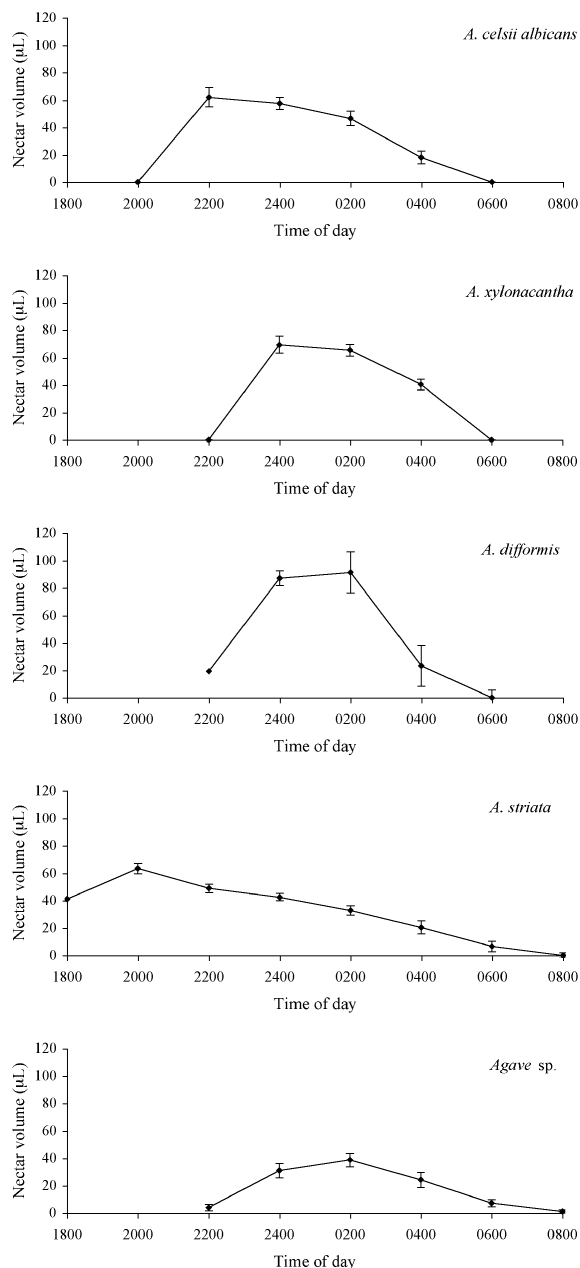
ROCHA ET AL.—REPRODUCTIVE ECOLOGY OF *AGAVE LITTAEA*

Fig. 3. Nectar volume (E) produced for five *Agave* species sampled during one night each (means \pm SE). Pairs of species that overlap in flowering time (*A. celsii albicans* vs. *A. xylonacantha*, *A. difformis* vs. *A. striata*) had different peaks in nectar production ($N = 25$ for each species).

A. striata; the former produces nectar during a shorter interval, from 2200 hours to 0400 hours with a peak between 2400 hours and 0200 hours, while the latter produces nectar longer, from 1800 hours to 0600 hours, with a maximum peak at 2000 hours. Sugar concentration also varies among species (Fig. 4; $F = 91.62$, $df = 4$, 123 , $P < 0.0001$). *Agave* sp. produces less-concentrated nectar ($\bar{X}_E = 11.57\%$; $\bar{X}_{N-E} = 13.66\%$), while *A. striata* ($\bar{X}_E = 18.25\%$; $\bar{X}_{N-E} = 19.32\%$) and *A. xylonacantha* ($\bar{X}_E = 17.74\%$; $\bar{X}_{N-E} = 24.67\%$) produce the more-concentrated nectar (no significant differences were found between them; $t = 1.99$, $P = 0.04$). Nectar of intermediate concentration was found in *A. difformis* ($\bar{X}_E = 14.29\%$; $\bar{X}_{N-E} =$

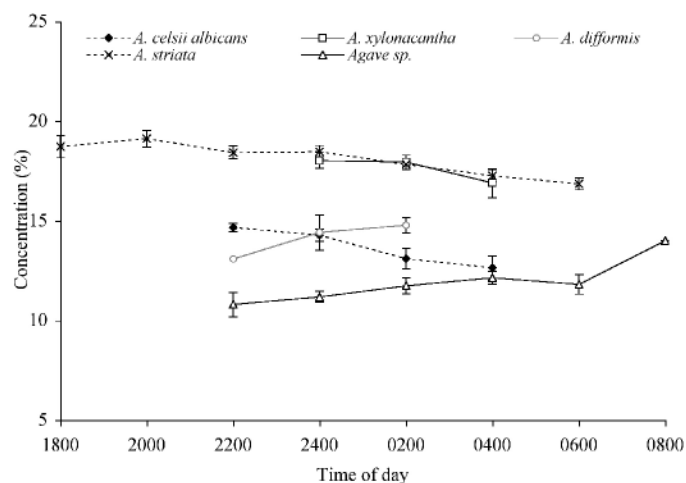


Fig. 4. Percentage of sugar concentration (means \pm SE) in five *Agave* species. The highest concentration of sugar corresponds to *A. striata* and the lowest to *Agave* sp. ($N = 25$ for each species).

13.1%) and *A. celsii albicans* ($\bar{X}_E = 13.77\%$; $\bar{X}_{N-E} = 14.76\%$) (for this pair $t = 2.02$, $P = 0.006$).

Floral morphometry and behavior—The five species showed patterns of floral changes similar to other *Agave* species (Arizaga et al., 2000a; Slauson, 2000; Molina-Freaner and Eguiarte, 2003): they are protandrous, and the staminate phase typically begins on the second day after anthesis followed by the pistillate phase. In Fig. 5 we show how the measurements change over time. The smallest rosettes have a shorter duration of flowering (i.e., *A. celsii albicans*), while the largest species have longer phases (i.e., *Agave* sp. with total duration of flowering of 7 d in contrast to 4 d for *A. celsii albicans*).

Maximum length of all measurements and the day of anther dehiscence and stigma receptivity are shown in Table 3. Although values for the measured structures are different among species, there is not a clear pattern that explains these differences. We found an unusual fusion between corolla and ovary in *A. striata*, and for that reason we only present corolla length in Table 3.

Natural fruit and seed production—Measures of fecundity are shown in Table 4. Among species, fruit set is not correlated with plant size, i.e., some large species have lower fruit set than smaller plants (Table 2). On the contrary, within species fruit set is related to inflorescence height; positive slopes are found for all the species, although for *A. xylonacantha* the slope is almost zero (Fig. 6). The slope was highest for *A. celsii albicans*, second highest for *Agave* sp., and the third steepest slope was observed for *A. difformis*. In these three species, pollinators prefer larger inflorescences according to Schaffer and Schaffer's model of pollinator selectivity (Schaffer and Schaffer, 1977a). The same pattern is observed if we analyze the total number of viable seeds, which is also correlated to plant size: smaller inflorescences yielded fewer seeds and larger inflorescences yielded more seeds (Table 4). Moreover, we observed high variation in fruit set among species and years (Fig. 7); in our estimates of fruit set for 3 yr in *A. difformis*, the differences among years were significant ($F = 11.89$, $df = 2$, 44 , $P = 0.0001$). For three species, data were obtained for two years: *A. xylonacantha* ($t = 2.08$, $P = 0.049$),

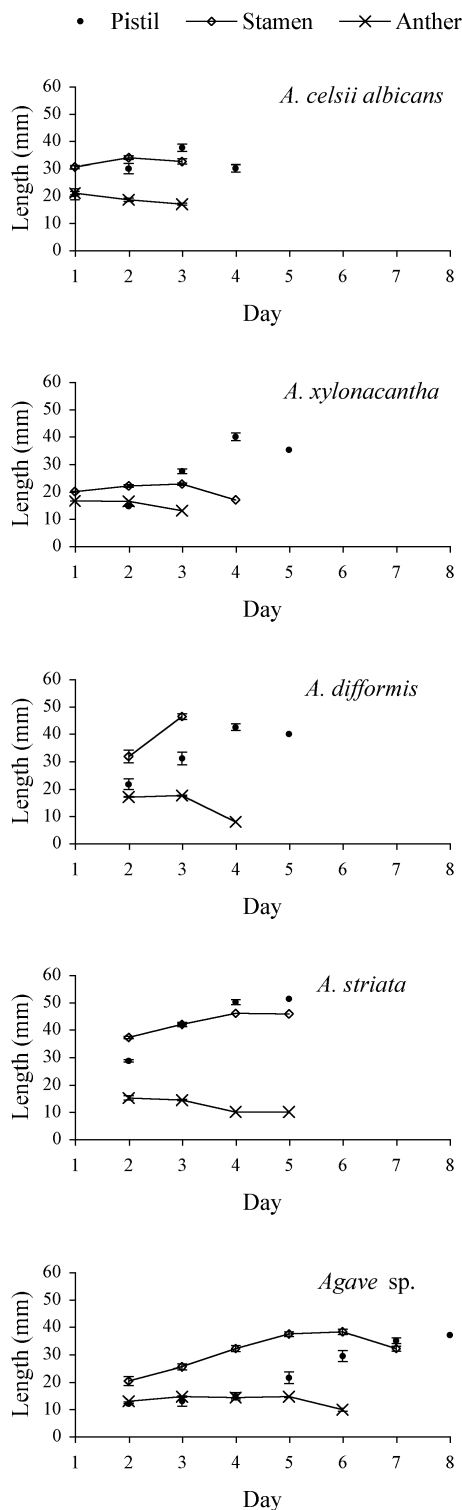


Fig. 5. Flower behavior for five *Agave* species measured every day. Curves show the change through time in pistil, stamen, and anther length. The observed decrement in anther size is due to the shrinking after pollen release ($N = 30$ for each species).

A. striata ($t = 2.71$, $P = 0.107$), and *Agave* sp. ($t = 2.38$, $P = 0.031$), and significant differences between years were only observed in *Agave* sp. If we analyze the three years together, *A. xylonacantha* has the highest fruit set and *A. celsii albicans* and *A. difformis* the lowest. *Agave* sp. also showed high fruit set in 2001, although this value decreased in 2002. On the contrary, *A. striata*, which has the lowest bat visitation frequency, did not show a significantly lower value of fruit set.

Pollination experiments—Pollination experiments generally yielded both low fruit and seed set; the flowers of all studied species appear to be extremely sensitive to manipulation. Even though we tried several different hand-pollination and bagging methods in *A. xylonacantha* and *A. difformis*, none of the methods led to the production of viable fruits and seeds. Therefore, we present only the results for exclusion experiments in *A. celsii albicans* and *Agave* sp., and manual pollinations for *A. celsii albicans*, *A. striata*, and *Agave* sp. (Fig. 8). Exclusion experiments indicated that in *A. celsii albicans*, 20% of the flowers open at night produced fruits, while in *Agave* sp. nocturnal pollinators yielded more fruits than diurnal pollinators. There were no differences in seed set for *Agave* sp. Hand-pollination experiments showed that in *A. celsii albicans* cross-pollinations resulted in the production of fruits, while self-pollination did not yield any fruit. Consequently, seed set was also zero in this species. For *Agave* sp. and *A. striata*, cross-pollination yielded more fruits than self-pollination, seed set was also higher after cross- than self-pollination in *A. striata*, but there were no differences between seed set after cross- or self-pollination in *Agave* sp.

Floral visitors—Observations totaled 924 h (see Table 5 for the observation hours per species). We observed several visitors that fit into five categories: bats (*Leptonycteris curasoae*, *Choeronycteris mexicana*, and *Glossophaga* sp.); hawkmoths (*Hyles lineata*); hummingbirds (*Cyanthus latirostris*, *Calothorax lucifer*, *Eugenes fulgens*), large bees (*Bombus (Fervidobombus) pennsylvanicus sonorosis*, *Xylocopa (Notoxylocopa) tabaniformis*, *X. varipuncta*, *Centris* sp.), and bees (*Apis mellifera*, *Lasioglossum (Lasioglossum) sp.*, *L. (Evylaeus) sp.*). We excluded all the small animals that did not touch the stigma or anthers regularly, such as small bees, flies, and small nocturnal moths; the rest of the visitors were considered potential pollinators and were considered for further analyses. For each *Agave* species, we calculated the percentage that each group of visitors contributed to the total visits (Fig. 9).

This is the first time that bat visitors are reported in *Agave Littaea*, and we found them visiting all the species in this study. Visiting peaks follow nectar production peaks during the night in *A. celsii albicans*, *A. xylonacantha*, and *A. difformis*, and for *A. striata* and *Agave* sp., the peak visitation follows the beginning of the nectar production. Bats are the most important pollinators and represent the majority of visits in *A. difformis* (71%); for *Agave* sp., *A. xylonacantha*, and *A. celsii albicans*, bats represent almost half of the total number of visits (49, 46, and 44% respectively). The only species for which bats are not the most frequent visitor is *A. striata* (comprising only 19% of the visits), and this species has the most diverse assemblage of visitors (Fig. 9).

We also calculated the periods in the observation hours (including day and night observations) when pollinator visitations rates were highest for each species (Table 5). For *A. celsii albicans*, *A. xylonacantha*, and *A. difformis*, the maximum

August 2005]

ROCHA ET AL.—REPRODUCTIVE ECOLOGY OF *AGAVE LITTAEA*TABLE 4. Fruit and seed production for five *Agave* species. Values are means with standard errors in parentheses.

Species	Year	Fruit set	Seed set	Total fruit production	Total viable seeds per fruit	Total viable seeds per inflorescence
<i>A. celsii albicans</i>	2003	0.439 (0.048)	0.350 (0.023)	51 (6.7)	49 (3.96)	2499
<i>A. xylonacantha</i>	2002, 2003	0.629 (0.024)	0.504 (0.034)	572 (54)	129 (10.52)	73 788
<i>A. difformis</i>	2001, 2002, 2003	0.473 (0.021)	0.372 (0.017)	350 (21.7)	66 (4.04)	23 100
<i>A. striata</i>	2001, 2002	0.509 (0.032)	0.319 (0.033)	208 (14.5)	37 (3.53)	7696
<i>Agave</i> sp.	2001, 2002	0.593 (0.035)	0.537 (0.021)	1006 (148.9)	126 (6.57)	126 756

peak of visitors occurred after the maximum production of nectar (Fig. 3), and bats were the main visitors with a high frequency of visits. The maximum peak in *A. striata* coincides with its peak of nectar production. Only in the case of *Agave* sp. did the maximum visitation frequency occur at the beginning of the production of nectar.

Niche overlap—Comparisons of the pollinator assemblages among species are shown in Table 6. Values of niche overlap scales from 0 (no overlap) to 1 (identical composition of pollinators); the similarity index also ranges from 0 to 1 in the same way and takes into account both the identity of pollinators and their relative visitation rates. The lowest niche overlap and similarity indexes were found in *A. striata* compared to the rest of the species (the iteroparous vs. the semelparous species), while the highest similarity and overlap are between *Agave* sp. and *A. xylonacantha* (both belonging to the group Marginatae). Lower values indicate less overlap in pollinator use and, therefore, a larger potential contribution of pollination system to reproductive isolation in these sympatric species.

DISCUSSION

Analyzing the reproductive ecology in *Agave* species in a community context provided new insights into the understanding of the *Littea* subgenus evolution. First of all, there was phenological complementarity in the Metztlán community because the flowering periods of the five species span the en-

tire year. Nevertheless, we found temporal overlap in flowering times for some pairs of species, which may be explained by some other ecological reasons. We found evidence for character displacement in rosette sizes and separation of spatial and temporal resource use in pollinator composition among species. We also found evidence of selection pressures towards semelparity because pollinators are selecting for taller inflorescences in three of the five species. In relation to pollinator composition, we reported the first evidence of bat visitation in the subgenus *Littea* and observed that bats (*Leptonycteris curasoae*, *Choeronycteris mexicana*, and *Glossophaga* sp.) were the primary pollinators in four species. Honeybees, hummingbirds, bumblebees and hawkmoths were also common visitors. We propose that the presence of diurnal pollinators may increase the reproductive success of these species when offering pollinators services additional to the co-adapted pollinator.

Phenological complementarity and character displacement—When analyzing assemblages of species with similar requirements (in this case, species from the same genus and subgenus), we may expect either resource competition or some mechanisms to avoid it, such as character displacement (Morin, 1999; Tokeshi, 1999). As niche theory predicts, the more closely related the species, the more niche axes will be expected to overlap (Schoener, 1989; Silvertown et al., 2001). In this work, we explored three niche axes related to the repro-

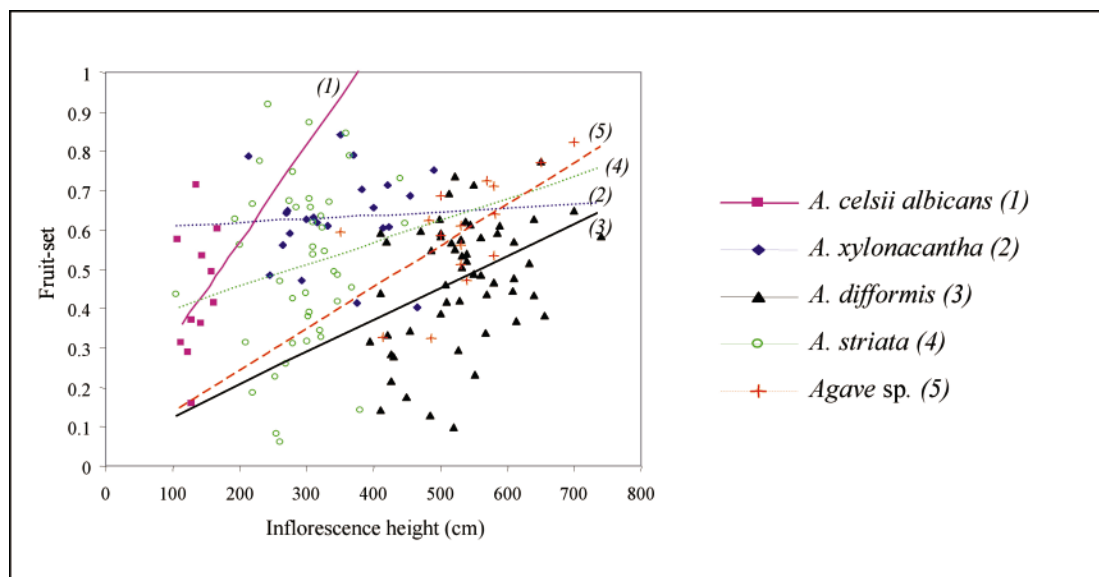


Fig. 6. Allometric relationships between inflorescence height and fruit set in five *Agave* species. Positive slopes in the correlation line exist in all species but *A. xylonacantha* (2).

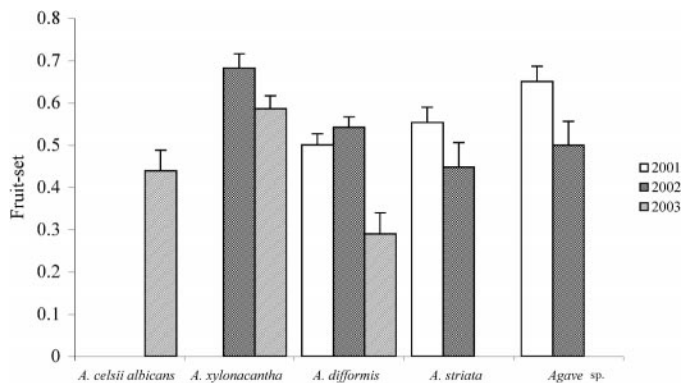


Fig. 7. Natural fruit set for the five *Agave* species in 3 years (for each year $N = 15$ for each species; data are means + SE).

ductive ecology: flowering timing, plant size, and pollinator use. We found some extent of overlap in the flowering periods for three species, but for the five species, the reproductive seasons are distributed throughout the entire year. In this community, differentiation in the flowering time and, hence, phe-

nological complementarity could allow the coexistence of competitors (Rathcke, 1983; Rathcke and Lacey, 1985). Nevertheless, we are aware that our data are qualitative, and quantitative information would be needed to perform formal statistical analysis of the null model distributions of flowering times (Poole and Rathcke, 1979; Rathcke, 1984, 1988). For the species overlapping at the same flowering time, we may find other explanations for their overlap. On one hand, species that flower on the same dates may produce nectar at different times in the night, minimizing possible competition for pollinators. Furthermore, for the pair *A. celsii albicans* and *A. difformis*, that flower at the same time during May and June, there is also spatial separation; *A. celsii albicans* grows in steeper hill-sides with calcareous rocks as a substrate and *A. difformis* grows in drier zones. A similar situation exists between *A. celsii albicans* and *A. xylonacantha*: the latter grows in thin and calcareous soils in the lower parts of the canyon. The evolutionary relevance of the temporal separation in flowering time or phenological asynchrony is that the separation may act as a prezygotic barrier in sympatric species (Husband and Sabara, 2004).

Owing to the importance of “body size” to reproduction in

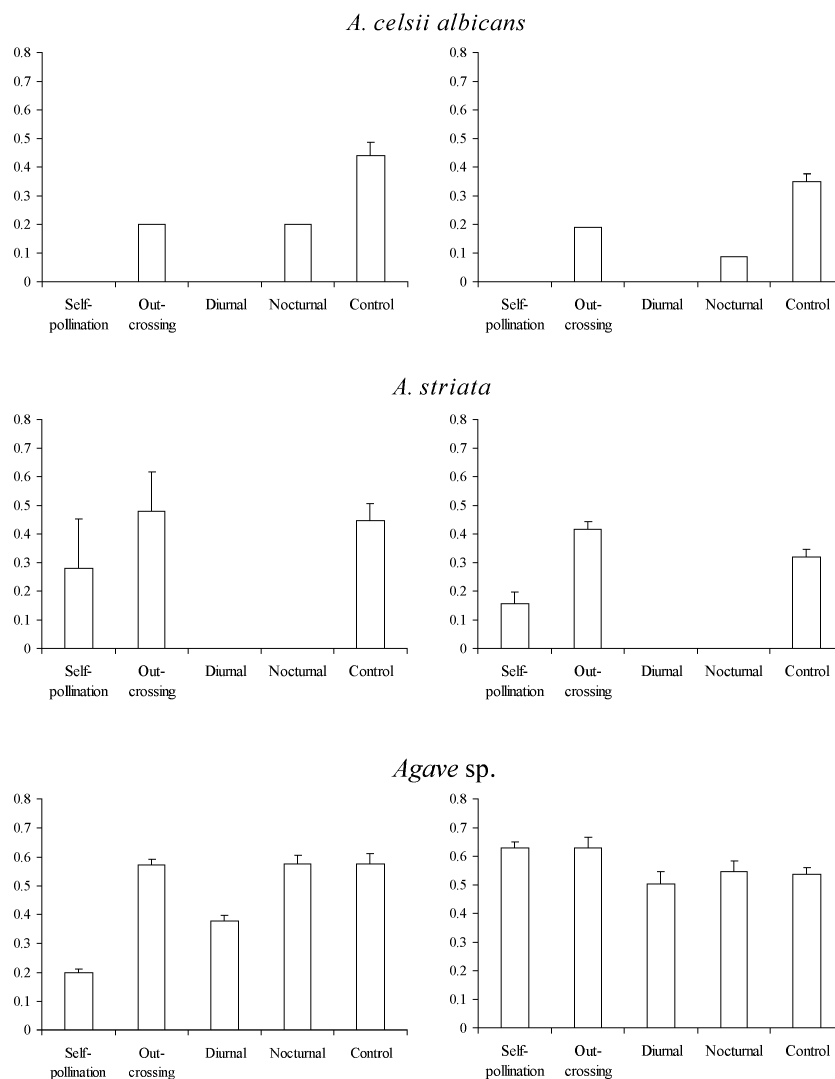


Fig. 8. Experimental fruit set and seed set obtained for three species: *A. celsii albicans*, *A. striata*, and *Agave sp.* (means + SE).

August 2005]

ROCHA ET AL.—REPRODUCTIVE ECOLOGY OF *AGAVE LITTAEA*

TABLE 5. Time and maximum frequency of visitors for each *Agave* species. We show the three hours when the frequency of visitors was the highest, ordered sequentially from the maximum to the third highest for each species and showing the frequency and types of visitors.

Species	Total hours of observation	Time of maximum no. of visits (hours)	Frequency (no. visitors · min ⁻¹ · flower ⁻¹)	Type of visitor
<i>A. celsii albicans</i>	172	0330	0.315	Bats
		0730	0.201	Bees
		0700	0.184	Bumblebees
<i>A. xylonacantha</i>	237	0300	2.7	Bats
		0600	2.25	Bees
		2230	0.516	Bats
<i>A. difformis</i>	175	0030	16.33	Bats
		0630	10.77	Bees
		0200	9.86	Bats
<i>A. striata</i>	159	1930	0.4	Bees
		2000	0.329	Hawkmoths
		0700	0.321	Bumblebees
<i>Agave</i> sp.	181	2200	2.75	Bats
		0830	0.80	Bees
		0900	0.144	Bumblebees

agaves, this niche axis may be as useful in this group of plants as it is in animals to study character displacement (Reich, 2001). Allometric relationships have been considered a surrogate of the relationship between the organism and the environment, and plant size can be used as the orthogonal axis that explains this relationship (Niklas, 1994). We have found differences in plant sizes and allometric relationships that may suggest character displacement.

The parameters evaluated so far illustrated the segregation of habitats and resource distribution that enable the coexistence of these species. Future research on patterns of spatial distribution and fine-scale use of resources, however, is still required for us to fully understand the coexistence of these species.

Floral traits and the bat pollination syndrome—Even though there were no previous reports of bats visiting *Litsea* species, and shifts towards other pollination syndromes were described before for the subgenus, the floral traits analyzed in this study seem to be in agreement with the bat pollination syndrome. For all the species, nectar production was nocturnal, the production peaks are between 2000 hours (in *A. striata*) and 0200 hours (in *A. difformis* and *Agave* sp.), and the sucrose equivalents also fall in the interval preferred by bats (10–19%) (Cruden et al., 1983; Proctor et al., 1996; Tschapka and Dressler, 2002). In the case of *A. striata*, the time of nectar production overlaps with the visitation times of diurnal pollinators, suggesting a slight shift to diurnal pollination.

TABLE 6. Comparisons of values of niche overlap in animal floral visitors (above diagonal) and similarity indexes in frequency of visitors (below diagonal) among species pairs. Mean of niche overlap is 0.816; values over the mean are in boldface type. Mean similarity index was 0.694; boldface type indicates high similarity.

Species	<i>A. celsii albicans</i>	<i>A. xylonacantha</i>	<i>A. difformis</i>	<i>A. striata</i>	<i>Agave</i> sp.
<i>A. celsii albicans</i>	—	0.929	0.916	0.699	0.918
<i>A. xylonacantha</i>	0.796	—	0.913	0.722	0.998
<i>A. difformis</i>	0.714	0.745	—	0.451	0.924
<i>A. striata</i>	0.647	0.612	0.392	—	0.688
<i>Agave</i> sp.	0.752	0.955	0.764	0.567	—

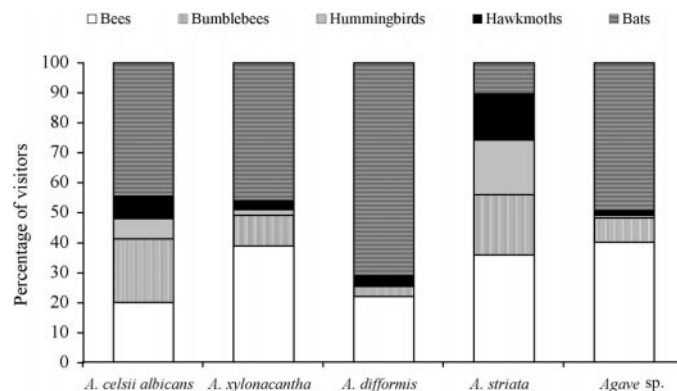


Fig. 9. Percentages of different groups of visitors to flowers of the five *Agave* species. Data plotted together for 2 years (except for *A. celsii albicans*, in which data were obtained for only 1 year).

Additionally, our successful pollination experiments showed that nocturnal pollinators are responsible for the production of more viable fruits, but diurnal pollinators still have an effect when producing fruits and viable seeds in *Agave* sp. Nevertheless, we have limited results only for *A. celsii albicans* and *A. striata* and none for *A. xylonacantha* and *A. difformis*. We need further analyses to be able to demonstrate that other visitors, such as bees, hummingbirds, or hawkmoths, are active pollinators, although previous works have shown that these animals are indeed true pollinators in *Agave Littaea* species (Slauson, 2001; Silva-Montellano and Eguiarte, 2003).

Reproductive success and the evolution of life history strategies—We found a positive correlation in inflorescence height vs. fruit set in *A. celsii albicans*, *A. difformis*, and *Agave* sp., while there is no significant correlation in *A. striata* and *A. xylonacantha*. The rosettes of *A. striata* did not die after reproduction, and so they adjust to Schaffer and Schaffer's (1977a) prediction that in iteroparous species pollinators do not select for larger inflorescences. But on the other hand, in *A. xylonacantha* there is no correlation, and an alternative explanation is that this species is more resource-limited, although detailed experiments are needed to corroborate this (see for instance Parra-Tabla et al., 1998).

Comparing patterns of reproductive success may provide an important contribution to the understanding of semelparous and iteroparous reproductive strategies and size/fecundity patterns in closely related plants. In semelparous species, fruit set is usually positively correlated with inflorescence height, while in contrast, both pollinator preference and fruit set are independent of inflorescence size in congeneric iteroparous species (Young, 1990). Reproductive output in semelparous organisms should be more sensitive to increases in resources (Young and

Augspurger, 1991), and there is evidence of an increasing reproductive output as a function of inflorescence size in several rosette-bearing species including *Lobelia telekii* (Schaffer and Schaffer, 1977a, 1979; Young, 1990; Young and Augspurger, 1991). Moreover, individuals of the semelparous *Yucca whipplei* var. *whipplei* produced larger inflorescences, with more flowers and more seed-bearing fruits than did individuals of the iteroparous *Y. whipplei* var. *caespitosa* (Huxman and Loik, 1997).

In general terms, optimal foraging theory predicts that pollinators should associate a taller plant with increased reward, and an increase in pollinator visitation frequency to individuals has been generally assumed to increase the proportion of flowers visited (Schaffer and Schaffer, 1977a, 1979). Larger inflorescences are thus produced as a result of differential pollinator preference (Schaffer and Schaffer, 1979). However, experimental studies in yuccas and agaves showed that on *Yucca whipplei* and *A. chrysantha* fruit set was usually limited by resources and not by pollinators (Acker, 1982; Sutherland, 1982). Resource limitation may explain the lack of correlation in fruit set and inflorescence size in *A. xylonacantha*, because we observed that this species tolerates the harshest and driest conditions in the canyon and reproduces in the drier season.

Visitation patterns and competition for pollinators—This is the first report of bats visiting *Littaea* species, and bats were the most important visitor in four of the five species. As stated before, the floral traits are clearly associated with a bat pollination syndrome, and visiting patterns confirm that bats are the co-adapted pollinators in this community.

We compared the pollinator fidelity using niche overlap and similarity indexes, both showing that the most similar composition exists between *A. xylonacantha* and *Agave* sp., which are separated temporally, the former flowering in spring and the latter in autumn. For species flowering at the same time, values are low in the pair *A. celsii albicans* vs. *A. xylonacantha*, although values are high in the pair *A. celsii albicans* and *A. difformis*, which may avoid possible competition among pollinators by growth in different microhabitats and perhaps by size differentiation of the inflorescence. The lowest overlap/similarity values are for the pair *A. striata* and *A. difformis*, in which we found a slight shift to diurnal pollinators in the former.

A generalist or a specialist system?—Extreme specialization in pollination is rare and risky, and those systems in which a plant depends on only one pollinator are more susceptible to fail in reproduction due to the lack of pollinators (Howell and Roth, 1981; Kearns et al., 1998). The more generalist plants can resist the disappearance or the temporal absence of one of their pollinators (Gomez, 2002).

In the case of *Agave Littaea* pollination, generalization may contribute to reproductive success with an additive effect supplementary to that produced by visits of the co-adapted pollinators; this response to new pollinators may be due to the high variability in bat visits. In this study we observed days and weeks when bats were absent in parts of the populations (data not shown), threatening the success of some individuals. Moreover, after nights when bats were absent, inflorescences offered a very abundant resource for diurnal pollinators. The shift to diurnal pollinators is notorious in *A. striata*, for which diurnal pollinators accounted for almost 60% of visitations, while in the rest of the species (except *A. difformis*) bats rep-

resent almost half of all visits. Maintenance of bat specialization in some species may have several explanations. First of all, new pollinators are not likely either to stop or to destroy the genetic integration that conforms a floral type once it has evolved in response to the co-adapted pollinator. Bond (1994) suggested that many plants with specialized pollination systems have alternative reproductive mechanisms such as clonality, longevity, and facultative self-pollination, and all of these traits are present in the *Agave* genus.

The dichotomy *Agave-Littaea* and the geographic trend—Species belonging to the subgenus *Littaea* were previously thought to be insect- or bird-pollinated (Schaffer and Schaffer, 1977b; Eguiarte et al., 2000; Slauson, 2001). In particular, our results contrast with the most recent study on floral visitors of another *Agave Littaea*: *A. lechuguilla*, which is a member of the group Marginatae (*A. difformis* and *A. xylonacantha* and *Agave* sp. belong to the same group). Floral morphology of *A. lechuguilla* is very similar to the species studied in this work, but no bat visits were reported (Silva-Montellano and Eguiarte, 2003). Another issue in analyzing patterns of pollination biology is the notion that tropical pollination systems are more specialized than temperate systems (Feinsinger, 1983; Johnson and Steiner, 2000), although recent reviews of specialization across latitudinal gradients present conflicting conclusions (Olesen and Jordano, 2002; Ollerton and Cranmer, 2002). There is evidence of this geographical trend in some *Agave* (subgenus *Agave*) species; tropical species show more specialization than species outside the tropics (Arizaga et al., 2000a, b; Slauson, 2000, 2001). A similar pattern is observed in a plant system similar to that of *Agave*, the case of bat-pollinated columnar cacti (Valiente-Banuet et al., 1996; Fleming et al., 1998, 2001; Fleming and Valiente-Banuet, 2002). Valiente-Banuet and colleagues (1996) suggested that generalized systems are favored in the northern distributional limits of columnar cacti because of the variation in the abundance of migratory nectar-feeding bats. When the effective pollinator of a plant is unreliable in space and time, natural selection should favor traits that increase its spectrum of pollinators or that favor a switch from an unreliable to a reliable pollinator (Fleming, 2000). The species richness of nectar-feeding bats in Mexico reaches maximum values along the Pacific versant (the Balsas region) and decreases with latitude (Arita and Santos-del-Prado, 1999; Rojas-Martinez et al., 1999). In northern columnar cacti, bat unpredictability has been suggested as the major ecological force behind the evolution of generalized pollination systems (Valiente-Banuet et al., 1996), and we might expect the same model in *Agave*. This may be the explanation for generalized systems found in the *Littaea* species reported previously because those studies were carried out in regions beyond the nectarivorous bat's distribution. The high visitation rates of bats in Metztitlán may be due to the high abundance of bats in Central Mexico, which in some cases (particularly for *A. difformis*, *A. xylonacantha*, and *Agave* sp.) may contribute to their reliability as pollinators. The results of this work confirm the co-adaptation (in a very broad sense) of bats and agaves, not only for the subgenus *Agave*, but for the subgenus *Littaea* as well.

LITERATURE CITED

- AARSSSEN, L. W. 1995. Hypotheses for the evolution of apical dominance in plants: implications for the interpretation of overcompensation. *Oikos* 74: 149–156.

August 2005]

ROCHA ET AL.—REPRODUCTIVE ECOLOGY OF *AGAVE LITTEA*

- ACKER, C. L. 1982. Regulation of flower, fruit and seed production by a monocarpic perennial, *Yucca whipplei*. *Journal of Ecology* 70: 357–372.
- ARITA, H. T., AND K. SANTOS-DEL-PRADO. 1999. Conservation biology of nectar-feeding bats in Mexico. *Journal of Mammalogy* 80: 31–41.
- ARIZAGA, S., E. EZCURRA, E. PETERS, F. R. DE ARELLANO, AND 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: 1004–1010.
- ARIZAGA, S., E. EZCURRA, E. PETERS, F. R. DE ARELLANO, AND E. VEGA. 2000b. Pollination ecology of *Agave macroacantha* (Agavaceae) in a Mexican tropical desert. II. The role of pollinators. *American Journal of Botany* 87: 1011–1017.
- BOND, W. J. 1994. Do mutualisms 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.
- CRUDEN, R. W., S. M. HERMANN, AND S. PETERSON. 1983. Patterns of nectar production and plant–pollinator coevolution. In B. Bentley and T. Elias [eds.], *The biology of nectaries*, 80–125. Columbia University Press, New York, New York, USA.
- DONNELLY, S. E., C. J. LORTIE, AND L. W. AARSSSEN. 1998. Pollination in *Verbascum thapsus* (Scrophulariaceae): the advantage of being tall. *American Journal of Botany* 85: 1618–1625.
- EGUIARTE, L. E., V. SOUZA, AND 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.
- FAEGRI, K., AND L. VAN DER PIJL. 1966. *The principles of pollination ecology*. Pergamon, Oxford, UK.
- FEINSINGER, P. 1983. Coevolution and pollination. In D. J. Futuyma and M. Slatkin [eds.], *Coevolution*, 282–331. Sinauer, Sunderland, Massachusetts, USA.
- FLEMING, T. H. 2000. Pollination of cacti in the Sonoran Desert. *American Scientist* 88: 432–439.
- FLEMING, T. H., S. MAURICE, AND J. L. HAMRICK. 1998. Geographic variation in the breeding system and the evolutionary stability of trioecy in *Pachycereus pringlei* (Cactaceae). *Evolutionary Ecology* 12: 279–289.
- FLEMING, T. H., C. T. SAHLEY, J. N. HOLLAND, J. D. NASON, AND J. L. HAMRICK. 2001. Sonoran Desert columnar cacti and the evolution of generalized pollination systems. *Ecological Monographs* 71: 511–530.
- FLEMING, T. H., AND A. VALIENTE-BANUET. 2002. Columnar cacti and their mutualists. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona, USA.
- GALVÁN, R., AND L. HERNÁNDEZ-SANDOVAL. 2002. *Agave garciae-mendozae*, a new species from central Mexico. *Cactus and Succulent Journal* 74: 188–191.
- GARCÍA-MENDOZA, A. 2002. Distribution of *Agave* (Agavaceae) in Mexico. *Cactus and Succulent Journal* 74: 177–186.
- GENTRY, H. S. 1982. *Agaves of continental North America*. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona, USA.
- GOMEZ, J. M. 2002. Generalizations in the interactions between plants and pollinators. *Revista Chilena de Historia Natural* 75: 105–116.
- HOWELL, D. 1972. Physiological adaptations in the syndrome of chiropterophily with emphasis on the bat *Leptonycteris lydekkeri*. Ph.D. dissertation, University of Arizona, Tucson, Arizona, USA.
- HOWELL, D., AND B. S. ROTH. 1981. Sexual reproduction in agaves: the benefits of bats, the cost of semelparous advertising. *Ecology* 62: 1–7.
- HUSBAND, B. C., AND H. A. SABARA. 2004. Reproductive isolation between autotetraploids and their diploid progenitors in fireweed, *Chamerion angustifolium* (Onagraceae). *New Phytologist* 161: 703–713.
- HUXMAN, T. E., AND M. E. LOIK. 1997. Reproductive patterns of two varieties of *Yucca whipplei* (Liliaceae) with different life histories. *International Journal of Plant Sciences* 158: 778–784.
- JOHNSON, S. D., AND K. E. STEINER. 2000. Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 140–143.
- KAY, K. M., AND D. W. SCHEMSKE. 2003. Pollinator assemblages and visitation rates for 11 species of neotropical *Costus* (Costaceae). *Biotropica* 35: 198–207.
- KEARNS, C. A., D. W. INOUE, AND N. M. WASER. 1998. Endangered mutualisms: the conservation of plant–animal interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 83–112.
- 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.
- MOLINA-FREANER, F., AND 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: 1016–1024.
- MORIN, P. J. 1999. *Community ecology*. Blackwell Science, Malden, Massachusetts, USA.
- NIKLAS, K. 1994. *Plant allometry*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA.
- OLESEN, J. M., AND P. JORDANO. 2002. Geographic patterns in plant–pollinator mutualistic networks. *Ecology* 83: 2416–2424.
- OLLERTON, J., AND L. CRANMER. 2002. Latitudinal trends in plant–pollinator interactions: are tropical plants more specialized? *Oikos* 98: 340–345.
- ORNELAS, J. F., M. ORDANO, A. HERNANDEZ, J. C. LOPEZ, L. MENDOZA, AND Y. PERRONI. 2002. Nectar oasis produced by *Agave marmorata* Roez. (Agavaceae) lead to spatial and temporal segregation among nectarivores in the Tehuacan Valley, Mexico. *Journal of Arid Environments* 52: 37–51.
- PARRA-TABLA, V., C. F. VARGAS, AND L. E. EGUIARTE. 1998. Is *Echeveria gibbiflora* (Crassulaceae) fecundity limited by pollen availability? An experimental study. *Functional Ecology* 12: 591–595.
- PIANKA, E. R. 1975. Niche relations of desert lizards. In M. L. Cody and J. M. Diamond [eds.], *Ecology and evolution of communities*, 292–314. Belknap Press of Harvard University Press, Boston, Massachusetts, USA.
- POOLE, R. W., AND B. J. RATHCKE. 1979. Regulatory randomness, and aggregation in flowering phenologies. *Science* 203: 470–471.
- PROCTOR, M., P. YEO, AND A. LACK. 1996. *The natural history of pollination*. Timber Press, Portland, Oregon, USA.
- RATHCKE, B. J. 1983. Competition and facilitation among plants for pollination. In L. A. Real [ed.], *Pollination biology*, 305–329. Academic Press, New York, New York, USA.
- RATHCKE, B. J. 1984. Patterns of flowering phenologies testability and causal inference using a random model. In D. R. Strong, D. Simberloff, L. G. Abele, and A. B. Thistle [eds.], *Ecological communities: conceptual issues and the evidence*, 383–393. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, USA.
- RATHCKE, B. J. 1988. Flowering phenologies in a shrub community competition and constraints. *Journal of Ecology* 76: 975–994.
- RATHCKE, B. J., AND E. P. LACEY. 1985. Phenological patterns of terrestrial plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 179–214.
- REICH, P. B. 2001. Body size, geometry, longevity and metabolism: do plant leaves behave like animal bodies? *Trends in Ecology and Evolution* 16: 674–680.
- ROJAS-MARTINEZ, A., A. VALIENTE-BANUET, M. C. ARIZMENDI, A. ALCANTARA-EGUREN, AND H. T. ARITA. 1999. Seasonal distribution of the long-nosed bat (*Leptonycteris curasoae*) in North America: does a generalized migration pattern really exist? *Journal of Biogeography* 26: 1065–1077.
- SÁNCHEZ-MEJORADA, H. 1978. *Manual de campo de las cactáceas y suculentas de la Barranca de Metztitlán*. Sociedad Mexicana de Cactología, Mexico City, Mexico.
- SAS INSTITUTE. 1997. *JMP statistical software package, version 3.1*. SAS Institute, Cary, North Carolina, USA.
- SCHAFFER, W. M., AND M. L. ROSENZWEIG. 1977. Selection for optimal life histories: II. Multiple equilibria and the evolution of alternative reproductive strategies. *Ecology* 58: 60–72.
- SCHAFFER, W. M., AND M. V. SCHAFFER. 1977a. The adaptive significance of variations in reproductive habit in the Agavaceae. In B. Stonehouse and C. M. Perrins [eds.], *Evolutionary ecology*, 261–276. Macmillan, London, UK.
- SCHAFFER, W. M., AND M. V. SCHAFFER. 1977b. The reproductive biology of Agavaceae. I. Pollen and nectar production in four Arizona agaves. *Southwestern Naturalist* 22: 157–168.
- SCHAFFER, W. M., AND M. V. SCHAFFER. 1979. The adaptive significance of variations in reproductive habitat in the Agavaceae. II. Pollinator foraging behavior and selection for increased reproductive expenditure. *Ecology* 60: 1051–1069.
- SCHOENER, T. W. 1989. The ecological niche. In J. M. Cherritt [ed.], *Ecological concepts*, 79–113. Blackwell, Oxford, UK.
- SILVA-MONTELLANO, A., AND L. E. EGUIARTE. 2003. 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: 377–387.
- SILVERTOWN, J., M. DODD, AND D. GOWING. 2001. Phylogeny and the niche

AMERICAN JOURNAL OF BOTANY

[Vol. 92]

- structure of meadow plant communities. *Journal of Ecology* 89: 428–435.
- SLAUSON, L. A. 2000. Pollination biology of two chiropterophilous agaves in Arizona. *American Journal of Botany* 87: 825–836.
- SLAUSON, L. A. 2001. Insights on the pollination biology of *Agave* (Agavaceae). *Haseltonia* 8: 10–23.
- SUTHERLAND, S. D. 1982. The pollination biology of paniculate agaves: documenting the importance of male fitness in plants. Ph.D. dissertation, University of Arizona, Tucson, Arizona, USA.
- SUTHERLAND, S. D. 1986. Patterns of fruit-set: what controls fruit-flower ratios in plants? *Evolution* 40: 117–128.
- SUTHERLAND, S. D. 1987. Why hermaphroditic plants produce many more flowers than fruits: experimental tests with *Agave mckelveyana*. *Evolution* 41: 750–759.
- TAMBUTTI, M. 2002. Diversidad del género *Agave* en México: una síntesis para su conservación. Undergraduate dissertation, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico.
- TOKESHI, M. 1999. Species coexistence. Ecological and evolutionary perspectives. Blackwell Science, Oxford, UK.
- TSCHAPKA, M., AND S. DRESSLER. 2002. Chiropterophily: on bat-flowers and flower bats. *Curtis's Botanical Magazine (series 6)* 19: 114–125.
- VALIENTE-BANUET, A., M. C. ARIZMENDI, A. ROJAS-MARTINEZ, AND L. DOMÍNGUEZ-CANSECO. 1996. Ecological relationships between columnar cacti and nectar feeding bats in Mexico. *Journal of Tropical Ecology* 12: 103–119.
- YOUNG, T. P. 1990. Evolution of semelparity in Mount Kenya lobelias. *Evolutionary Ecology* 4: 157–171.
- YOUNG, T. P., AND C. K. AUGSPURGER. 1991. Ecology and evolution of long-lived semelparous plants. *Trends in Ecology and Evolution* 6: 285–289.

CAPÍTULO 4

GENÉTICA DE POBLACIONES EN CINCO ESPECIES DE *Agave (Littaea)*: PATRONES DE VARIACIÓN Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA

Para las cinco especies que a partir del año 2000 se han estado estudiando en la Barranca de Metztitlán, se realizó un estudio comparativo de la genética de las poblaciones dentro y entre las especies. Hemos demostrado el uso de marcadores moleculares inespecíficos (ISSRs) como un marcador útil para comprender los patrones de distribución de la diversidad genética. En este capítulo se realizó también una comparación de diferentes métodos de análisis estadísticos disponibles en la actualidad, para poder compensar la desventaja de trabajar con marcadores dominantes y así obtener estimaciones más precisas de los índices de diversidad y estructura genética.

4.1 Antecedentes

4.1.1 Estudios previos de genética de poblaciones en el género *Agave*

Hasta la fecha, han sido pocos los trabajos que se han realizado sobre la genética de poblaciones en especies de *Agave* y la mayoría de éstos se han efectuado en México (una revisión detallada se encuentra en Eguiarte y colaboradores, 2000).

Antes del desarrollo de los marcadores de ADN en agaves, se usó de manera intensiva la electroforesis de isoenzimas en estudios de genética de poblaciones. Por ejemplo, usando isoenzimas, Martínez-Palacios y colaboradores (1999) analizaron los niveles de variación genética en la especie *A. victoriae-reginae*. Esta especie es la única del género que se encuentra en la categoría de amenazada de acuerdo a la NOM-059-SEMARNAT-2001 (<http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/ise/fichas/doctos/plantas.html>). Estos autores demostraron que los niveles de variación y diferenciación genética en 10 poblaciones de la especie fueron altos ($H=0.33$, $F_{ST}=0.236$); además encontraron tres grupos diferenciados genéticamente y un flujo génico bajo entre las poblaciones. En este estudio se concluye que cada población podría representar una unidad evolutiva independiente, lo que tiene importantes implicaciones en el manejo y la conservación de la especie (Eguiarte et al., 2000).

Por su parte, Silva-Montellano y Eguiarte (2003b) examinaron los niveles de variación genética en *A. lechuguilla*, especie con una distribución muy amplia en México, también usando electroforesis de isoenzimas y ensayando 13 loci. Ellos encontraron que los niveles de variación fueron altos ($H=0.394$), pero no encontraron patrones geográficos en dicha variación y la diferenciación genética entre poblaciones fue baja ($\theta=0.083$). También encontraron diferencias entre las poblaciones al norte de la distribución de la especie, en las que había un exceso de homócigos y menor flujo génico; mientras que en las poblaciones del sur había un exceso de heterócigos y un flujo génico mayor.

Para el caso de especies cultivadas, usando también electroforesis de isoenzimas, se estudió la variación genética en el agave productor de henequén *A. fourcroydes* (Colunga-GarcíaMarín et al., 1999) y se encontró que a diferencia de su ancestro *A. angustifolia* que tiene niveles de variación altos, las tres variedades de henequén

analizadas no mostraron diversidad genética, debido a que todos los individuos dentro de cada variedad fueron idénticos. Posteriormente, usando RAPDs como marcadores, Gil-Vega y colaboradores (2001) encontraron que tampoco había variación genética en *A. tequilana*, la especie empleada para la producción de tequila. Este mismo grupo de investigación recientemente encontró diferencias genéticas entre variedades de agave azul empleando AFLPs (Gil-Vega et al., 2006).

Por su parte, y también empleando RAPDs pero en este caso en especies silvestres, Navarro-Quezada y colaboradores (2003) describieron la variación y estructuración genética en el complejo de *A. deserti* (que incluye las especies *A. deserti*, *A. cerulata* y *A. subsimplex*), con el objetivo de entender los procesos de especiación dentro del complejo. En este caso, las tres especies mostraron niveles de variación genética moderados y de diferenciación bajos ($H=0.12-0.29$, $G_{ST}=0.11$), además tomando en cuenta que las distancias genéticas fueron pequeñas, los autores han puesto en duda el estatus taxonómico de las tres especies, porque podrían considerarse subespecies de una misma especie.

Recientemente, en un estudio comparativo de dos especies que se usan en la producción de mezcal: *A. cupreata* y *A. potatorum*, Aguirre (2004) usando 36 loci obtenidos con ISSRs, encontró niveles altos de diversidad ($P=89\%$, $H=0.25$ y $P=83\%$, $H=0.24$ respectivamente). En estas dos especies se encontraron diferencias en la estructuración de la diversidad y en las distancias genéticas, con lo cual se propusieron estrategias de manejo diferentes: para *A. cupreata* las poblaciones están más diferenciadas ($F_{ST}=0.145-0.192$) y existe menor flujo génico ($Nm=1.49$) y se sugieren tres grupos potenciales de manejo, mientras que para *A. potatorum* la estructuración fue menor ($F_{ST}=0.084-0.099$) y mayor el flujo génico ($Nm=2.99$); en este caso se propusieron dos grupos de manejo.

Para la región central de México y en particular para la zona de Metztitlán, González (2004) describió la variación genética de *A. garciae-mendozae*, una especie descrita recientemente (Galván y Hernández-Sandoval, 2002) y distribuida en los estados de Hidalgo, Querétaro y San Luis Potosí, como en otras especies del género, se encontraron niveles de variación genética y flujo génico altos ($H=0.27$ y $Nm=1.3$), así como niveles bajos de diferenciación ($\theta=0.098$).

En general, los estudios han demostrado un nivel alto de variación genética, niveles bajos de diferenciación genética y niveles altos de flujo génico, lo cual puede explicarse por la alta movilidad de los polinizadores de los agaves (ver mas adelante).

4.1.2 Análisis de genética de poblaciones usando los marcadores ISSR

A partir de la implementación de las nuevas técnicas moleculares empleando PCR, se difundió ampliamente el uso de los RAPDs como marcador multilocus en genética de poblaciones. Como se mencionó en la sección anterior, se han publicado algunos trabajos de genética de *Agave* usando esta técnica (Trame et al., 1995; Gil et al., 2001; Navarro-Quezada et al., 2003).

Los RAPDs tienen la ventaja sobre otros marcadores de producir un gran número de bandas, aunque por presentar ciertas dificultades técnicas cada vez ha disminuido más su uso e incluso algunas revistas científicas desalientan su uso (Schlotterer, 2004). De entre los problemas que presentan destacan su baja reproducibilidad, la competencia por los sitios de unión de los iniciadores (Halldén et al., 1996), así como la presencia de artefactos de amplificación y la falta de homología de bandas del mismo tamaño (Wolfe y Liston, 1998).

Los ISSRs (Inter Simple Sequence Repeats) por otro lado, se encuentran en regiones muy variables dentro del genoma, de manera que producen información útil para el estudio de la diversidad genética a nivel poblacional (Wolfe, 2005). Tienen varias ventajas sobre los RAPDs debido a que los iniciadores para su amplificación son más largos y se pueden usar temperaturas de alineación más astringentes (Wolfe y Liston, 1998), lo que produce una mayor especificidad en la reacción, misma que evita los artefactos y hace que las bandas sean reproducibles (Nagaoka y Ogihara, 1997; Wolfe et al., 1998). Además se ha demostrado que la mayoría de bandas producidas por ISSRs (al menos el 96%) segregan de manera mendeliana (Zietkiewicz et al., 1994; Tsumura et al., 1996). Después de diversos estudios, se ha recomendado el uso de ISSRs sobre los RAPDs porque son altamente sensibles, reproducibles y por presentar bajo costo (Nagaoka y Ogihara, 1997), además, en estudios donde se ha encontrado bajo nivel de variación con otros marcadores como isoenzimas, los ISSRs han revelado mayor sensibilidad (Zietkiewicz et al., 1994). Sin embargo, siguen presentando algunas de las desventajas de los RAPDs, especialmente por el hecho de que son marcadores

dominantes (ver más adelante).

Los ISSRs han sido empleados para discriminar de manera exitosa taxa a nivel de especie y por debajo de ésta (Wolfe et al., 1998; Culley y Wolfe, 2001; Wolfe y Randle, 2001). Actualmente existen reportados una gran cantidad de iniciadores para ISSRs que están disponibles para ensayar, además de que se pueden seguir generando otros porque cada vez se conoce un mayor número de secuencias repetidas en genomas eucariontes (Tautz y Renz, 1984).

Como puede verse, el potencial del uso de ISSRs es muy alto, aunque la mayor parte de los estudios que se han realizado hasta la fecha, han sido los enfocados a la discriminación de cultivares en especies de importancia agrícola como arroz (Blair et al., 1999; Joshi et al., 2000; Nagaraju et al., 2002; Saini et al., 2004), trigo (Nagaoka y Ogihara, 1997; Ammiraju et al., 2001; Pujar et al., 2002), maíz (Kantety et al., 1995), cebada (Fernandez et al., 2002) coliflor (Bornet et al., 2002a), papa (Bornet et al., 2002b), algodón (Liu y Wendel, 2001), jitomate (Kochieva et al., 2002; Tikunov et al., 2003)}, etc.

Uno de estos primeros estudios empleando ISSRs en poblaciones silvestres fue el de Tsumura y colaboradores (1996), quienes analizaron los niveles de variación en *Pseudotsuga menziesii* y *Cryptomeria japonica*. Esselman y colaboradores (1999) encontraron niveles moderados de diferenciación genética entre poblaciones en *Calamagrostis porteri* (Poaceae). Posteriormente Wolfe y colaboradores (1998) estudiaron los patrones de hibridación y especiación híbrida en *Penstemon* (Scrophulariaceae); estos autores reportaron valores de P de 72 a 95%. Por su parte, Wolfe y Randle (2001) examinaron la taxonomía y las relaciones genéticas en *Hyobanche* (Orobanchaceae) y encontraron valores de P de 64 a 96% en cuatro taxa. Posteriormente, Culley y Wolfe (2001) discriminaron entre dos variedades de *Viola pubescens*, con un 100% de loci polimórficos. Mengistu y colaboradores (2002) determinaron la diversidad genética de *Kochia* usando 45 marcadores de ISSR y encontraron una diversidad genética alta ($H=0.35$), los datos de este trabajo han permitido demostrar que a pesar de las generaciones de selección por el uso de herbicidas, esta planta mantiene niveles altos de diversidad genética debida probablemente a los niveles altos de flujo génico entre las poblaciones ($H_S = 0.31$; $G_{ST}=0.09$; AMOVA=90% de la variación dentro de las poblaciones).

Recientemente, se han publicado trabajos en los que se comparan especies raras y comunes o con presiones de conservación usando estos marcadores: Smith y Bateman (2002) encontraron menor diferenciación genética entre las poblaciones de *Eriogonum hockleyi* var. *packardae* que en la variedad ampliamente distribuida *E. s.* var. *shockleyi*. Por otra parte, Ge y colaboradores (2003) estudiaron a *Tetraena mongolica* Maxim, una especie endémica de Mongolia y críticamente en peligro. Estudiaron la variación genética entre y dentro de las ocho poblaciones que sobreviven de la especie usando 13 iniciadores de ISSR, contrario a lo esperado, se encontraron niveles intermedios de diversidad y lo atribuyen a que la especie estuvo en un refugio durante la última glaciación (a nivel poblacional: $P=48.1\%$, $H_E=0.177$ y $H_S=0.264$; a nivel de especie: $P=63.3\%$, $H_T=0.213$). Se encontraron bajos niveles de diferenciación genética según el análisis de Nei (16.91%), el índice de diversidad de Shannon (18.83%) y el AMOVA (15.2%), esta baja diferenciación puede ser explicada por el alto flujo génico.

Por lo anterior, estos marcadores demuestran ser una herramienta molecular adecuada para ser usada en plantas mexicanas.

4.2 Metodología

4.2.1 Obtención de muestras

De las especies reportadas para la Barranca de Metztitlán (ver capítulo 1), se decidió hacer el análisis de la genética de las cinco especies más representativas de las cuales se tiene información de su biología reproductiva (capítulo 3): *A. difformis*, *A. hidalguensis*, *A. xylonacantha*, *A. celsii albicans* y *A. striata*. Para cada especie, se colectaron 3 poblaciones dentro de la Barranca de Metztitlán, a excepción de *A. hidalguensis*, especie de la cual sólo se encontraron dos poblaciones, mismas que fueron colectadas. La localización de estas poblaciones puede verse en la Figura 8. Adicionalmente se buscó una población fuera de la Barranca para abarcar un área mayor de la distribución de cada especie. Para el caso de *A. celsii albicans*, no existen poblaciones reportadas de esta subespecie fuera de la Barranca de Metztitlán (porque la subespecie es endémica de la barranca) por lo que se colectó una población de *A. celsii*. Todas las poblaciones y su localización se listan en la Tabla 4.

En cada población se colectaron 40 individuos, procurando que la distancia entre cada individuo fuera mayor a 10 m, para evitar que se muestrearan dos individuos genéticos iguales (debido a la alta clonalidad que se ha observado en agaves). De cada individuo se cortó la penca más joven localizada al centro de la roseta. Las pencas fueron trasladadas al laboratorio para ser procesadas (no fue necesario congelar ni refrigerar las muestras, debido a que la experiencia ha demostrado que el ADN de los agaves puede obtenerse fácilmente incluso si las pencas han permanecido cortadas por varios días). En el laboratorio se recortaron pedazos centrales de tejido de aproximadamente 5 x 5 cm, se etiquetaron, se envolvieron en papel aluminio y se almacenaron a -80°C en un ultracongelador.

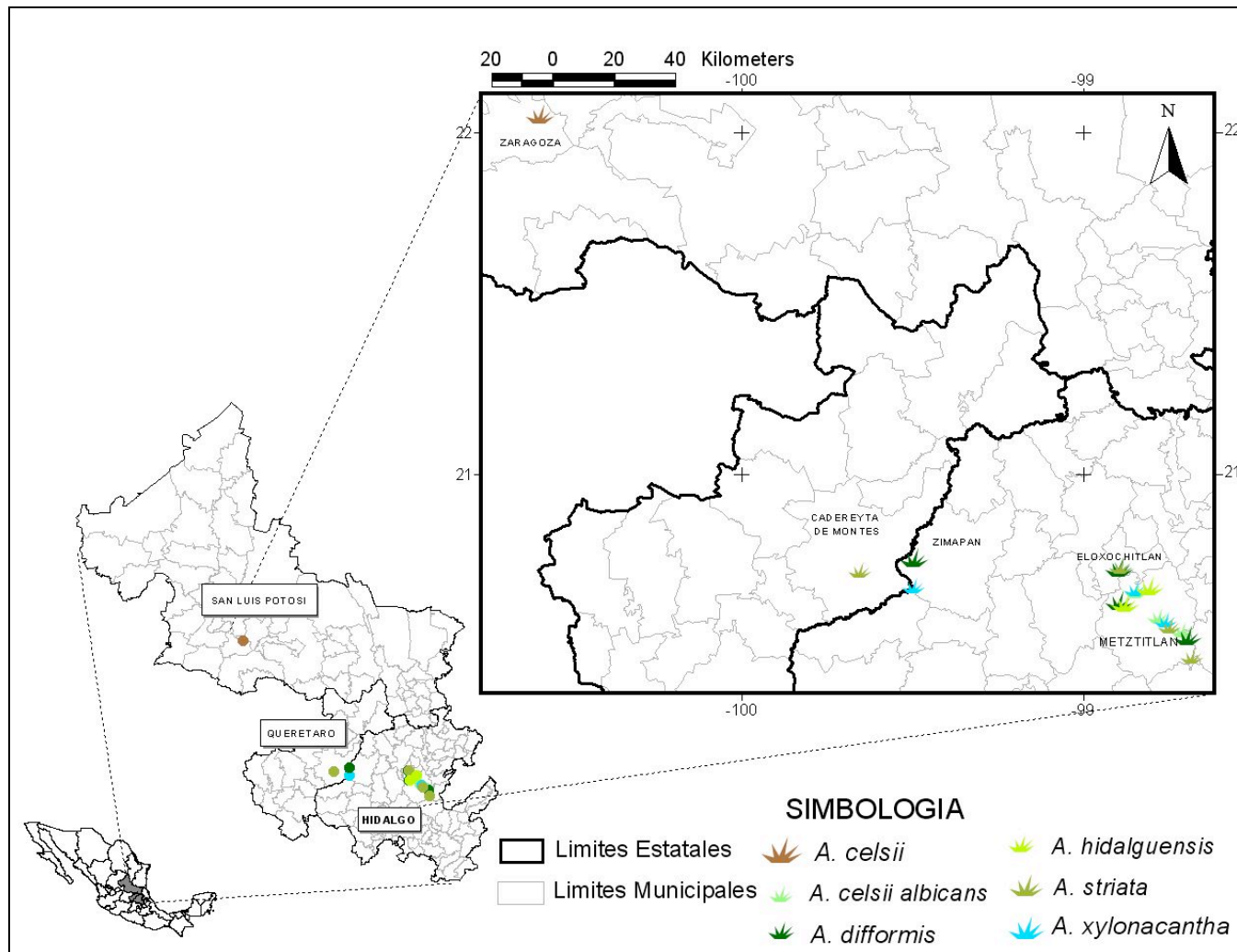


Figura 8. Localización de las poblaciones usadas para el análisis genético de este estudio

Tabla 4. Poblaciones de las cinco especies de *Agave* analizadas

<i>Nº de población</i>	<i>Especie</i>	<i>Nombre de la localidad</i>	<i>Georeferencia</i>
A1	<i>A. difformis</i>	Metztnoztla, Barranca de Metztlán, Hgo.	20°37.71' 98°53.49'
A2	<i>A. difformis</i>	El Durazno, Barranca de Metztlán, Hgo.	20°31.60' 98°41.5'
A3	<i>A. difformis</i>	Almolón, Barranca de Metztlán, Hgo.	20°43.48' 98°53.50'
A6	<i>A. difformis</i>	Presa Zimapán, Hgo.	20°40.3' 99°29.6'
B1	<i>A. hidalguensis</i>	San Pablo Metztnotla, Barranca de Metztlán, Hgo.	20°37.40' 98°52.51'
B2	<i>A. hidalguensis</i>	Tesisco, Barranca de Metztlán, Hgo.	20°40.29' 98°48.28'
D1	<i>A. xylonacantha</i>	Camino Almolón-Gilo, Barranca de Metztlán, Hgo.	20°43.66' 98°53.24'
D2	<i>A. xylonacantha</i>	El Potrero, 1km de la laguna, Barranca de Metztlán, Hgo.	20°39.80' 98°50.69'
D3	<i>A. xylonacantha</i>	El Salitre (“Cerro Podrido”), Barranca de Metztlán, Hgo.	20°34.33' 98°45.24'
D7	<i>A. xylonacantha</i>	Presa Zimapán, Hgo.	20°40.3' 99°29.6'
C1	<i>A. celsii albicans</i>	La Laguna, Barranca de Metztlán, Hgo.	20°39.43' 98°50.40'
C2	<i>A. celsii albicans</i>	Te Cruz Cozapa, Barranca de Metztlán, Hgo.	20°34.97' 98°46.50'
C3	<i>A. celsii albicans</i>	Camino Jihuico-El Carrizal, Barranca de Metztlán, Hgo.	20°32.64' 98°42.49'
C4	<i>A. celsii</i>	Km. 216 Carretera Río Verde-San Luis Potosí, SLP.	22°03.19' 100°35.21'
F1	<i>A. striata</i>	Camino Almolón-Gilo, Barranca de Metztlán, Hgo.	20°43.66' 98°53.24'
F2	<i>A. striata</i>	Carretera El Salitre-Jilotla, Barranca de Metztlán, Hgo.	20°33.31' 98°44.66'
F3	<i>A. striata</i>	Venados, Barranca de Metztlán, Hgo.	20°28.00' 98°40.75'
F5	<i>A. striata</i>	Camino a la Presa Zimapán, Qro.	20°43.1' 99°39.0'

4.2.2 Extracción de ADN y amplificación de ISSRs

Para extraer el ADN se utilizó el método de Doyle y Doyle (1987) modificado para agaves. El protocolo de extracción utilizado se muestra en el Apéndice 1.

Utilizando un biofotómetro (BioPhotometer, Eppendorf) se cuantificó la concentración de 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 alícuotas 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 para tener un respaldo.

Para la amplificación de los marcadores ISSRs se empleó el protocolo propuesto por Fang y Roose (1997). Se probaron 20 iniciadores procedentes de la serie No. 9 de la unidad de servicios de proteínas y ácidos nucleicos de la Universidad de Columbia Británica, Vancouver, B.C., Canadá. De éstos, se escogieron los tres en los que se observó una mejor definición de las bandas (loci) y que mostraron al menos 10 loci polimórficos cada uno: el # 846, el # 853 y el # 811, (manteniendo la nomenclatura usada por dicha universidad). Las condiciones para las reacciones de PCR y para los programas de amplificación se ajustaron para cada especie y para cada iniciador (Apéndice 1). La secuencia de los iniciadores seleccionados es: 846=CAC ACA CAC ACA CAC ART, 853=TCT CTC TCT CTC TCT CRT y 811=GAG AGA GAG AGA GAG AC (R es equivalente a A ó G).

Los productos de PCR se corrieron en electroforesis de geles de agarosa al 2% en buffer TBE 1X, los cuales fueron teñidos con bromuro de etidio a una concentración de 1.0 μg/ml. Para determinar el peso molecular aproximado de las bandas se empleó un marcador de peso molecular de 100 pares de bases (“Nucleic Acid Marker, 100 pb DNA Ladder”, Invitrogen).

Cada gel fue fotografiado utilizando la cámara digital Kodak EDAS 240 y las imágenes fueron digitalizadas usando el programa Kodak ID. Con este programa se obtuvieron los pesos aproximados de todas las bandas y éstos fueron almacenados en una matriz de datos, además se realizó una lectura visual de los geles para confirmar la homología de los tamaños de las bandas.

Con ésta información se construyó una matriz de datos para cada especie en donde en los renglones se pusieron los individuos y en las columnas los loci encontrados en la muestra total. En la matriz se colocó un número uno (1) para representar la presencia de la banda y un cero (0) para la ausencia, de manera que para cada individuo se obtuvo un patrón de ausencias/presencias que constituyó su genotipo.

Posteriormente, se construyó una matriz total donde se incluyeron todas las especies. En este caso se consideraron todos los loci encontrados para las cinco especies, cuando un locus estaba presente en alguna especie y no se encontraba en otra, se pusieron ceros en todos los individuos de la especie donde no se encontró dicho locus.

4.2.3 Análisis de datos

Las matrices de presencia/ausencia de bandas se modificaron de acuerdo al formato requerido por el software de análisis en varios tipos, siguiendo las indicaciones de los siguientes programas: *TFGA* (“Tools for Population Genetic Analyses”; (Miller, 1997), *Arlequin* (Schneider et al., 2000), *Popgene* (Yeh et al., 1999) y formato nexus (Maddison et al., 1997) para el programa *Hickory* (Holsinger y Lewis, 2003). Los análisis realizados se dividen en las siguientes categorías: 1) estadística descriptiva (diversidad genética dentro de las poblaciones); 2) estructura genética (diversidad genética entre las poblaciones); 3) medidas de distancia genética entre poblaciones y métodos de agrupamiento; 4) medidas de diferenciación genética entre poblaciones y flujo génico. A continuación se describen los análisis empleados (en el Apéndice 2 pueden encontrarse las ecuaciones (Ec.) que se emplean para cada análisis).

4.2.3.1 Diversidad genética dentro de las poblaciones

Para las medidas de estadística descriptiva se calculó:

a) El porcentaje de loci polimórficos (P). Se usó el criterio de 95%, debido a que cuando $n < 50$, el 99% no es conveniente, porque un alelo cuya frecuencia en la población sea menor que $1/2n$ no estará representado en la muestra colectada, incluso si el alelo tiene una frecuencia de 0.01 ó mayor (Nei, 1987).

b) Usando las frecuencias alélicas por conteo directo (Ec. 1), se calculó la heterocigosis esperada en Hardy-Weinberg (H_E) (Ec. 4), y la diversidad genética no sesgada de Nei (H_S) (Ec. 6). Éstos dos métodos (H_E y H_S) pueden ser equivalentes para loci polimórficos y bialélicos cuando los tamaños son iguales entre poblaciones. \bar{H}_S es el promedio de H_S para todas las poblaciones, mientras que \bar{H}_T es el valor de heterocigosis esperado para la especie.

c) Se calculó la heterocigosis esperada en la población (\bar{H}) (Ec. 11) usando la corrección para el cálculo de frecuencias alélicas en marcadores dominantes (Ec. 9) propuesta por Lynch y Milligan (1994), en donde sólo se analizaron las bandas cuya frecuencia observada es menor a $1-(3/N)$.

d) Se obtuvo el índice de diversidad de Shannon a nivel poblacional (H'_{pop}) (Ec. 22) y a nivel de especie (H'_{sp}) (Ec. 23). Este índice usa la presencia/ausencia de bandas como fenotipo y no asume que la población está en equilibrio de Hardy-Weinberg. La estimación de diversidad fenotípica equivale aproximadamente a la diversidad genética (Lewontin, 1972; Whitkus et al., 1998).

e) Se obtuvo además el estimador bayesiano de frecuencias alélicas para marcadores dominantes (\hat{H}), en el que H se calcula a partir de las frecuencias obtenidas usando la Ec. 20.

Para calcular a), b) y c) se empleó el programa *TFPGA*, para d) se empleó el programa *Popgene* y para e) se empleó el programa *Hickory*.

4.2.3.2 Diversidad genética entre poblaciones

Los análisis de estructuración son derivados básicamente de los estadísticos F de Wright, y en este trabajo se emplearon las siguientes variantes:

a) Como para los marcadores dominantes hay dos alelos por locus, se usó la G_{ST} (Nei, 1973) que equivale a la F_{ST} (Ec. 32). Este método supone que existe equilibrio de Hardy-Weinberg. El valor de G_{ST} se obtuvo con el programa *Popgene*.

b) El índice $F_{ST}(\theta)$ se calculó también con el método de Weir y Cockerham (1984), en el que también se asume que la población está en equilibrio ($F_{IS}=0$) (Ec. 39).

c) Se obtuvieron estimadores de la varianza de θ usando jackknife y bootstrap para generar los intervalos de confianza. Se usaron 5000 iteraciones y un nivel de confianza

del 95% (Weir, 1996). Tanto el cálculo de θ como los intervalos de confianza se obtuvieron con el programa *TTPGA*.

d) Se calculó la repartición de la variación entre poblaciones con el índice de Shannon, (Ec. 49) usando el programa *Popgene*.

e) Los componentes de la varianza se obtuvieron con un análisis de varianza molecular para los diferentes niveles jerárquicos (AMOVA), así como los estadísticos Φ análogos a los estadísticos F (Ec. 45). Las regiones se definieron de acuerdo a la localización geográfica. Para las cinco especies hubo dos regiones básicas (dentro y fuera de la Barranca de Metztitlán). Este análisis se hizo con el programa *Arlequin*.

f) Se calculó también el estimador bayesiano de G_{ST} (G_{ST}^B) con el programa *Hickory* usando la distribución de probabilidad posterior calculada a partir de la Ec. 44 mediante el uso de cadenas de Markov Monte Carlo.

g) Se calculó θ^B , que es el parámetro equivalente a F_{ST} según el método bayesiano propuesto por Holsinger (Holsinger, 1999; Holsinger et al., 2002; Holsinger y Wallace, 2004) (Ec. 42), con el programa *Hickory*.

4.2.3.3 Medidas de distancia genética entre poblaciones y prueba de Mantel

a) Se calculó la distancia genética no sesgada de Nei (1978) (Ec. 50 a la 57) para todos los pares de poblaciones de cada especie con el programa *TTPGA*.

b) Con los resultados del análisis de distancia se construyó un dendrograma usando el algoritmo de UPGMA (“Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”) para cada especie, después para el grupo Marginatae y finalmente para todas las poblaciones de las cinco especies.

c) Para probar la correlación entre la matriz de distancia genética y la distancia geográfica (en km) se realizó la prueba de Mantel (Sokal y Rohlf, 1995). Con el programa *TTPGA* se calcularon las matrices de distancias genéticas entre pares de poblaciones para todas las especies, mientras que las distancias geográficas se obtuvieron a partir de las coordenadas geográficas mediante el programa *Arcview* 3.2 y se generó una matriz de distancias geográficas y genéticas para cada especie.

4.2.3.4 Diferenciación genética entre poblaciones y flujo génico

a) Para estimar si las diferencias en las frecuencias alélica entre las poblaciones son significativas, se usó la prueba exacta (Raymond y Rousset, 1995); ésta se realizó con el programa *TFGA*. En esta prueba un valor de $p = 1$ representa una probabilidad de 100% de que las diferencias observadas se deban al azar; mientras que para aquellos loci con valores de p menores a 0.05, sí hay diferencias significativas en las frecuencias alélicas entre las poblaciones.

b) El nivel de flujo génico (Nm) se estimó a partir de valores de diversidad genética entre poblaciones, empleando los valores de θ como análogos a la F_{ST} , utilizando la Ec. 58.

c) Otra aproximación diferente para estimar el flujo génico entre las poblaciones es obteniendo la F_{ST} para cada par de poblaciones por especie (F_{ST} pareadas). Con el programa *Arlequin* se obtuvieron los estimadores de Φ_{ST} para pares de poblaciones y con éstos también se hizo un cálculo de Nm , con la información anterior se estimó el nivel de flujo génico entre pares de poblaciones.

4.3 Resultados

4.3.1 Amplificación de ISSRs

Para la muestra total que incluye a las 5 especies de *Agave*, se obtuvieron 65 loci con los tres iniciadores probados. El número de loci por iniciador y por especie se observa en la Tabla 5, el promedio de loci por especie fue de 50.2.

La especie con mayor número de loci (57) fue *A. xylonacantha* y la especie con menos loci (43) fue *A. hidalguensis*.

Al analizar los loci que se encuentran sólo en una de las cinco especies se encontró que *A. striata* presenta tres loci exclusivos y *A. celsii* uno. Ninguna especie del grupo Marginatae presenta loci exclusivos, pero si se analizan las tres especies juntas, el grupo presenta dos loci que no se encuentran ni en *A. striata* ni en *A. celsii*. Por otro lado, al comparar los loci que comparten todos los pares posibles de especies, se encuentra que las especies del grupo Marginatae comparten entre sí más del 80% de los loci (Tabla 6) y

tanto *A. striata* como *A. celsii* comparten menos del 70% de los loci con el resto de las especies.

Tabla 5. Número de loci para cada iniciador de ISSR y para las cinco especies de *Agave*

<i>Especie</i>	<i>INICIADOR</i> 846	<i>INICIADOR</i> 853	<i>INICIADOR</i> 811	<i>Total</i>
<i>A. difformis</i>	17	15	19	51
<i>A. hidalguensis</i>	16	15	12	43
<i>A. xylonacantha</i>	20	16	21	57
<i>A. celsii</i> y <i>A. c. albicans</i>	14	16	17	47
<i>A. striata</i>	22	14	17	53
Total para las cinco especies	26	17	22	65

Tabla 6. Loci compartidos entre las cinco especies de agave

	<i>A. difformis</i>	<i>A. hidalguensis</i>	<i>A. xylonacantha</i>	<i>A. celsii</i>	<i>A. striata</i>
<i>A. difformis</i>	*****	45/56	53/59	39/56	41/62
<i>A. hidalguensis</i>	80%	*****	46/56	35/56	37/60
<i>A. xylonacantha</i>	89%	82%	*****	42/61	45/64
<i>A. celsii</i>	69%	62%	68%	*****	40/61
<i>A. striata</i>	66%	61%	70%	65%	*****

Sobre la diagonal se encuentra el número de loci compartidos entre el total para el par de especies y bajo la diagonal el porcentaje de loci compartidos por par de especies.

4.3.2 Diversidad genética dentro de las poblaciones

En la Tabla 7 se encuentran los resultados obtenidos con diferentes métodos para estimar la diversidad genética dentro de las poblaciones para cada especie. No fue posible obtener el resultado de la amplificación por PCR para los tres iniciadores en los 40 individuos por población ensayados, de manera que se eliminaron aquellos individuos para los que sólo amplificó un iniciador y se mantuvieron los individuos para los que se amplificaron dos (en promedio 3.8 individuos por población) o tres iniciadores (en promedio 35.3 individuos por población). Para todas las poblaciones hay más de 36 individuos, lo que hace que no haya diferencias significativas en los tamaños de muestra

($F=1.53$, $p=0.249$). Los resultados obtenidos de H_E y H_S fueron iguales en todos los casos, por lo que sólo se reporta la H_S .

Los valores de H_S y de \bar{H} son muy similares entre sí y para la comparación se analizarán con cuidado los valores de \bar{H} (calculados según la corrección de Lynch y Milligan, 1994). Para las tres especies del grupo Marginatae (*A. difformis*, *A. hidalguensis* y *A. xylonacantha*) no hay diferencias significativas en los niveles de variación genética al comparar los niveles de \bar{H} ($F=2.168$, $p=0.185$) y lo mismo ocurre cuando se comparan los valores obtenidos con el índice de diversidad de Shannon ($F=2.29$, $p=0.171$). *A. hidalguensis* presenta un mayor porcentaje de loci polimórficos aunque en total presenta menos loci (Tabla 5). Para todas las especies el índice de diversidad de Shannon es más alto que el de \bar{H} ($F=79.79$, $p<0.0001$).

Tabla 7. Estimadores de diversidad genética para las cinco especies de agaves

<i>Especie</i>	<i>Población</i>	<i>N</i>	<i>P</i>	H_S	\bar{H}	H'_j
<i>A. difformis</i>	A1	40	62%	0.183	0.181	0.295
	A2	40	62%	0.226	0.223	0.348
	A3	38	64%	0.211	0.208	0.329
	A6	40	62%	0.198	0.195	0.314
				$\bar{H}_S=0.205$	$\bar{H}_S=0.202$	$H'_{pop}=0.321$
Total	158	$\bar{X}=62.7\%$	$H_T=0.226$	$H_T=0.225$	$H'_{sp}=0.358$	
<i>A. hidalguensis</i>	B1	38	62%	0.209	0.206	0.331
	B2	40	81%	0.263	0.260	0.404
				$\bar{H}_S=0.236$	$\bar{H}_S=0.205$	$H'_{pop}=0.367$
	Total	78	$\bar{X}=76.7\%$	$H_T=0.250$	$H_T=0.248$	$H'_{sp}=0.388$
<i>A. xylonacantha</i>	D1	39	68%	0.198	0.196	0.322
	D2	39	65%	0.198	0.196	0.319
	D3	39	70%	0.218	0.216	0.345
	D7	38	60%	0.190	0.187	0.303
				$\bar{H}_S=0.201$	$\bar{H}_S=0.199$	$H'_{pop}=0.322$
Total	155	$\bar{X}=75.4\%$	$H_T=0.212$	$H_T=0.211$	$H'_{sp}=0.346$	
<i>A. celsii</i> y <i>A. c. albicans</i>	C1	38	76.6%	0.241	0.237	0.371
C2	40	78.7%	0.250	0.247	0.383	
C3	38	78.7%	0.267	0.264	0.408	
C4	40	70.2%	0.248	0.244	0.274	
			$\bar{H}_S=0.251$	$\bar{H}_S=0.247$	$H'_{pop}=0.359$	
Total	156	$\bar{X}=89.4\%$	$H_T=0.279$	$H_T=0.278$	$H'_{sp}=0.435$	
<i>A. striata</i>	F1	36	74.4%	0.281	0.277	0.405
	F2	37	69.8%	0.247	0.243	0.357
	F3	37	62.8%	0.214	0.211	0.319
	F5	40	65.11%	0.232	0.229	0.346
				$\bar{H}_S=0.243$	$\bar{H}_S=0.237$	$H'_{pop}=0.357$
Total	150	$\bar{X}=76.7\%$	$H_T=0.264$	$H_T=0.263$	$H'_{sp}=0.396$	

H_S = Heterocigosis no sesgada de Nei (Ec. 6)

\bar{H} = Heterocigosis calculada con la corrección de Lynch y Milligan (Ec. 11)

\bar{H}_S = Heterocigosis promedio de todas las poblaciones de la especie

H_T = Heterocigosis total para la especie

H'_j = Índice de diversidad de Shannon para cada población (Ec. 21)

H'_{pop} = Índice de diversidad de Shannon para todas las poblaciones de la especie (Ec. 22)

H'_{sp} = Índice de diversidad de Shannon para toda la especie (Ec. 23)

Agave celsii presenta un mayor número de loci polimórficos que el resto de las especies, mientras que *A. striata* presenta un porcentaje similar a las especies del grupo Marginatae. Los niveles de diversidad son más altos en *A. celsii* y *A. striata* que en las especies del grupo Marginatae (comparación múltiple de Tukey $p < 0.01$) y entre éstas dos especies no hay diferencias significativas en los niveles de variación ($t=0.28$, $p=0.615$).

4.3.3 Diversidad genética entre poblaciones

Los estimadores tradicionales de diferenciación genética para las cinco especies estudiadas se pueden observar en la Tabla 8 (los estimadores bayesianos se tratarán con mayor detalle más adelante). Para *A. hidalguensis* no se realizó el análisis de varianza molecular (AMOVA) porque sólo se colectaron dos poblaciones y no fue posible hacer una agrupación. Se puede observar en general que los niveles de diferenciación genética son bajos en las cinco especies y la mayoría de los valores obtenidos con todos los estimadores, caen dentro del intervalo de confianza obtenido para la θ . Resulta interesante resaltar que en *A. hidalguensis* y en *A. xylonacantha*, los valores obtenidos con todos los estimadores son muy similares entre sí y además el intervalo de confianza para θ es menor que para el resto de las especies, lo que puede significar que estas dos especies están más cercanas al equilibrio de Hardy-Weinberg pues los estimadores no se ven afectados por esa suposición. Por otro lado, en *A. difformis*, *A. celsii* y *A. striata*, los intervalos de confianza son mayores, así como las diferencias entre estimadores.

Tabla 8. Estimadores de estructuración genética para las cinco especies de agaves

<i>Especie</i>	<i>N</i>	G_{ST}	θ	Φ_{ST}	H'
<i>A. difformis</i>	158	0.088	0.113 (0.070-0.159)	0.109	0.103
<i>A. hidalguensis</i>	78	0.040	0.064 (0.034-0.097)	*	0.054
<i>A. xylonacantha</i>	155	0.056	0.059 (0.036-0.086)	0.053	0.069
<i>A. celsii</i>	156	0.112	0.130 (0.092-0.172)	0.187	0.175
<i>A. striata</i>	150	0.087	0.103 (0.056-0.168)	0.142	0.098

*No se calculó en este caso porque sólo se colectaron dos poblaciones y no se pudo hacer la agrupación

Al igual que en los niveles de variación dentro de las poblaciones, dentro del grupo Marginatae los niveles de estructuración de la variación son similares para las tres especies. La menor diferenciación se encuentra en *A. hidalguensis* y *A. xylonacantha* (con valores muy similares para las dos especies) y la mayor en *A. difformis*. Para estas dos últimas especies la ubicación de las poblaciones fuera de la barranca de Metztlán (en la presa Zimapán) es la misma, pero las poblaciones de *A. difformis* se encuentran más diferenciadas. *A. hidalguensis* presenta un valor intermedio y para este caso las únicas dos poblaciones analizadas se encuentran dentro de la barranca de Metztlán.

Por otro lado, los valores de diferenciación de *A. striata* son similares a los de *A. difformis*, mientras que para *A. celsii* y *A. c. albicans* son mayores que en el resto de las especies, lo cual puede deberse a mayor diferenciación taxonómica (al comprar dos subespecies diferentes) o a que la distancia geográfica entre la población de *A. celsii* es mayor (ver más adelante).

Si examinamos los valores de diferenciación genética sólo para las poblaciones dentro de la barranca de Metztlán, eliminamos el componente de la distancia geográfica y obtenemos los patrones de diferenciación genética en poblaciones que se encuentran a distancias geográficas similares. Estos valores se observan en la Tabla 9.

Tabla 9. Estimadores de estructuración genética para las cinco especies de agaves dentro de la barranca de Metztlán

<i>Especie</i>	<i>N</i>	<i>G_{ST}</i>	θ	Φ_{ST}	<i>H'</i>
<i>A. difformis</i>	118	0.054	0.064 (0.040-0.088)	0.108	0.061
<i>A. hidalguensis</i>	78	0.040	0.064 (0.034-0.097)	---	0.054
<i>A. xylonacantha</i>	117	0.031	-0.007 (-0.363-0.011)	0.043	0.038
<i>A. c. albicans</i>	116	0.062	0.077 (0.045-0.112)	0.129	0.076
<i>A. striata</i>	110	0.070	0.085 (0.054-0.116)	0.138	0.077

Dentro de la Barranca de Metztlán los niveles de diferenciación genética en *A. difformis* y en *A. xylonacantha* disminuyen notablemente, en ésta última la variación dentro de una de las poblaciones es mayor a la total (Tabla 7) por lo que θ da un valor negativo, por otro lado el resto de los estimadores producen un valor menor a lo

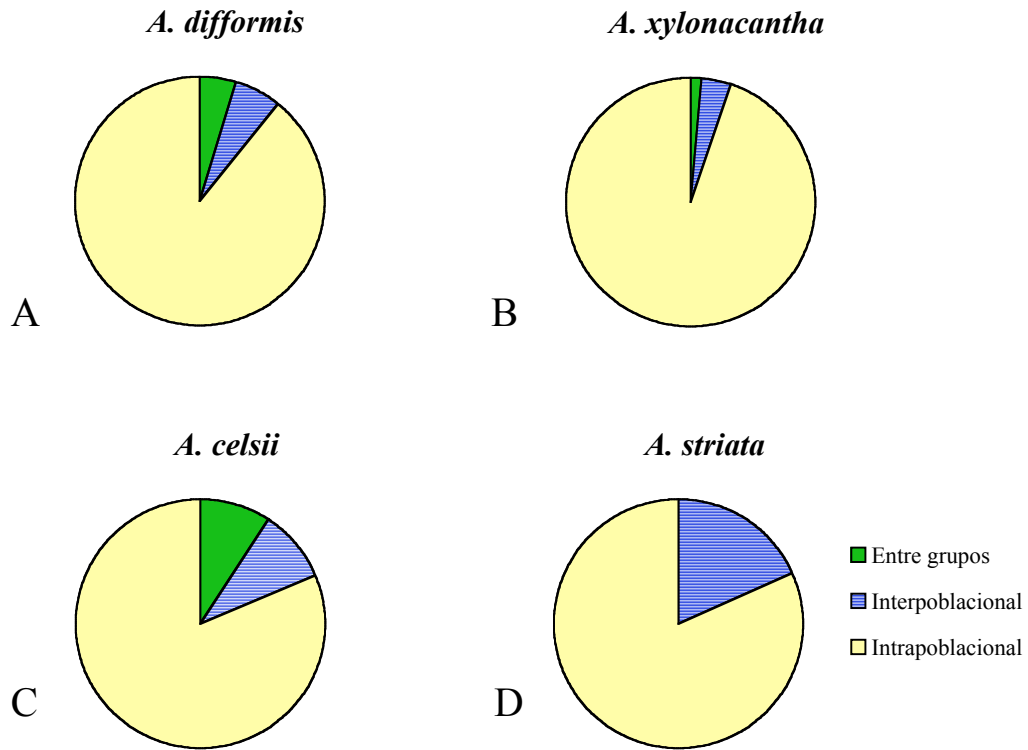
observado en la Tabla 8 y también menor al encontrado en las dos poblaciones de *A. hidalguensis*, que parecen estar más diferenciadas entre sí que las tres de *A. xylonacantha*, pero menos que las tres de *A. difformis*. La subespecie *A. c. albicans* presenta niveles de diferenciación muy similares a los encontrados en las demás especies, a diferencia de lo que ocurre cuando se incluye la población externa de *A. celsii* en donde la diferenciación es mayor. Finalmente, los valores en *A. striata* también disminuyen y resultan muy similares a los obtenidos en *A. c. albicans*.

Para realizar el análisis de varianza molecular se hicieron agrupaciones de las poblaciones de acuerdo a su posición geográfica (ver mapa de la Fig. 8), y serán descritas por separado para cada especie.

Para *A. difformis* se formaron tres grupos: 1) la población externa A6, localizada en la Presa Zimapán, Hidalgo, 2) la población A2 ubicada al sur de la barranca y 3) las poblaciones A1 y A3 que se encuentran al norte de la barranca. El porcentaje de variación encontrado dentro de las poblaciones fue de 89.17%, el que existe entre las poblaciones de un grupo fue del 6.02% y entre grupos de 4.81%, lo que indica que la mayor parte de la variación se encuentra dentro de la barranca de Metztitlán (el 95.17%). El patrón puede observarse en la figura 9A.

Los grupos formados para *A. xylonacantha* fueron nuevamente 1) la población externa ubicada en la Presa Zimapán, 2) norte de Metztitlán, que incluye las poblaciones D1 y D2 y 3) sur de Metztitlán (población D3). Los porcentajes de variación fueron 90.3% dentro de las poblaciones, 4.05% entre las poblaciones dentro de los grupos y 5.65% entre grupos (figura 9B). En esta especie, como en *A. difformis*, la mayor parte de la variación se puede encontrar dentro de las poblaciones y grupos de la Barranca de Metztitlán (el 94% en total), lo que concuerda con la poca diferenciación encontrada con los estimadores de estructura genética.

Figura 9. Repartición de la variación genética según el análisis de varianza molecular (AMOVA)



Representación gráfica de la manera como se distribuye la variación genética en las cuatro especies en las que se realizó el análisis de varianza molecular. La variación está repartida dentro de las poblaciones ■, entre las poblaciones dentro de los grupos ■ y entre grupos ■.

Para *A. celsii* los grupos fueron 1) la población externa de *A. celsii*, 2) las poblaciones de *A. c. albicans* al norte de Metztlán (C1 y C2) y 3) la población de *A. c. albicans* (C3) al sur de Metztlán. Los porcentajes de variación fueron 81.3% dentro de las poblaciones, 9.53% entre las poblaciones dentro de los grupos y 9.20% entre grupos. Esto implica nuevamente que la mayor parte de la variación se encuentra dentro de la barranca (90%); en este caso es notorio que el aporte de la variación dentro del grupo norte de la Barranca es similar al de la población externa que no pertenece a la misma subespecie. En esta especie fue donde se encontró un mayor porcentaje de la variación entre los grupos (figura 9C).

Finalmente, los grupos para *A. striata* fueron 1) la población externa (F5), 2) sur de Metztlán (F2 y F3) y 3) norte de Metztlán (F1). Los porcentajes de variación fueron

87.5% dentro de las poblaciones, 24.3% entre las poblaciones dentro de los grupos y la aportación del grupo externo dio un resultado negativo de -11.9%, lo que indica que la Barranca de Metztitlán contiene toda la variación encontrada en esta especie en las poblaciones muestreadas. En esta especie se encontró el porcentaje más alto de variación explicado por el componente interpoblacional.

Para obtener los estimadores de estructura genética con la aproximación bayesiana, fue necesario primero seleccionar el modelo estadístico apropiado que mejor explicara los índices obtenidos por especie. Para hacer la selección del modelo, para cada especie se corrieron: a) el modelo completo (“full model”) que no tiene suposiciones, b) el modelo que asume que no hay diferencias en las poblaciones ($\theta=0$), c) el modelo que asume que la población está en equilibrio ($f=0$) y por último d) el modelo que relaja todas las suposiciones ($f=$ “free”). Para decidir entre los diferentes modelos se usó el criterio de información de desviación (Deviance Information Criterion o DIC) (Spiegelhalter et al., 2002), los valores obtenidos se muestran en el apéndice 3. De los valores mostrados en el apéndice, \bar{D} es una medida del ajuste del modelo a los datos (el ajuste es mejor mientras menor sea el valor de \bar{D}), pD es el número aproximado de parámetros que se están probando, o bien un índice de la complejidad del modelo. \hat{D} es una medida de la verosimilitud de la distribución posterior y se emplea en el cálculo de pD . El modelo que se selecciona, es aquel que minimiza la suma de $\bar{D} + pD$, es decir, con el valor menor de DIC (de preferencia la diferencia entre un modelo y otro debe ser de 5 ó 6 unidades como mínimo) (Holsinger y Wallace, 2004).

Al analizar los valores de los estadísticos DIC para las cinco especies, se seleccionó en todas el modelo en equilibrio ($f=0$). Aunque para el caso de *A. xylonacantha*, *A. striata* y *A. celsii*, la diferencia de este modelo con respecto de los otros fue mínima.

Una vez seleccionado el modelo para cada especie, en la Tabla 15 se encuentran los valores de diversidad y estructura obtenidos con el análisis bayesiano.

En general los niveles de variación a nivel poblacional y por especie son mayores que los estimados con los métodos tradicionales y resultan similares a los obtenidos con el índice de diversidad de Shannon (ver Tabla 7). Mientras que los índices de estructura, tanto θ^B como G_{ST}^B son un orden de magnitud menores a los de los índices tradicionales.

Tabla 10. Estimadores de diversidad y de estructura genética para las cinco especies obtenidos con la aproximación bayesiana

<i>Especie</i>	<i>Modelo</i>	<i>H</i>	θ^B	G_{ST}^B
<i>A. difformis</i>	$f=0$	$H_S=0.3075$ $H_T=0.3086$	0.0054(± 0.0017)	0.0035
<i>A. hidalguensis</i>	$f=0$	$H_S=0.3213$ $H_T=0.3243$	0.0044(± 0.0028)	0.0034
<i>A. xylonacantha</i>	$f=0$	$H_S=0.2624$ $H_T=0.2632$	0.0046(± 0.0014)	0.0030
<i>A. celsii</i>	$f=0$	$H_S=0.3436$ $H_T=0.3447$	0.0049(± 0.0016)	0.0031
<i>A. striata</i>	$f=0$	$H_S=0.3206$ $H_T=0.3220$	0.0111(± 0.0033)	0.0073

Al comparar los niveles de variación obtenidos con este método se observa que existen diferencias significativas en los niveles de variación entre especies ($F=51.03$, $p<0.0001$), *A. xylonacantha* presenta la menor variación y *A. celsii* la mayor variación (comparación múltiple de Tukey $p<0.01$). Para las tres especies restantes (*A. difformis*, *A. hidalguensis* y *A. striata*) los niveles de variación son muy similares y no hay diferencias significativas entre las tres, aunque si comparamos las especies por pares *A. striata* es más variable que *A. difformis* ($t=10.49$, $p<0.0001$).

Para los niveles de estructura con la estimación bayesiana, los valores son muy similares entre G_{ST}^B y θ^B . Nuevamente los valores encontrados en las especies del grupo Marginatae son muy similares entre sí, aunque en este caso los niveles de diferenciación en *A. celsii* son también muy parecidos a los de este grupo. Solamente *A. striata* presenta niveles mayores de G_{ST}^B y θ^B .

4.3.4 Distancia genética entre poblaciones y prueba de Mantel

Con el programa *TFPGA* se calcularon las matrices de distancia genética entre pares de poblaciones para todas las especies. Por otro lado, las distancias geográficas se obtuvieron a partir de las coordenadas geográficas mediante el programa *Arctview 3.2* y se generó una matriz de distancias geográficas y genéticas para cada especie.

En la Tabla 11 se observan las distancias genéticas (Nei, 1978, debajo de la diagonal) y las distancias geográficas (km, arriba de la diagonal) para *A. difformis*. La

mayor distancia genética ocurre entre las poblaciones A1 y A6 y la menor entre las poblaciones A2 y A3, lo que coincide con la mayor y menor distancia geográfica respectivamente.

Tabla 11. Distancias genéticas (Nei, 1978) y geográficas (km) para las poblaciones de *A. difformis*

<i>Población</i>	<i>A1</i>	<i>A2</i>	<i>A3</i>	<i>A6</i>
<i>A1</i>	*****	23.58	10.60	63.93
<i>A2</i>	0.0233	*****	30.12	86.86
<i>A3</i>	0.0125	0.0209	*****	62.47
<i>A6</i>	0.0615	0.0277	0.0541	*****

Para *A. hidalguensis* la distancia genética entre las dos poblaciones es de 0.0208 y la distancia geográfica de 9.04 km.

En la Tabla 12 se observan las distancias en *A. xylonacantha*. La mayor distancia genética ocurre entre las poblaciones D3 y D7, que en este caso también coincide con la mayor distancia geográfica. En general, se observa que la población D7 (que es la más lejana geográficamente) se encuentra a distancias genéticas mayores con el resto de las poblaciones.

Tabla 12. Distancias genéticas (Nei, 1978) y geográficas (km) para las poblaciones de *A. xylonacantha*

<i>Población</i>	<i>D1</i>	<i>D2</i>	<i>D3</i>	<i>D7</i>
<i>D1</i>	*****	8.357	22.028	63.167
<i>D2</i>	0.0060	*****	13.77	67.29
<i>D3</i>	0.0112	0.0087	*****	77.51
<i>D7</i>	0.0207	0.0240	0.0268	*****

Las distancias genéticas y geográficas calculadas para *A. celsii* se encuentran en la Tabla 13. Ambas distancias son menores entre las poblaciones C1, C2 y C3, que corresponden a *A. c. albicans*. Por otro lado, la población C4 (que además de ser la más lejana geográficamente, no pertenece a la misma subespecie) se encuentra a distancias genéticas significativamente mayores con el resto de las poblaciones.

Tabla 13. Distancias genéticas (Nei, 1978) y geográficas (km) para las poblaciones de *A. celsii*

<i>Población</i>	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	<i>C4</i>
<i>C1</i>	*****	10.62	18.51	237.03
<i>C2</i>	0.0228	*****	8.15	247.50
<i>C3</i>	0.0249	0.0374	*****	255.54
<i>C4</i>	0.0737	0.0891	0.0569	*****

En la Tabla 14 se encuentran las distancias genéticas y geográficas obtenidas en *A. striata*. La mayor distancia genética ocurre entre las poblaciones F2 y F5. En este caso la población más lejana geográficamente es la F5, aunque los valores de distancia genética entre esta población y las otras son en general los más altos, entre la población F3 y el resto de las poblaciones la distancia genética también es alta (comparable a la de la F5).

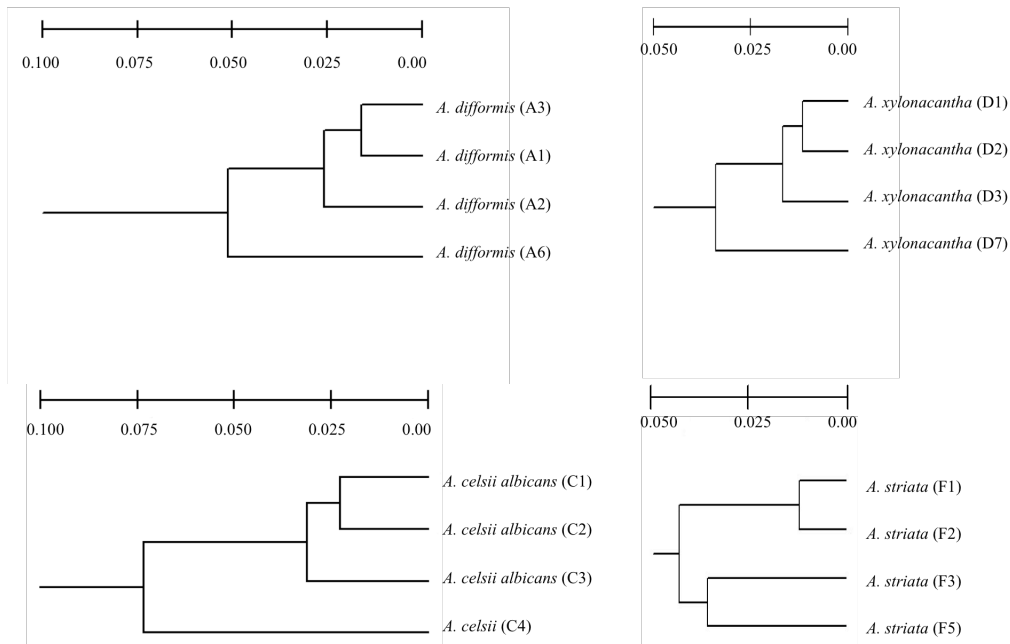
Tabla 14. Distancias genéticas (Nei, 1978) y geográficas (km) para las poblaciones de *A. striata*

<i>Población</i>	<i>F1</i>	<i>F2</i>	<i>F3</i>	<i>F5</i>
<i>F1</i>	*****	24.12	35.98	79.11
<i>F2</i>	0.0122	*****	11.87	95.70
<i>F3</i>	0.0369	0.0409	*****	104.53
<i>F5</i>	0.0442	0.0512	0.0359	*****

Usando las mismas distancias genéticas registradas en las tablas anteriores, se construyeron los dendrogramas de relaciones de parentesco con el método UPGMA para todas la especies por separado (menos para *A. hidalguensis*), Fig. 10. En los dendrogramas se puede observar que para *A. difformis*, *A. xylonacantha* y *A. celsii*, las poblaciones muestreadas dentro de la Barranca de Metztitlán se agrupan juntas (numeradas de la 1 a la 3 en todas las especies), aunque este patrón no se cumple en *A. striata*, donde una de las poblaciones de la barranca (F3) se agrupa con la población externa.

En lo que se refiere a los niveles de distancia genética entre poblaciones, éstos son similares para *A. xylonacantha* y *A. striata* donde la distancia con la población externa no es tan grande. Para *A. difformis* la distancia genética entre las poblaciones de la barranca es similar a las dos especies anteriores, pero la población externa está más lejana genéticamente (las poblaciones A6 y D7 se localizan en el mismo punto geográfico y destaca la mayor distancia genética en *A. difformis*). Finalmente, la mayor distancia genética entre poblaciones se encuentra entre la población externa de *A. celsii* con respecto a las poblaciones de la barranca de la subespecie *A. c. albicans*.

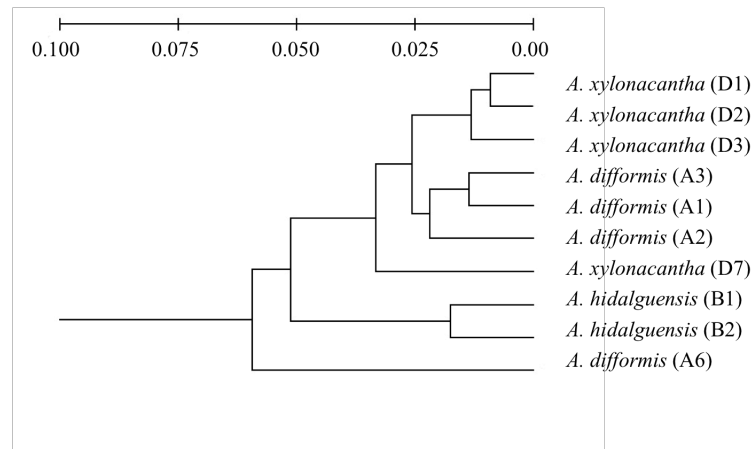
Figura 10. Dendrogramas de distancia genética para cuatro especies analizadas individualmente



Al analizar juntas las poblaciones del grupo Marginatae, podemos observar que la distancia genética es muy cercana entre las tres especies, lo que demuestra su cercanía filogenética (Fig. 11). Cabe destacar que las poblaciones de *A. xylonacantha* y de *A. difformis* dentro de la Barranca de Metztlán son más similares entre sí que con las poblaciones de estas mismas especies que se encuentran fuera de la barranca y forman un

grupo separado de *A. hidalguensis*. La población A6 de *A. difformis* es la más lejana al resto de las especies del grupo (incluyendo las poblaciones de *A. hidalguensis*).

Figura 11. Dendrograma de distancias genéticas para las especies del grupo Marginatae



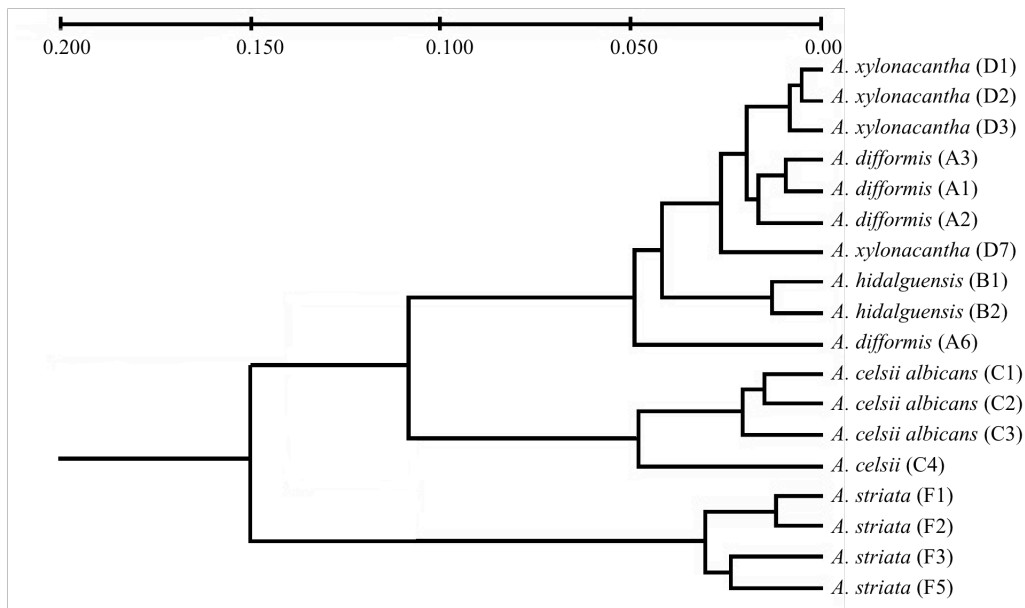
Se realizó también el análisis de distancia genética y el UPGMA agrupando a todas las poblaciones de las cinco especies. La matriz de distancia entre las especies (si se analizan juntas a las poblaciones de cada especie) se observa en la tabla 15. Nuevamente la distancia genética es menor para las especies del grupo Marginatae entre sí, siendo la menor distancia la encontrada entre *A. difformis* y *A. xylonacantha* ($D=0.0138$). Por otro lado, las distancias mayores existen entre *A. celsii* y *A. striata* con el resto de las especies, siendo la mayor distancia la que existe entre *A. celsii* y *A. difformis* ($D=0.1405$), seguida por la distancia que hay entre *A. striata* y *A. difformis* ($D=0.1150$).

Tabla 15. Distancia genética para las cinco especies de agaves

	<i>A. difformis</i>	<i>A. hidalguensis</i>	<i>A. xylonacantha</i>	<i>A. celsii</i>	<i>A. striata</i>
<i>A. difformis</i>	*****				
<i>A. hidalguensis</i>	0.0362	*****			
<i>A. xylonacantha</i>	0.0138	0.0276	*****		
<i>A. celsii</i>	0.1405	0.0907	0.1114	*****	
<i>A. striata</i>	0.1150	0.0901	0.0870	0.0778	*****

En la figura 12 se observa el dendrograma de distancia para las cinco especies juntas. En la figura resalta la consistencia del grupo Marginatae como una entidad separada de las demás especies. *A. celsii* forma otro grupo, donde se observa que la distancia genética entre *A. celsii* y *A. c. albicans*, es comparable a la que existe entre especies diferentes del grupo Marginatae. Finalmente el árbol muestra que la distancia entre *A. striata* es mucho mayor que la que existe entre todas las demás especies (incluida *A. celsii*).

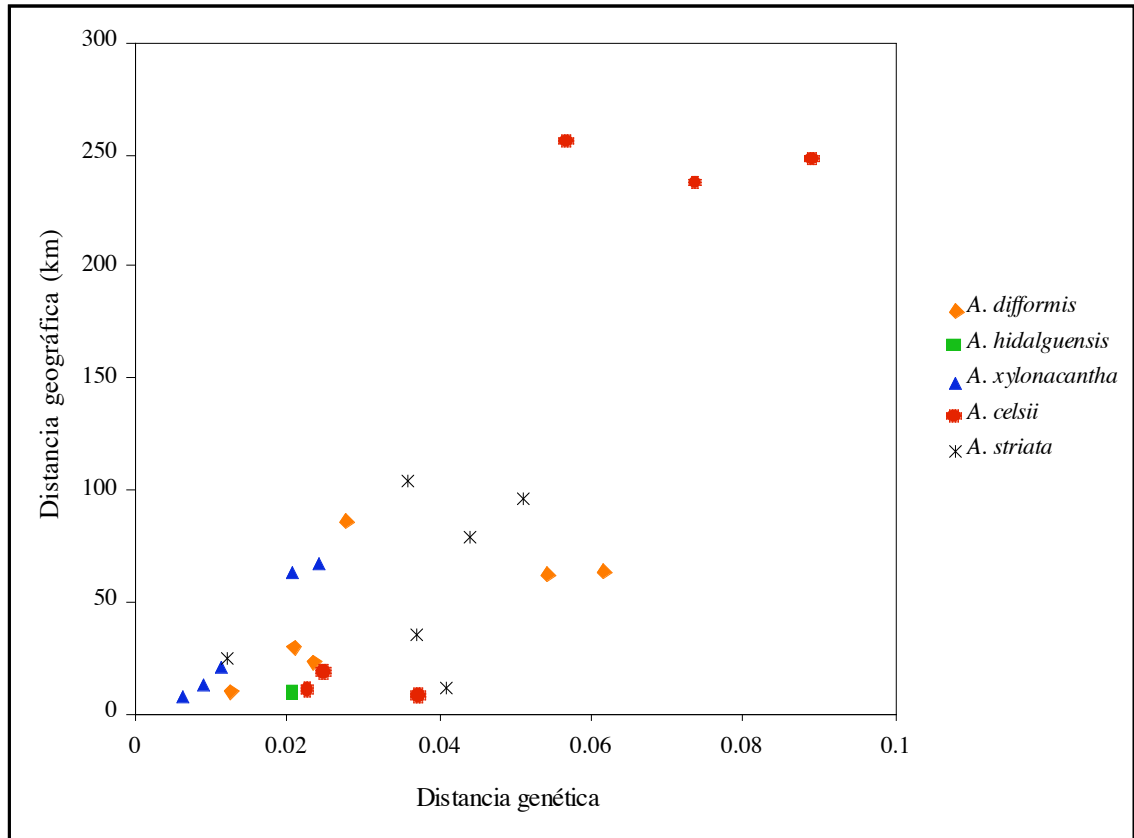
Figura 12. Dendrograma de distancia genética para las cinco especies de *Agave*



Al hacer el análisis de aislamiento por distancia con la prueba de Mantel, tanto en *A. xylonacantha* ($r = 0.9946$, $p = 0.07$) como *A. celsii* ($r = 0.896$, $p = 0.164$) se encontró que hay una correlación positiva entre las dos matrices aunque esta relación no es significativa, mientras que en *A. difformis* ($r = -0.228$, $p = 0.565$) y *A. striata* ($r = 0.494$, $p = 0.163$) no hay asociación entre las matrices.

La relación entre las distancias genéticas y geográficas para las cinco especies puede verse de manera gráfica en la Fig. 13.

Figura 13. Prueba de aislamiento por distancia para las cinco especies



4.3.5 Diferenciación genética entre poblaciones y flujo génico

El flujo génico por especie fue calculado a partir de los intervalos de confianza para θ . Para *A. difformis* Nm va de 1.41 a 3.32, para *A. hidalguensis* de $Nm=2.32$ a $Nm=7.1$, para *A. xylonacantha* de $Nm=2.65$ a $Nm=6.69$, para *A. celsii* de $Nm=1.2$ a $Nm=2.4$ y para *A. striata* de $Nm=1.2$ a $Nm=4.2$.

Alternativamente a los análisis anteriores, se hizo también la comparación de los valores de F_{ST} pareadas para todas las especies (a partir de los valores de Φ_{ST} obtenidos con el programa *Arlequin*).

En *A. difformis* (Tabla 16) se observa que los valores de diferenciación menores se encuentran entre las tres poblaciones de la barranca de Metztlán, donde los niveles de Nm van de 2.29 a 3.76 indicando que el flujo génico es alto entre ellas. Los valores de Nm de la población externa contra las internas van de 1.81 a 2.29.

Tabla 16. F_{ST} y Nm pareadas para las poblaciones de *A. difformis*

<i>Población</i>	<i>A1</i>	<i>A2</i>	<i>A3</i>	<i>A6</i>
<i>A1</i>	*****	2.87	3.76	1.55
<i>A2</i>	0.07990	*****	2.29	1.81
<i>A3</i>	0.06230	0.09825	*****	1.67
<i>A6</i>	0.13824	0.12091	0.13015	*****

En *A. xylonacantha* (Tabla 17) los niveles de diferenciación son bajos, lo que refleja un alto flujo génico incluso con la población externa (en ésta Nm va de 2.48 a 3.96), mientras que entre las poblaciones de la barranca Nm va de 14.49 hasta 49.65.

Tabla 17. F_{ST} y Nm pareadas para las poblaciones de *A. xylonacantha*

<i>Población</i>	<i>D1</i>	<i>D2</i>	<i>D3</i>	<i>D7</i>
<i>D1</i>	*****	14.49	49.65	2.48
<i>D2</i>	0.01695	*****	26.12	2.57
<i>D3</i>	0.00501	0.00948	*****	3.96
<i>D7</i>	0.09150	0.08848	0.05938	*****

Para el caso de *A. celsii* (Tabla 18) los niveles de diferenciación son moderados dentro de la barranca (subespecie *A. c. albicans*) y por lo tanto los niveles de flujo génico también los son (Nm de 1.33 a 2.37). Por otro lado, el flujo génico entre la población externa y las poblaciones de *A. c. albicans* es menor a uno (Nm de 0.69 a 0.94)

Tabla 18. F_{ST} y Nm pareadas para las poblaciones de *A. celsii*

<i>Población</i>	<i>C1</i>	<i>C2</i>	<i>C3</i>	<i>C4</i>
<i>C1</i>	*****	2.21	2.37	0.92
<i>C2</i>	0.10126	*****	1.33	0.69
<i>C3</i>	0.09541	0.15760	*****	0.94
<i>C4</i>	0.21212	0.26403	0.20917	*****

Agave striata por otra parte (Tabla 19), presenta niveles altos de flujo génico sólo entre las poblaciones F1 y F2 ($Nm=3.64$), aunque resalta el hecho de que el Nm es mayor a uno entre la población 3 dentro de la barranca y la población 5 que es externa.

Tabla 19. F_{ST} y Nm pareadas para las poblaciones de *A. striata*

Población	F1	F2	F3	F5
F1	*****	3.64	0.96	1.16
F2	0.06420	*****	0.88	0.907
F3	0.20622	0.17657	*****	1.89
F5	0.21943	0.21607	0.11652	*****

4.4 Discusión

4.4.1 Niveles de diversidad genética dentro de las poblaciones

Los niveles de diversidad genética encontrados en especies de plantas dependen de diversos atributos ecológicos que son específicos para cada especie, tales como el ciclo de vida, la distribución geográfica o el modo de reproducción, entre muchos otros (Gaudeul et al., 2000). Al revisar los datos acumulados de análisis de diversidad genética con isoenzimas, Hamrick y colaboradores (1991) encontraron que las especies ampliamente distribuidas, de ciclos de vida largos, polinizadas por viento y que se entrecruzan, presentan mayor diversidad genética que aquellas con los atributos contrastantes (de distribución local, anuales y que se auto-polinizan).

Las revisiones que se han hecho para estimaciones de diversidad realizadas con marcadores dominantes han demostrado que también hay una fuerte correlación con el ciclo de vida de la planta. De acuerdo con Bartish (1999), el sistema reproductivo es crucial para explicar los niveles de variación. También con marcadores dominantes se ha observado que existe una diferencia significativa de los niveles de diversidad genética según distintas historias de vida, sistemas reproductivos y estatus sucesional (Nybom, 2004); según esta autora los niveles menores de variación dentro de las poblaciones se encuentran en especies anuales que se auto-polinizan y en las que son sucesionales tempranas.

En el presente trabajo se encontró que las dos especies con valores más altos de diversidad fueron *A. celsii* y *A. striata*. Estas especies son las de menor tamaño y esto presumiblemente también afecta la duración de su ciclo de vida, ya que presentan un ciclo reproductivo más corto que el resto de las especies estudiadas (Rocha et al., 2005). Por otro lado las especies del grupo Marginatae se apegan más a los valores encontrados en plantas longevas perennes.

De acuerdo a Hamrick y Godt (1989) también hay una fuerte asociación entre el rango geográfico y la diversidad genética. Los análisis de isoenzimas concluyen que las especies endémicas y de distribución restringida poseen niveles menores de diversidad debida a deriva génica y flujo génico restringido (Karron, 1987; Hamrick y Godt, 1996).

En contraste, Nybom (2004) no encontró asociación entre la diversidad observada en marcadores dominantes y la distribución espacial, lo cual se asemeja a los resultados obtenidos en el presente trabajo. Por ejemplo, *A. striata* es la especie con más amplia distribución (Fig. 7) y presenta niveles de diversidad mayores que los de las otras especies, sin embargo, *A. c. albicans* es una subespecie endémica de la Barranca con distribución muy restringida, y contrario a la predicción, es la especie que presenta niveles de diversidad más altos. Por otro lado en las especies del grupo Marginatae no hay diferencias significativas en los niveles de variación, pero existen en su distribución espacial, aunque *A. hidalgensis* tiene la distribución más restringida, mientras que *A. xylonacantha* y *A. difformis* tienen una distribución regional amplia. Los niveles de variación intrapoblacional no pueden ser explicados en estas especies por los patrones de distribución espacial, lo cual dificulta hacer el análisis de diversidad usando los criterios de rareza que se discutieron en el capítulo 1.

En compilaciones previas de estudios realizados con RAPDs en plantas (Nybom y Bartish, 2000), la media de diversidad a nivel poblacional es de $H=0.214$. los resultados obtenidos en este trabajo son muy cercanos a esta media. En los valores de la Tabla 20, observamos que los niveles de diversidad encontrados en las cinco especies de *Agave* son más altos que los reportados para monocotiledóneas de polinización cruzada y similares a los encontrados con marcadores dominantes para plantas perennes longevas de distribución regional, dispersadas por viento o de ciclo sucesional medio. Por otro lado, empleando estos mismos marcadores, Aguirre (2004) encontró niveles más altos de

Tabla 20. Medidas de diversidad y estructura genética en *Agave*, en comparación con otras especies y grupos de plantas

<i>Especie</i>	<i>H</i>	<i>P</i>	<i>F_{ST}</i>	<i>Marcador</i>	<i>Referencia</i>
<i>A. difformis</i>	0.225	63	0.113 ¹	ISSRs	Este trabajo
<i>A. hidalguensis</i>	0.248	77	0.064 ¹	ISSRs	Este trabajo
<i>A. xylonacantha</i>	0.211	75	0.059 ¹	ISSRs	Este trabajo
<i>A. celsii</i>	0.278	89	0.130 ¹	ISSRs	Este trabajo
<i>A. striata</i>	0.263	77	0.103 ¹	ISSRs	Este trabajo
<i>A. cupreata</i>	0.29	89	0.14 ¹	ISSRs	(Aguirre, 2004)
<i>A. potatorum</i>	0.27	83	0.08 ¹	ISSRs	(Aguirre, 2004)
<i>A. garciae-mendozae</i>	0.27	85	0.10 ¹	ISSRs	(González, 2004)
<i>A. subsimplex</i>	0.14	76	0.08 ¹	RAPDs	(Navarro-Quezada et al., 2003)
<i>A. cerulata</i>	0.24	90	0.10 ¹	RAPDs	(Navarro-Quezada et al., 2003)
<i>A. deserti</i>	0.19	78	0.14 ¹	RAPDs	(Navarro-Quezada et al., 2003)
<i>A. lechuguilla</i>	0.39	96	0.09 ³	Isoenzimas	(Silva-Montellano y Eguiarte, 2003b)
<i>A. victoriae-reginae</i>	0.33	83	0.24 ³	Isoenzimas	(Martinez-Palacios et al., 1999)
<i>Manfreda brachystachia</i>	0.48	100	0.03 ³	Isoenzimas	(Eguiarte et al., 2000)
<i>Yucca</i>	0.20	68	0.17 ³	Isoenzimas	(Massey y Hamrick, 1998)
Plantas de polinización cruzada	0.27		0.22 ²	RAPDs*	(Nybom, 2004)
Monocotiledóneas de polinización cruzada	0.158	52.5	0.157 ³	Isoenzimas	(Hamrick y Godt, 1996)
Monocotiledóneas	0.19	---	0.38	RAPDs	(Nybom y Bartish, 2000)
Perennes longevas	0.18	65.5	0.094 ³	Isoenzimas	(Hamrick y Godt, 1996)
Perennes longevas	0.242	---	0.25	RAPDs	(Nybom y Bartish, 2000)
Perennes longevas	0.25	---	0.19 ²	RAPDs*	(Nybom, 2004)
Distribución regional	0.171	59.9	0.12 ³	Isoenzimas	(Hamrick y Godt, 1996)
Distribución regional	0.222	---	0.43	RAPDs	(Nybom y Bartish, 2000)
Distribución regional	0.21	---	0.28 ²	RAPDs*	(Nybom, 2004)
Dispersión por viento	0.27	---	0.17 ²	RAPDs*	(Nybom, 2004)
Sucesional medio	0.21	---	0.27 ²	RAPDs*	(Nybom, 2004)

Estimadores obtenidos con diferentes índices: ¹ θ , ² G_{ST} , ³ F_{ST}

*En este trabajo se analizaron de manera conjunta datos de RAPDs, AFLPs e ISSRs

diversidad en *A. cupreata* y *A. potatorum* ambas con distribución regional, mientras que González (2004) reportó también niveles altos de diversidad en *A. garciae-mendozae*, cuya distribución es más restringida y muy específica para ciertos ambientes.

4.4.2 Distribución de la diversidad genética entre poblaciones

La estructura genética refleja las interacciones de diferentes procesos, incluyendo la historia evolutiva a largo plazo (cambios en la distribución de las especies, fragmentación del hábitat, aislamiento de las poblaciones), las fuerzas evolutivas como la mutación, la deriva, el flujo génico y la selección (Slatkin, 1987; Schaal et al., 1998).

En los análisis comparativos en diferentes estudios hechos con RAPDs para especies que se entrecruzan, las estimaciones de diferenciación genética entre poblaciones (usando el índice de Shannon) van del 15 al 38%, y con AMOVA e índices relacionados con F_{ST} se han encontrado menores al 20% (Bussell, 1999).

Usando diferentes métodos de análisis en este trabajo se han llegado a conclusiones similares: las cinco especies presentan niveles bajos de diferenciación genética ($\theta=0.064-0.130$ y $G_{ST}=0.088-0.112$). Los valores más altos los encontramos en *A. celsii* y después en *A. striata* y *A. difformis*. En estas tres especies se ha observado que predomina la reproducción clonal. Por otro lado, las otras dos especies del grupo Marginatae (*A. xylonacantha* y *A. hidalguensis*) presentan niveles de diferenciación muy bajos y coinciden en que son las especies donde parece ser más importante la polinización por murciélagos (capítulo 3), por lo que se espera que haya un elevado flujo génico entre sus poblaciones (ver más adelante). Por otra parte, la media de diferenciación poblacional encontrada con análisis de marcadores dominantes fue de $F_{ST}=0.35$ y $G_{ST}=0.29$ (Nybom, 2004), valores que están por encima de los encontrados en este trabajo.

En general se ha demostrado que los valores mayores de F_{ST} se observan en plantas anuales, que se dispersan por gravedad y que son sucesionales tempranas, mientras que los valores menores se han encontrado en especies endémicas. En este trabajo, la subespecie endémica analizada *A. c. albicans*, no sólo presenta niveles altos de diversidad, sino niveles mayores de diferenciación genética que el resto de las especies, contrariamente a lo esperado. La ausencia de diferenciación genética observada en las

cinco especies se puede explicar por un alto flujo génico (que contrarresta el efecto de la deriva) o bien por la combinación del efecto del movimiento de los polinizadores y las altas tasas de entrecruzamiento (Zawko et al., 2001). Alternativamente se puede deber también a la historia de las poblaciones, por ejemplo si han colonizado el ambiente recientemente o si se trata de especies de reciente aparición (Gaudeul et al., 2000), para el caso de las especies del género *Agave* tenemos evidencias de que han tenido una rápida diversificación y podemos esperar que se trate de especies relativamente jóvenes (Capítulo 2).

Al analizar los patrones observados para cada especie, encontramos que para *A. c. albicans* hay una clara diferencia en el análisis de la estructura genética si se incluye a la población externa que no pertenece a la misma subespecie. Al incluir a esta última, los índices de estructura aumentan notoriamente, lo que indica que esta población está muy diferenciada del resto, debido a diferencias taxonómicas o a la distancia geográfica. Al analizar sólo las poblaciones de la subespecie *A. c. albicans*, los índices de estructura se vuelven menores incluso que los de *A. striata*, pero continúan siendo mayores a los de las especies del grupo Marginatae. Para el caso de *A. striata*, no hay una clara diferencia si se incluye a la población externa, lo que sugiere que las poblaciones internas están tan diferenciadas como la externa y en tal caso, puede explicarse por el menor movimiento de los polinizadores (una gran variedad de polinizadores diurnos visitan las flores de esta especie, ver capítulo 3). Para estas dos especies las observaciones en campo sugieren una marcada preferencia por la reproducción asexual, lo que podría explicar los patrones de estructura observados.

Analizando ahora a las especies del grupo Marginatae, observamos que en el caso de *A. xylonacantha* y *A. difformis* la población externa coincide en la ubicación geográfica y la estructura es mayor para *A. difformis*. En estas especies no hay una diferencia notoria en los patrones de visitas de polinizadores, de manera que su mayor estructura se puede deber a que las especies difieran en edad o bien a que la alta clonalidad que se observa en *A. difformis* repercute en su mayor estructura. Finalmente, en *A. hidalguensis* no hay un punto de comparación fuera de la barranca, sin embargo dentro de la barranca los valores son intermedios entre *A. xylonacantha* y *A. difformis*.

Por otro lado, los análisis de varianza molecular efectuados en cuatro especies también aportan información interesante. Se puede observar en la figura nueve un componente interpoblacional muy alto en *A. striata*, en esta especie un porcentaje importante de la diversidad se encuentra entre las poblaciones muestreadas en Metztlán, pero el componente entre el grupo de Metztlán y el exterior no es perceptible. De manera contrastante para *A. xylonacantha* la variación genética está repartida de manera preferente dentro de las poblaciones de Metztlán que son muy diversas genéticamente y los componentes interpoblacionales, pero entre grupos son menores. Para *A. difformis* y *A. c. albicans*, el mayor porcentaje de la variación también se encuentra dentro de las poblaciones y hay una repartición similar entre el componente entre poblaciones y entre grupos, esto indica que la aportación a la variación de la población externa es similar a la aportación entre las poblaciones de la barranca, lo que concuerda con la mayor diferenciación con los índices F . Sin embargo, nuevamente observamos que la mayor proporción del componente entre grupos se presenta en *A. c. albicans* donde la población externa está más diferenciada y más distante.

Finalmente, los estimadores bayesianos arrojan medidas que varían en un orden de magnitud con el resto de los estimadores, por lo cual será necesario afinar el modelo probabilístico usado en la asignación de la distribución *prior*. Los valores obtenidos de G_{ST}^B son muy similares entre las cinco especies, siendo mayor solamente para *A. striata*.

4.4.3 Distancia genética y análisis de aislamiento por distancia

Al analizar las distancias genéticas y los dendrogramas para cada una de las especies, se observa que para *A. difformis*, *A. xylonacantha* y *A. celsii*, las poblaciones dentro de la barranca están más cercanas entre sí y la población externa está más lejana. Un patrón interesante se observa con *A. xylonacantha* y *A. difformis*, que son especies del mismo grupo, tienen valores similares de diversidad y patrones similares de visitas de polinizadores y la distancia geográfica con la población externa es la misma, por lo que destaca el hecho de que la población externa de *A. difformis* sea más lejana genéticamente que la de *A. xylonacantha*, la explicación a esta mayor distancia puede ser por un lado la mayor clonalidad observada en campo en *A. difformis*, o bien que las poblaciones de *A. xylonacantha* sean más recientes o que mantengan un mayor flujo

génico. El análisis conjunto del grupo Marginatae (Fig. 11), permite observar que las poblaciones de *A. difformis* y *A. xylonacantha* internas a la Barranca son más similares entre sí que con las poblaciones de la misma especie fuera de la Barranca, lo que sugiere que se está manteniendo cierto flujo génico entre estas dos especies y además que se encuentran muy cercanas genéticamente.

Uno de los resultados más destacados de este trabajo es que los marcadores moleculares seleccionados parecen reflejar de manera acertada las relaciones de parentesco entre las especies. Se tienen evidencias de que *A. striata* es el grupo basal de los agaves (Good-Ávila, com. pers.) y en la figura 12 se puede observar que la distancia genética es muy elevada con respecto al resto de las especies. Por otro lado, en esta misma figura se observa que la distancia entre *A. celsii* y *A. celsii albicans*, es similar a la que existe entre especies diferentes del grupo Marginatae. A partir de este resultado valdría la pena explorar con otros marcadores moleculares que tengan mayor resolución, el estatus taxonómico de *A. c. albicans*, ya que podría tratarse de una especie endémica para la Barranca de Metztlán.

Finalmente, otra alternativa que podría explorarse, es el usar estas distancias genéticas como reloj molecular, ya que en caso de poderlo hacer, se podría obtener una estimación de la divergencia entre estas especies de *Agave*.

En cuanto a la relación que guardan las distancias genéticas con las geográficas, la prueba de Mantel efectuada para todas las especies demuestra que no se sigue un modelo de aislamiento por distancia, aunque si ocurre de manera marginal (no estadísticamente significativa) en *A. xylonacantha* y *A. celsii*.

4.4.4 Flujo génico

En lo que respecta a los niveles de flujo génico, se sabe que si el flujo génico por generación (Nm) es mayor que uno y menor que cuatro, entonces hay más de un migrante exitoso por generación, por lo que el flujo génico está homogeneizando las poblaciones en cierto grado (Slatkin, 1987). En este trabajo se observaron valores de Nm mayores a uno entre las poblaciones de todas las especies, a excepción de las poblaciones de *A.*

celsii y *A. c. albicans* y de dos poblaciones de *A. striata* que mostraron una distancia genética alta entre ellas.

Se considera que los altos valores de flujo génico encontrados en la mayoría de las especies, son un reflejo de las grandes distancias geográficas que pueden recorrer los murciélagos polinizadores, homogeneizando así las poblaciones.

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN GENERAL

En este capítulo se discuten los resultados obtenidos en las diferentes fases del estudio efectuado en las cinco especies de *Agave*. Se integra la información ecológica y genética acumulada. Se discute acerca de las posibles explicaciones a la coexistencia de las especies encontradas hasta el momento, así como las evidencias de separación del nicho entre las especies. En la sección de biología reproductiva se señala la importancia de las evidencias encontradas sobre la polinización por murciélagos en el subgénero *Littaea* y el papel de los visitantes florales. Finalmente, se hace un recuento de las implicaciones de los resultados obtenidos de la genética de poblaciones de estas especies.

5.1 Diversidad de agaves y su coexistencia en la Barranca de Metztitlán

5.1.1 Coexistencia de los agaves en la Barranca de Metztitlán

La Barranca de Metztitlán es un sitio que llama la atención por su gran diversidad de especies y destaca de modo importante la coexistencia de una decena de especies de agaves. En este primer trabajo acerca de la historia natural de los agaves más representativos de la zona, se ha comenzado con la comprensión de algunos de los mecanismos que mantienen la coexistencia de estas especies.

Una de las primeras aproximaciones para entender la coexistencia ha sido el definir los ejes del nicho en los que pueda haber sobreposición. Como se ha sugerido que las especies más cercanas filogenéticamente tendrán una mayor superposición en el nicho, hemos evaluado varios parámetros en las cinco especies, poniendo especial atención en las tres especies más cercanas (*A. xylonacantha*, *A. difformis* y *A. hidalguensis*) que pertenecen al grupo Marginatae, en las que se esperaría una mayor sobreposición del nicho. Al respecto se ha observado que por lo regular estas especies no se encuentran juntas en los mismos sitios y cuando lo están, las densidades poblacionales de alguna de ellas no son altas (Arzate, com. pers.). Será necesario explorar en el futuro las densidades poblacionales en las zonas donde se sobreponen las especies para evaluar si están cerca de su capacidad de carga y por lo tanto predecir si puede existir la competencia. A largo plazo, el realizar estudios demográficos en las zonas donde estas especies se sobreponen también ayudará a demostrar si la coexistencia puede ser estable o inestable (Chesson, 2000).

En estas tres especies (y en general en las cinco especies analizadas) no existe la sobreposición en la época de floración, de manera que se minimiza la competencia por polinizadores; previamente ya se ha demostrado que la asincronía en épocas de floración puede ser una barrera precigótica en especies simpátricas (Husband y Sabara, 2004). Por otra parte, el aspecto en el que más se ha trabajado la complementariedad fenológica es en el funcionamiento de los ecosistemas, ya que cuando las fenologías están desfasadas se ofrece un recurso a los polinizadores a lo largo de todo el año. En la comunidad de

Metztlán se podría evaluar en un futuro la importancia del corredor ecológico que forman los agaves y cactáceas columnares para el mantenimiento de las poblaciones de los murciélagos nectarívoros.

Sin embargo, para poder determinar si existe competencia entre las especies de una manera directa, es necesario realizar experimentos de remoción, adición y sustitución de especies en jardines comunes, lo cual es muy complicado en especies de ciclos de vida largos como los agaves.

Por otro lado, también es importante considerar las alternativas que existen para explicar la coexistencia de especies similares. Una teoría alternativa a la competencia es la teoría neutra que predice que las especies similares tróficamente coexisten por procesos ecológicos y evolutivos estocásticos que actúan a escala local y regional, que determinan que la especie se diferencien en su abundancia relativa o se extingan (Hubbell, 2001; Hubbell, 2003; Gaston y Chown, 2005). Los agaves podrían ser un ejemplo comparable al de los bosques tropicales en donde varias especies similares viven en simpatria.

Si comparamos la teoría neutra con la genética de poblaciones, podríamos pensar que como en la segunda, la neutralidad explica bien gran parte de la variación genética sinónima, sin embargo la variación estocástica (mutación y deriva) adquiere menos importancia cuando la selección es fuerte. De un modo similar los sistemas ecológicos podrían operar en un continuo de fuerzas neutras y no neutras variando la importancia en diferentes tipos de ensamblajes y comunidades (Gaston y Chown, 2005)

5.1.2 Desplazamiento de caracteres

En animales el eje del nicho del tamaño corporal ha sido muy importante para entender la estructuración de las comunidades, los ejemplos clásicos son los de comunidades de roedores que se segregan en tamaño. Existe la posibilidad de usar el tamaño corporal como eje del nicho importante en plantas, ya que se considera que el tamaño corporal refleja la relación entre el organismo y el medio. En particular, para agaves el tamaño corporal resulta ser muy importante para la reproducción (existen teorías sobre estrategias de vida y semelparidad que se basan en el tamaño al que las especies “deciden” reproducirse debido al costo-beneficio de reproducirse o de esperar la

reproducción). En este trabajo se ha demostrado una separación en los tamaños de las cinco especies, lo que sugiere un uso diferencial de los recursos.

5.1.3 Convergencia de especies en la Barranca de Metztitlán vs. especiación simpátrica

Aun es necesario evaluar entre las dos alternativas que explican la coexistencia: por un lado las especies pudieron colonizar la zona y por medio de diferenciación ecológica del nicho ha sido posible su coexistencia. O, por otro lado la barranca es un centro de especiación muy importante para el subgénero *Littaea*.

Recientemente, se han empleado análisis genéticos y filogenéticos como pruebas retrospectivas de la especiación simpátrica (Via, 2001). Tales análisis incluyen medir las edades de los taxa y comparar con el área de distribución (Barraclough y Nee, 2001). Los árboles filogenéticos, junto con información geográfica y ecológica de las especies, dan una evidencia indirecta de los eventos de especiación que dieron lugar a los ensambles de especies en la actualidad (Berlocher, 1998).

Por otro lado se ha demostrado que las interacciones ecológicas pueden ser una fuerza muy importante para que ocurra el aislamiento reproductivo en simpatria (Doebeli y Dieckmann, 2000, 2003). Incluso existe la teoría de que en las poblaciones que están estructuradas geográficamente, las interacciones están localizadas espacialmente, a lo largo de gradientes ambientales que pueden facilitar la especiación por selección dependiente de la frecuencia y producir los patrones de segregación geográfica entre las especies emergentes.

En el Capítulo 2 del presente trabajo exploramos el posible papel que han jugado las interacciones con los polinizadores (murciélagos nectarívoros) en la radiación adaptativa del género *Agave*. Las inflorescencias se han ido seleccionando al grado de producir recursos tan abundantes que la planta muere después de la reproducción. Comparativamente con el resto de géneros de la familia, el género *Agave* ha sido particularmente exitoso con la estrategia de polinización que emplea. También discutimos el hecho de que la desertificación de Norteamérica abrió la posibilidad para los agaves de invadir nuevos nichos con relativamente pocos competidores. Además de

todas las adaptaciones morfo-fisiológicas a ambientes áridos que han facilitado su dispersión y diversificación exitosa.

5.2 Biología reproductiva

5.2.1 Sistemas de polinización en los agaves de Metztitlán

En este trabajo se ha demostrado que los agaves del subgénero *Littaea* de la Barranca de Metztitlán muestran caracteres florales asociados al síndrome de polinización por murciélagos, y que se comportan de una manera diferente a la propuesta anterior para las dos secciones, en que se suponía una polinización primordialmente por insectos en el subgénero *Littaea*, además mostramos evidencias de que los murciélagos son el visitante preponderante en cuatro de las cinco especies.

La idea generalizada de la dicotomía entre los subgéneros de *Agave* se basa en los estudios que se habían realizado fuera del rango de distribución de los murciélagos nectarívoros, con este trabajo se dan evidencias de la importancia de los murciélagos como polinizadores en las zonas donde los agaves se encuentran dentro del área de distribución de los murciélagos.

Otro cuestionamiento que surge del presente trabajo es si los agaves tienden hacia una alta especialización con los murciélagos polinizadores. Al respecto ha resultado ser útil la comparación con los resultados obtenidos previamente en estudios realizados con cactáceas columnares. Por ejemplo, Fleming sugiere que para las cactáceas, cuando los polinizadores efectivos no son confiables espacial o temporalmente, la selección natural puede favorecer que ocurra el cambio en el sistema de polinización. Al norte de la distribución de los agaves, se pudieron estar seleccionando las inflorescencias con néctar más concentrado y que cambiaron a liberar polen y néctar durante el día.

Con los experimentos realizados en este trabajo, es posible predecir que la función de los polinizadores secundarios (diurnos) sea el aumentar la adecuación de la planta. Por ejemplo un sistema altamente especializado dejaría de producir néctar o bien lo reabsorbería para evitar el gasto energético y que fuera consumido por otros polinizadores, no sería lo suficientemente general como para atraer otros visitantes.

Es muy difícil que ocurra una especialización extrema al polinizador, mientras que los sistemas generalistas son menos susceptibles a la desaparición de los polinizadores, por ejemplo, las especies que se encuentran fuera del rango de distribución de los murciélagos pueden sobrevivir dependiendo de otros polinizadores. Nosotros pensamos que el efecto de los polinizadores diurnos es aditivo al de los nocturnos y aumenta el éxito para las ocasiones en que no se presentan polinizadores nocturnos, también hemos observado gran variación en las frecuencias de visitas de murciélagos entre días, días con mayor actividad que otros.

Por otro lado, el mantenimiento de la especialización hacia los murciélagos puede deberse a varias razones. Una es que la evolución de los caracteres florales ha sido paralela a la interacción con el polinizador y como resultado ocurre toda una integración genética que determina estas estructuras, si el polinizador dejara de estar en la misma zona que la planta, sería muy difícil que se pierda esta integración, por otro lado otros mecanismos interesantes por los que se puede mantener la especialización son: otros tipos alternativos de reproducción de las plantas, como el tener mecanismos asexuales como clonalidad, o bien tener auto-polinización facultativa o ciclos de vida largos, todos ellos también observados en el género *Agave*.

5.2.2 Visitantes florales

Este trabajo es el primero que reporta visitas de murciélagos a agaves del subgénero *Littaea*. Los murciélagos son el polinizador más importante para todas las especies menos para *A. striata*.

Es claro que los murciélagos tienen un efecto mayor al observar la carga de polen que llevan, la cantidad de visitas y el impacto sobre las flores, lo que sugiere que en cada visita se depositan mucho más granos de polen que además proviene de distancias geográficas mayores.

Los índices de sobreposición del nicho y de similitud nos dan una idea de que tanto comparte el ensamble de polinizadores los diferentes agaves. La mayor similitud de composición de polinizadores se da entre *A. xylonacantha* y *A. sp.*, pero ambas están claramente separadas temporalmente.

A. c. albicans parece sobreponerse mucho en la composición de los polinizadores con las especies con las que se sincroniza en polinización, pero está claramente separada en el eje del nicho de tamaño.

5.2.3 Evolución de la semelparidad

El modelo del esfuerzo reproductivo sugiere que la evolución de la semelparidad ha ocurrido cuando la altura de la planta afecta su atracción de polinizadores y cada vez se aumenta más el esfuerzo hasta llegar al esfuerzo máximo de enviar sus reservas a la producción de la inflorescencia.

Schaffer y Schaffer (1977) propusieron que los polinizadores, en especial los murciélagos seleccionan plantas con inflorescencias cada vez más grandes.

Esta selección se puede medir a partir la comparación entre los tamaños de las inflorescencias y el éxito reproductivo (medido como el fruit-set o el seed-set).

En el presente trabajo encontramos también una correlación positiva entre el tamaño de la inflorescencia y el fruit-set para *A. celsii albicans*, *A. difformis* y *A. sp.*, pero no existe para *A. striata* y *A. xylonacantha*.

5.3 Genética de poblaciones

Los estudios concernientes al origen, mantenimiento y distribución de la diversidad genética en plantas han permitido conocer más acerca de los modos de especiación, adaptación y dinámica poblacional. La distribución de la diversidad genética puede ser influenciada por caracteres de historias de vida, teniendo los sistemas reproductivos un efecto muy significativo (Hamrick y Godt, 1996).

Las especies que se auto-polinizan tienen un alto nivel de diferenciación genética y una uniformidad dentro de las poblaciones, mientras que en las exógamas hay mayor diversidad dentro de las poblaciones y menos diferenciación genética (Hamrick y Godt, 1996). En este trabajo hemos podido comparar los patrones de variación genética en cinco especies relacionadas filogenéticamente aunque con ciertas características ecológicas contrastantes.

5.3.1 Sobre los marcadores moleculares ISSRs

El uso de marcadores dominantes como los ISSRs (RAPDs, AFLPs, etc.) ha sido discutido debido a las suposiciones que se deben hacer para efectuar los análisis de frecuencias alélicas, de diversidad y de estructura genética (Lynch y Milligan, 1994; Szmidt et al., 1996; Isabel et al., 1999; Zhivotovsky, 1999; Krauss, 2000). Con la evidencia generada en los últimos años en diferentes especies de plantas, y con los estudios comparativos que se han realizado (por ejemplo Nybom, 2004), se ha demostrado que son marcadores útiles, confiables, y que por su bajo costo y fácil implementación son una buena opción para estudios de variación genética con diferentes enfoques (Wolfe, 2005). Por ejemplo, está documentado el uso de estos marcadores para determinar los niveles de diversidad genética en especies con necesidades de conservación (Esselman et al., 1999; Camacho y Liston, 2001; McGlaughlin et al., 2002; Smith y Bateman, 2002; Ge et al., 2003; Ge et al., 2005b; Ge et al., 2005a).

Se ha estudiado con particular atención la manera en que se pueden obtener resultados más confiables al utilizar estos marcadores y se han llegado a diferentes conclusiones. Por ejemplo, un trabajo definitorio en la manera en que se pueden analizar estos marcadores fue el publicado por Lynch y Milligan (1994) en donde hacen una serie de recomendaciones para evitar el sesgo en los cálculos de frecuencias alélicas, por ejemplo se recomienda el uso de muchos loci para compensar la posibilidad de no estimar de manera correcta los alelos recesivos. Estos mismos autores también sugieren que se usen tamaños poblacionales grandes (de 100 individuos o de 2 a 10 veces más que cuando se usan marcadores co-dominantes); o bien eliminar los loci con baja frecuencia de alelos nulos. Usando esta serie de correcciones, los valores obtenidos con marcadores dominantes se asemejan a los obtenidos con marcadores co-dominantes (como las isoenzimas) para la misma especie.

Recientemente, Nybom (2004) recomienda analizar como mínimo de 30 a 80 loci, aunque si se usan de 100 a 200 loci, se obtienen valores aun más confiables (Mariette et al., 2002), este número tan alto de loci es plausible particularmente usando AFLPs.

Existen otras alternativas al uso de la suposición de equilibrio de Hardy-Weinberg, por ejemplo el análisis de diversidad usando el índice de Shannon: de acuerdo a Dawson (1995), el índice de Shannon no es sensible a efectos del sesgo causado por la

incapacidad de detectar a los heterocigos. Por otro lado, el análisis de varianza molecular (AMOVA) usa distancias euclidianas para determinar las diferencias entre los perfiles de ISSRs (o cualquier otro marcador dominante), que al ser comparados como fenotipos, también evita la suposición de equilibrio.

En los últimos años se observa la tendencia a aumentar los análisis de estos marcadores con los métodos bayesianos recientemente implementados. Estos métodos permiten incorporar la incertidumbre acerca de diferentes modelos (ya sea que la población esté en equilibrio o que se tenga información previa acerca de la magnitud de la endogamia) y usar esta información para estimar los niveles de diversidad y estructura genética de manera más precisa (Holsinger y Wallace, 2004).

Por lo anterior, consideramos que los resultados obtenidos en el presente trabajo son estadísticamente confiables no obstante el origen de los marcadores empleados.

5.3.3 Genética de la conservación

Una aplicación que se ha discutido con anterioridad para los datos obtenidos con marcadores moleculares es el poder sugerir estrategias de conservación para las especies analizadas.

En el presente trabajo hemos encontrado resultados con una aplicación clara en el marco de la conservación de especies. En primer lugar hemos encontrado que para las especies analizadas el mayor porcentaje de la variación genética se encuentra dentro de la barranca de Metztitlán.

En el caso de *A. c. albicans*, llegamos a la conclusión de que se debe revisar el estatus taxonómico, ya que las distancias genéticas nos muestran que podría tratarse de una especie (y no una subespecie) endémica de la Barranca de Metztitlán.

Para el caso de *A. xylonacantha*, se encontró que la mayor diversidad ocurre también en las poblaciones dentro de la barranca y estudios adicionales (Ricardo Colín, com. pers.) han demostrado que a lo largo de la distribución de esta especie hay una disminución en la diversidad conforme las poblaciones se alejan de la barranca, lo que sugiere que ésta pueda ser el centro de diversidad para esta especie.

Agave hidalguensis también es una especie cuyo centro de diversidad es la barranca, ya que hasta el momento no se han encontrado otras poblaciones fuera de Metztitlán.

Por lo anterior sugerimos que esta localidad sea tomada en cuenta como un reservorio muy importante de diversidad genética para el subgénero *Littaea*.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

De los capítulos anteriores emanan una serie de conclusiones que se resumen a continuación.

Además se describen algunos de los estudios que se plantean como necesarios para continuar con el entendimiento ecológico y evolutivo de la comunidad de agaves de la Barranca de Metztitlán.

6.1 Conclusiones

Con los datos actuales aun es difícil dar explicaciones a la coexistencia de las especies en la barranca de Metztlán. Sin embargo, se han encontrado las siguientes evidencias de separación del nicho:

- a) La época de floración se encuentra desfasada en las especies más cercanas (grupo *Marginatae*), y a lo largo del año existe cierta complementariedad fenológica entre las especies.
- b) Se encontró evidencia que sugiere el desplazamiento de caracteres en la alometría de las rosetas.
- c) Hay un desfase de los picos de producción de néctar para las especies cuya floración ocurre en la misma época del año, y también para estas especies hay una baja sobreposición del nicho en la composición de los ensambles de polinizadores.

En lo referente a la biología reproductiva de las cinco especies se concluye que:

- a) Los murciélagos nectarívoros de los géneros *Leptonycteris* y *Choeronycteris* son los principales polinizadores en las especies de *Agave* estudiadas, a excepción de *A. striata*.
- b) Existe una complementariedad fenológica de las especies de *Agave* en la localidad, de manera que existe el recurso del néctar para los polinizadores a todo lo largo del año.
- c) Existe una diferencia substancial en los tamaños de las diferentes rosetas, lo que sugiere una segregación en el uso de recursos.
- d) Todas las especies mostraron patrones de producción de néctar y concentraciones de azúcares congruentes con el síndrome de polinización por murciélagos.
- e) En las especies en que coincide la época de floración existe una diferencia en la hora a la que ocurren los picos de producción de néctar.
- f) Al comparar los ensambles de polinizadores entre especies con floración en la misma época del año, la sobreposición del nicho es menor. Mientras que la mayor sobreposición se encuentra en aquellas especies que se encuentran desfasadas temporalmente.

Con los análisis realizados con los marcadores ISSRs se concluye que:

a) Las cinco especies presentan niveles de variación genética alta, comparable al de especies de plantas perennes y longevas.

b) Los diversos índices para estimar diversidad genética producen estimadores similares.

c) La mayor diversidad genética se encuentra en las especies más pequeñas (*A. c. albicans* y *A. striata*) y con ciclos de vida presumiblemente más cortos.

d) No hay una clara relación entre los índices de diversidad genética y los patrones de distribución espacial. Por lo tanto, las especies más raras no mostraron menor diversidad que las especies comunes.

e) Los índices de diferenciación genética son bajos en las cinco especies y posiblemente se deben a las grandes distancias recorridas por los murciélagos polinizadores.

f) La mayor diferenciación genética ocurre en las especies en que se observa mayor clonalidad.

g) Las distancias genéticas demuestran que para las especies del grupo Marginatae ocurre flujo génico y se encuentran más cercanas genéticamente aquellas que se encuentran cercanas geográficamente aunque pertenezcan a diferente especie.

h) La distancia genética entre *A. celsii* y *A. c. albicans* es similar a la encontrada entre especies diferentes del grupo Marginatae.

i) *A. striata* muestra ser muy diferente genéticamente al resto de los agaves estudiados.

j) Las especies estudiadas no parecen seguir un modelo de aislamiento por distancia.

6.2 Perspectivas

En cuanto a los modelos de estructura de comunidades, es necesario llevar a cabo más estudios que nos permitan explicar la competencia, la coexistencia o las posibles alternativas a la alta diversidad de agaves en la Barranca de Metztitlán.

Para medir la competencia entre las especies, aun es necesario realizar experimentos en jardines comunes, en los que se efectúe la remoción, adición y sustitución de especies. Además es necesario evaluar con estudios demográficos la abundancia relativa de las especies, para poder conocer si se encuentran cerca de su capacidad de carga y así evaluar si la coexistencia es estable o inestable.

También es necesario explorar otros ejes del nicho en los que pueda existir sobreposición, estos pueden incluir las características físico-químicas de los diferentes microhábitats que se encuentran dentro de la barranca de Metztitlán y también las interacciones con otros organismos en la comunidad.

Será necesario realizar análisis cuantitativos de la fenología para poder probar los modelos nulos de distribución de las épocas de floración con análisis estadísticos formales.

Realizar observaciones de visitas más detalladas, para determinar de manera más precisa los patrones de visitas de polinizadores por especie, así como diseñar experimentos que nos permitan evaluar la eficiencia real de cada polinizador potencial.

Comparar los resultados obtenidos de la genética de estas especies con otras cuya distribución geográfica sea aun más restringida, para tener más datos para explicar los patrones entre especies raras y comunes.

Explorar el uso de nuevos marcadores moleculares como los microsátélites de cloroplasto o genes nucleares para poder desarrollar métodos de coalescencia y estudiar con más detalles la historia evolutiva de las especies de esta comunidad. Será útil además estimar las edades de los taxa y explorar con métodos filogeográficos la historia de estas especies que coexisten, con particular interés en las del grupo Marginatae que se encuentran más relacionadas filogenéticamente.

APÉNDICE 1. Protocolos de obtención de ADN y amplificación de ISSRs

I. Método de extracción de ADN. Miniprep modificado para agaves.

1. En un mortero cortar en cuadros pequeños alrededor de 1g de tejido y moler con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y eliminar el máximo de fibras.
2. Agregar 250 μ l de buffer de extracción CTAB y 750 μ l de buffer STE, seguir moliendo y recuperar en un microtubo de 1.5ml.
3. Centrifugar a 9000g durante 8 min. y eliminar el sobrenadante.
4. Resuspender con 400 μ l de CTAB 2X y 600 μ l de STE.
5. Centrifugar a 9000g durante 8 min.
6. Eliminar el sobrenadante y resuspender con 600 μ l de CTAB 2X.
7. Agregar 4 μ l de RNAsa (7000 u/ml). Incubar 20 min. a 37° C. Conservar en hielo 5 minutos.
8. Agregar 40 μ l de proteinasa *K* e incubar a 65°C por 20 minutos. Durante la incubación es conveniente invertir los tubos 2 a 3 veces. Poner en hielo 5 minutos.
9. Agregar a cada tubo 600 μ l de cloroformo:octanol 24:1, agitar en vórtex hasta homogeneizar.
10. Centrifugar a 8000g durante 12 min.
11. Trasladar el sobrenadante a un tubo nuevo. Este paso es fundamental para obtener un ADN limpio, se debe evitar recuperar material de la difase que se forma, recupere con una pipeta de 200 μ l solo el 70% del sobrenadante, tendrá menos ADN pero mas limpio.
12. Precipitar el ADN con isopropanol frío a -20°C. El volumen es 2/3 del volumen obtenido de sobrenadante en el paso anterior (600 μ l aprox.).
13. Dejar reposar 2 horas a -20°C.
14. Centrifugar a 7500g durante 5 min. Eliminar el sobrenadante.
15. Limpiar el ADN agregando 1 ml de etanol 70% frío a -20°C, mezclar en vórtex hasta observar que el botón se desprende dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente y centrifugar a 9000g durante 5 min.

16. Eliminar el sobrenadante sin perder de vista el botón. Si lo considera necesario se puede repetir el lavado con alcohol al 80%.
17. Rehidratar el ADN con agua ultra pura, el volumen de agua depende del tamaño del botón y puede ir de 15 μ l a 150 μ l .

Para los reactivos se emplearon las siguientes concentraciones de reactivos:

Buffer de extracción CTAB 2X:

Tris-HCl 100 mM pH=8
NaCl 1.4 M
EDTA 20 mM pH=8
CTAB 2%
b-mercaptoetanol 0.3%

Buffer de extracción CTAB:

Tris-HCl 100 mM pH=8
NaCl 1.5 M
EDTA 20 mM
CTAB 4%
PVP40 4%
Ácido ascórbico 0.1%
DIECA 0.1%
b-mercaptoetanol 0.3%

Buffer de extracción STE:

Tris-HCl 100 mM pH=8
EDTA 50 mM pH=8
NaCl 100mM
b-mercaptoetanol 0.3%

II. Protocolos de preparación de las mezclas de reacción para los ISSRs

Mezcla de reacción para todas las especies de *Agave* y para los tres iniciadores:

<i>Especie</i>	<i>Reactivo y concentración inicial</i>	846		853		811	
		<i>Concentración final</i>	<i>Volumen (μl)</i>	<i>Concentración final</i>	<i>Volumen (μl)</i>	<i>Concentración final</i>	<i>Volumen (μl)</i>
<i>A. difformis</i>	Buffer 10X	1X	3	1X	3	1X	3
	MgCl ₂ 50 mM	4.6 mM	2.76	2 mM	1.2	2.5 mM	1.52
	DNTPmix 2.5 mM	0.2 mM	2.4	0.2 mM	2.4	0.2 mM	2.4
	Iniciador 10 μM	0.4 μM	1.2	0.4 μM	1.2	0.4 μM	1.2
	ADN 50 ng/μl	70 ng	1.5	70 ng	1.5	70 ng	1.5
	Taq 5 U/μl	0.7 U	0.14	0.7 U	0.14	0.7 U	0.14
	Agua	----	19	----	20.56	----	20.24
	Total		30		30		30
<i>A. hidalguensis</i>	Buffer 10X	1X	3	1X	3	1X	3
	MgCl ₂ 50 mM	4.0 mM	2.4	1.8 mM	1.08	2.4 mM	1.44
	DNTPmix 2.5 mM	0.2 mM	2.4	0.2 mM	2.4	0.2 mM	2.4
	Iniciador 10 μM	0.4 μM	1.2	0.4 μM	1.2	0.4 μM	1.2
	ADN 50 ng/μl	70 ng	1.5	70 ng	1.5	70 ng	1.5
	Taq 5 U/μl	1 U	0.2	1 U	0.2	1 U	0.14
	Agua	----	19.3	----	20.62	----	20.32
	Total		30		30		30
<i>A. xylonacantha</i>	Buffer 10X	1X	3	1X	3	1X	3
	MgCl ₂ 50 mM	4.6 mM	2.76	2 mM	1.2	2.53 mM	1.52
	DNTPmix 2.5 mM	0.2 mM	2.4	0.2 mM	2.4	0.2 mM	2.4
	Iniciador 10 μM	0.4 μM	1.2	0.4 μM	1.2	0.4 μM	1.2
	ADN 50 ng/μl	70 ng	1.5	70 ng	1.5	70 ng	1.5
	Taq 5 U/μl	0.7 U	0.14	0.7 U	0.14	0.7 U	0.14
	Agua	----	19	----	20.56	----	20.24
	Total		30		30		30
<i>A. celsii albicans</i> y <i>A. celsii</i>	Buffer 10X	1X	3	1X	3	1X	3
	MgCl ₂ 50 mM	3.0 mM	1.8	2 mM	1.2	2.3 mM	1.38
	DNTPmix 2.5 mM	0.2 mM	2.4	0.2 mM	2.4	0.2 mM	2.4
	Iniciador 10 μM	0.4 μM	1.2	0.4 μM	1.2	0.4 μM	1.2
	ADN 50 ng/μl	70 ng	1.5	70 ng	1.5	70 ng	1.5
	Taq 5 U/μl	0.8 U	0.16	0.9 U	0.18	1 U	0.2
	Agua	----	19.94	----	20.52	----	20.32
	Total		30		30		30
<i>A. striata</i>	Buffer 10X	1X	3	1X	3	1X	3
	MgCl ₂ 50 mM	2.8 mM	1.68	1.08 mM	0.65	3.2 mM	1.94
	DNTPmix 2.5 mM	0.2 mM	2.4	0.2 mM	2.4	0.2 mM	2.4
	Iniciador 10 μM	0.4 μM	1.2	0.4 μM	1.2	0.4 μM	1.2
	ADN 50 ng/μl	70 ng	1.5	70 ng	1.5	70 ng	1.5
	Taq 5 U/μl	0.8 U	0.16	1 U	0.2	1 U	0.2
	Agua	----	20.06	----	21.05	----	19.76
	Total		30		30		30

III. Programas del termociclador para la amplificación de ISSRs

Especie	Iniciador	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
<i>A. difformis</i>	853	95 °C	0:05:00	1
		94 °C	0:00:40	37
		55 °C	0:00:40	
		72 °C	0:00:60	
		72 °C	0:05:00	1
	846	95 °C	0:04:00	1
		94 °C	0:00:40	37
		56 °C	0:00:40	
		72 °C	0:00:60	
		72 °C	0:05:00	1
	811	95 °C	0:05:00	1
		94 °C	0:00:30	30
		53 °C	0:00:40	
		72 °C	0:01:15	
		72 °C	0:05:00	1
<i>A. hidalguensis</i>	853	95 °C	0:04:00	1
		93 °C	0:00:45	37
		56.1 °C	0:00:45	
		71 °C	0:01:15	
		72 °C	0:05:00	1
	846	95 °C	0:04:00	1
		93 °C	0:00:45	37
		56 °C	0:00:50	
		71.5 °C	0:01:15	
		72 °C	0:05:00	1
	811	95 °C	0:05:00	1
		92 °C	0:00:30	36
		52.1 °C	0:00:40	
		71.5 °C	0:01:15	
		72 °C	0:05:00	1
<i>A. xylonacantha</i>	853	95 °C	0:05:00	1
		94 °C	0:00:40	37
		56.3 °C	0:00:40	
		72 °C	0:00:60	
		72 °C	0:05:00	1
	846	95 °C	0:04:00	1
		94 °C	0:00:40	37
		56 °C	0:00:40	
		72 °C	0:00:60	
		72 °C	0:05:00	1
	811	95 °C	0:05:00	1
		94 °C	0:00:30	30
		52.1 °C	0:00:40	
		72 °C	0:01:15	
		72 °C	0:05:00	1

Programas del termociclador para la amplificación de ISSRs (cont.)

Especie	Iniciador	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos
<i>A. celsii</i>	853	95 °C	0:04:00	1
		94 °C	0:00:40	37
		56.1 °C	0:00:40	
		71 °C	0:00:60	
		72 °C	0:05:00	1
	846	95 °C	0:04:00	1
		95 °C	0:00:35	37
		56.1 °C	0:00:50	
		72 °C	0:00:50	
	811	72 °C	0:05:00	1
		95 °C	0:05:00	1
		93 °C	0:00:45	36
		53 °C	0:00:60	
70 °C	0:00:60			
72 °C	0:05:00	1		
<i>A. striata</i>	853	95 °C	0:04:00	1
		94 °C	0:00:40	37
		55.5 °C	0:00:40	
		72 °C	0:00:60	
		72 °C	0:05:00	1
	846	95 °C	0:04:00	1
		94 °C	0:00:30	37
		53.5 °C	0:00:40	
		72 °C	0:01:00	
	811	72 °C	0:05:00	1
		95 °C	0:05:00	1
		94 °C	0:00:40	36
		55.5 °C	0:00:40	
72 °C	0:00:50			
72 °C	0:05:00	1		

APÉNDICE 2. Métodos de análisis genético

I. Cálculo de frecuencias alélicas con marcadores dominantes y medidas de diversidad genética dentro de las poblaciones

a) Conteo directo

Según el principio de Hardy-Weinberg, la frecuencia del alelo nulo se puede obtener a partir de la raíz cuadrada de la proporción de individuos homocigos recesivos observados. Para los marcadores dominantes como los ISSRs el homocigo recesivo es la ausencia de una banda. Si se considera que (x) es la frecuencia de homocigos recesivos (q^2), entonces la frecuencia del alelo recesivo (q) es igual a:

$$q = \sqrt{x} \quad \text{Ec. 1}$$

y la frecuencia del alelo dominante es:

$$p = 1 - q \quad \text{Ec. 2}$$

La heterocigosis esperada en un locus particular para la población en equilibrio es:

$$H_E = 2pq \quad \text{Ec. 3}$$

o bien,

$$H_E = 1 - \sum p_i^2 \quad \text{Ec. 4}$$

donde p^2 es la frecuencia del genotipo homocigo para el alelo i (Nei, 1973).

Posteriormente, Nei (1978) propone una medida de heterocigosis no sesgada (H_S), como se describe a continuación:

$$h = \frac{2n(1 - \sum p_i^2)}{2n - 1} \quad \text{Ec. 5}$$

para cada locus, y para todos los loci:

$$H_S = \sum_{k=1}^r \frac{h_k}{r} \quad \text{Ec. 6}$$

donde h_k es el valor de h para el k_{esimo} locus, y r el número de loci. Aquí n puede variar para cada locus.

b) Corrección de Lynch y Milligan (1994)

El procedimiento descrito en la sección a) genera desviaciones estadísticas, por eso Lynch y Milligan hicieron una corrección que es la más usada actualmente para análisis de marcadores dominantes. Usando esta corrección, la heterocigosis esperada de un locus se calcula como:

$$H_E = 2p(1-q) + 2Var(q) \quad \text{Ec. 7}$$

donde

$$Var(q) = \frac{1-x}{4N} \quad \text{Ec. 8}$$

$$q = \sqrt{x} \left(1 - \frac{var(x)}{8x^2}\right)^{-1} \quad \text{Ec. 9}$$

$$Var(x) = \frac{x(1-x)}{N} \quad \text{Ec. 10}$$

donde N es el número de individuos en la muestra.

Cuando se analizan simultáneamente varios loci, la heterocigosis estimada en la población es:

$$\bar{H} = \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m H_j \quad \text{Ec. 11}$$

donde H_j es la heterocigosis del locus j , y m es el número total de loci.

c) Estimador bayesiano de frecuencias alélicas (I)

El ajuste de Lynch y Milligan, sin embargo, favorece aquellos loci con alta frecuencias de alelos nulos, y subestima la frecuencia de las bandas. Al quitar a ciertos loci, este procedimiento depende de los tamaños de muestra, por lo que la variación genética y las distancias están sesgadas (Zhivotovsky, 1999). La alternativa propuesta según el modelo de Zhivotovsky (1999), es que se consideren n individuos diploides de una población en equilibrio de Hardy-Weinberg para cierto locus, de modo que las frecuencias de los alelos nulos son q y de los homócigos $R=q^2$. Dada la frecuencia alélica q , la probabilidad de que ocurra un homócigo nulo m es:

$$\Pr(m|q) = \binom{n}{m} R^m (1-R)^{n-m} = \binom{n}{m} q^{2m} (1-q^2)^{n-m} \quad \text{Ec. 12}$$

Dada la distribución prior $Pr(q)$, la probabilidad posterior de q dado m es:

$$\Pr(q|m) = \frac{\Pr(m|q)\Pr(q)}{\int_0^1 \Pr(m|q)\Pr(q)dq} \quad \text{Ec. 13}$$

El estimador bayesiano \hat{q} de frecuencia desconocida q es la esperanza de q con respecto a $\Pr(q|m)$:

$$\hat{q} = \int_0^1 \Pr(q|m)q dq = \frac{\int_0^1 \Pr(m|q)\Pr(q)q dq}{\int_0^1 \Pr(m|q)\Pr(q)dq} \quad \text{Ec. 14}$$

La distribución prior para R , que se usa es una distribución beta con parámetros positivos a y b :

$$\Pr(R) = \frac{R^{a-1}(1-R)^{b-1}}{B(a,b)} \quad \text{Ec. 15}$$

donde

$$B(a,b) = \int_0^1 R^{a-1}(1-R)^{b-1} dR \quad \text{Ec. 16}$$

Cuando $a=0.5$ y $b=1$, la distribución prior de la frecuencia alélica q es uniforme y el estimador es:

$$\hat{q} = \frac{B(m+a+0.5, n-m+b)}{B(m+a, n-m+b)} \quad \text{Ec. 17}$$

y el error estándar es:

$$s_{\hat{q}}^2 = \frac{B(m+a+1, n-m+b)}{B(m+a, n-m+b)} - \hat{q}^2 \quad \text{Ec. 18}$$

d) Estimador bayesiano de frecuencias alélicas (II) (Holsinger, 1999)

Independientemente a la propuesta de Zhivotovsky (1999), Holsinger (1999) propone una alternativa para el cálculo de las frecuencias alélicas con marcadores bialélicos, como se describe a continuación:

Si $\Phi(p_{ik})$ es la probabilidad asignada a la frecuencia del alelo A_i en la población k antes de coleccionar los datos (probabilidad prior para p_{ik}) entonces la probabilidad posterior

$$\alpha \prod_{i=1}^I \prod_{k=1}^K \binom{n_{ik}}{a_{ik}} p_{ik}^{a_{ik}} (1-p_{ik})^{n_{ik}-a_{ik}} \phi(p_{ik}) \quad \text{Ec. 19}$$

Los estimadores puntuales de p_{ik} se pueden derivar a partir de la distribución posterior. Si no se tiene información previa acerca de las frecuencias alélicas, se usa una distribución uniforme para $\Phi(p_{ik})$ y se usa la media de esta distribución como estimador puntual de p_{ik} según la fórmula:

$$\hat{p}_{ik} = \frac{a_{ik} + 1}{n_{ik} + 2} \quad \text{Ec. 20}$$

e) Índice de diversidad de Shannon

Para cada población el índice de Shannon se calcula para cada locus de ISSR de la siguiente manera:

$$H'_j = -\sum p_i \log_2 p_i \quad \text{Ec. 21}$$

donde p_i es la frecuencia de la presencia o ausencia de la banda en esa población.

La diversidad promedio para todas las poblaciones se calcula como:

$$H'_{pop} = \frac{1}{n} \sum H'_j \quad \text{Ec. 22}$$

donde n es el número de poblaciones.

La diversidad por especie se calcula para cada locus como:

$$H'_{sp} = -\sum p_s \log_2 p_s \quad \text{Ec. 23}$$

donde p_s es la frecuencia de la presencia o ausencia de la banda en toda la muestra.

II. Estructura genética

a) Estadísticos F de Wright:

Según la definición original de Wright (1951), los estadísticos F están relacionados de la siguiente manera:

$$(1 - F_{IS})(1 - F_{ST}) = (1 - F_{IT}) \quad \text{Ec. 24}$$

o bien,

$$F_{ST} = \frac{F_{IT} - F_{IS}}{1 - F_{IS}} \quad \text{Ec. 25}$$

b) Estadísticos F de Wright calculados a partir de la heterocigosis (Nei, 1973):

H_I = heterocigosis promedio de todos los alelos en un individuo

H_S = heterocigosis que podría encontrarse en una subpoblación panmíctica; $H_S = 2p_iq_i$ para una subpoblación con frecuencia alélica p_i .

H_T = heterocigosis que se encontraría si todas las subpoblaciones fueran panmícticas, si la frecuencia alélica promedio entre las subpoblaciones es p_0 , entonces,

H_T es igual a $2p_0q_0$

$$H_I = \sum_{i=1}^k \frac{H_i}{k} \quad \text{Ec. 26}$$

$$H_S = 1 - \sum_{i=1}^h p_{i,s}^2 \quad \text{Ec. 27}$$

$$H_T = 1 - \sum_{i=1}^k \bar{p}_i^2 \quad \text{Ec. 28}$$

c) Corrección de Nei y Chesser (1983)

Las frecuencias alélicas y genotípicas de las que se han calculado los índices F son variables al azar, si el número de subpoblaciones y sus tamaños son finitos, de manera que es necesario hacer una corrección cuando las frecuencias alélicas se estiman de muestras poblacionales, esta corrección fue propuesta por Nei y Chesser (1983).

$$\hat{H}_0 = 1 - \sum_{k=1}^d \sum_{r=1}^r w_k \hat{p}_{ii} \quad \text{Ec. 29}$$

$$\hat{H}_S = \frac{\tilde{n}}{\tilde{n} - 1} \left(1 - \sum_{i=1}^d \sum_{k=1}^r w_k \hat{p}_{ki}^2 \right)^2 - \frac{\hat{H}_0}{2\tilde{n}d} \quad \text{Ec. 30}$$

$$\hat{H}_T = 1 - \sum_{i=1}^r \left(\sum_{k=1}^d w_k \hat{p}_{ki} \right)^2 + \frac{\hat{H}_S}{\tilde{n}d} - \frac{\hat{H}_0}{2\tilde{n}d} \quad \text{Ec. 31}$$

donde \tilde{n} es la media armónica de los tamaños de muestra.

d) Cálculo de G_{ST} . G_{ST} se calcula a partir de la diversidad genética de la población total

(H_T) y la diversidad genética dentro de cada subpoblación (H_S):

$$G_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T} = \frac{D_{ST}}{H_T} \quad \text{Ec. 32}$$

o bien:

$$G_{ST} = 1 - \frac{H_S}{H_T} \quad \text{Ec. 33}$$

donde D_{ST} es la diversidad genética total distribuida entre las poblaciones. H_S es el promedio de H_E calculado para todas las subpoblaciones, y H_T es la proporción de loci heterocigos esperada por individuo (Ec. 4).

e) Repartición de la F según el análisis de varianza.

Para un polimorfismo de dos alelos: A (con frecuencia p) y a (con frecuencia $q=1-p$), se asigna de manera arbitraria los valores $x=1$ para el alelo A y $x=0$ para el alelo a . La esperanza de x es la frecuencia de p y la varianza total es $p(1-p)$. La varianza de $x(\sigma^2)$ se reparte de la siguiente manera:

$$x_{ijk} = p + a_k + b_{ik} + w_{ijk} \quad \text{Ec. 34}$$

donde x_{ijk} es el valor (1 o 0) para el j ésimo alelo en el i ésimo individuo de la k ésima subpoblación. En términos del análisis de varianza, estos son efectos al azar con varianzas asociadas σ_a^2 , σ_b^2 y σ_w^2 , respectivamente. Los estadísticos F se pueden describir usando estos componentes de la varianza de la siguiente manera:

$$\sigma_w^2 = (1 - F_{IT})\sigma^2 \quad \text{Ec. 35}$$

$$\sigma_b^2 = (F_{IT} - F_{ST})\sigma^2 \quad \text{Ec. 36}$$

$$\sigma_a^2 = F_{ST}\sigma^2 \quad \text{Ec. 37}$$

De esta manera, los estadísticos F se calculan como:

$$F_{IT} = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_b^2}{\sigma^2} \quad \text{Ec. 38}$$

$$F_{ST} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma^2} \quad \text{Ec. 39}$$

$$F_{IS} = \frac{\sigma_b^2}{\sigma_b^2 + \sigma_w^2} \quad \text{Ec. 40}$$

Estos componentes se calculan en un análisis de varianza como el mostrado en la Tabla 12.

Tabla 21. Análisis de varianza de las frecuencias alélicas en una población subdividida

<i>Origen de la variación</i>	<i>g.l.</i>	<i>Cuadrado medio</i>	<i>Cuadrado medio esperado</i>
Entre poblaciones	$M-1$	MS_a	$\sigma_w^2 + 2\sigma_b^2 + 2N\sigma_a^2$
Entre individuos dentro de subpoblaciones	$M(N-1)$	MS_b	$\sigma_w^2 + 2\sigma_b^2$
Dentro de individuos	N	MS_w	σ_w^2

f) Modelo bayesiano de estructura genética

El análisis jerárquico de tipo bayesiano que proponen Holsinger y colaboradores, se describe a continuación:

La muestra consiste en datos de variación genética en K poblaciones para I loci, cada locus tiene dos alelos $A1$ y $A2$.

$\gamma_{A1,ik}$ Es la frecuencia del fenotipo dominante para el locus i en la población k

$n_{A1,ik}$ Es el número de fenotipos dominantes

$n_{A2,ik}$ Es el número de fenotipos recesivos en la muestra para el locus i en la población k

Si asumimos que los fenotipos fueron muestreados al azar, entonces la probabilidad de la muestra es:

$$P(n|\gamma_{A1}) \propto \prod_{i=1}^I \prod_{a=1}^K \gamma_{a1,ik}^{n_{a1,ik}} \gamma_{a2,ik}^{n_{a2,ik}} \quad \text{Ec. 41}$$

en donde:

$$\gamma_{A1,ik} = p_{ik}^2 + fp_{ik}(1-p_{ik}) + 2p_{ik}(1-p_{ik})(1-f)$$

$$\gamma_{A2,ik} = 1 - \gamma_{A1,ik}$$

Se asume que para marcadores neutrales, la distribución de frecuencias alélicas es una distribución Beta. El parámetro equivalente a F_{ST} es θ^B .

Los parámetros de la distribución Beta que se emplean son:

$$\alpha_i = \left(\frac{1 - \theta^B}{\theta^B} \right) \pi_i \quad \text{Ec. 42}$$

$$\beta_i = \left(\frac{1 - \theta^B}{\theta^B} \right) (1 - \pi_i) \quad \text{Ec. 43}$$

En el análisis bayesiano que se propone se pueden especificar diferentes distribuciones priores para π_i , f y θ^B . Entonces, si $P(\pi_i)$ es la distribución prior para π_i , $P(f)$ es la distribución prior para f y $P(\theta^B)$ es la distribución prior para θ^B , la distribución posterior para p_{ik} , está dada por:

$$(p, \pi, \theta^B, f | n_{A1}, n_{A2}) \propto \left\{ \prod_{i=1}^I \left\{ \prod_{k=1}^K \gamma_{A1,ik}^{n_{A1,ik}} \gamma_{A2,ik}^{n_{A2,ik}} P(x_{ik} | \pi, \theta^B, f) \right\} P(\pi_i) \right\} P(\theta^B) P(f) \quad \text{Ec. 44}$$

Las soluciones analíticas para estas distribuciones posteriores no pueden calcularse. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, los autores emplean métodos MCMC para encontrar las soluciones de estas distribuciones.

g) Análisis de varianza molecular (AMOVA)

El análisis de varianza molecular, es similar a otros métodos de análisis de varianza en las frecuencias alélicas, pero analiza el número de diferencias en los haplotipos

(Excoffier et al., 1992). Al definir grupos de poblaciones en este análisis se está probando una estructura genética en particular. Este análisis jerárquico de la varianza divide la varianza total en componentes de covarianza debido a las diferencias entre individuos y entre poblaciones.

Los estadísticos Φ reflejan la correlación entre la diversidad de haplotipos en diferentes niveles jerárquicos de subdivisión:

Φ_{ST} es la correlación de haplotipos al azar dentro de las poblaciones, relativo a los pares de haplotipos tomados de toda la especie.

Φ_{CT} es la correlación de haplotipos al azar dentro de un grupo de poblaciones, relativo a los pares de haplotipos tomados de toda la especie.

Φ_{SC} es la correlación de la diversidad molecular de haplotipos al azar dentro de las poblaciones, relativo a los pares de haplotipos tomados de la región.

Siguiendo la analogía con la partición de la varianza de Cockerham, se calculan de la siguiente manera:

$$\Phi_{ST} = \frac{\sigma_a^2 + \sigma_b^2}{\sigma^2} \quad \text{Ec. 45}$$

$$\Phi_{CT} = \frac{\sigma_a^2}{\sigma^2} \quad \text{Ec. 46}$$

$$\Phi_{SC} = \frac{\sigma_b^2}{\sigma_b^2 + \sigma_c^2} \quad \text{Ec. 47}$$

h) Repartición de la variación empleando el índice de Shannon.

Para cada población el componente de la diversidad dentro de las poblaciones se calcula como:

$$\frac{H'_{pop}}{H'_{sp}} \quad \text{Ec. 48}$$

y el componente entre poblaciones:

$$\frac{(H'_{sp} - H'_{pop})}{H'_{sp}} \quad \text{Ec. 49}$$

III. Distancias genéticas

Para calcular la distancia estándar de Nei (1972) para un locus con n alelos se calcula primero la identidad (I) de la siguiente manera:

$$I = \frac{J_{xy}}{(J_x J_y)^{1/2}} \quad \text{Ec. 50}$$

donde:

$$J_{xy} = \sum_{i=1}^n p_{ix} p_{iy} \quad \text{Ec. 51}$$

$$J_x = \sum_{i=1}^n p_{ix}^2 \quad \text{Ec. 52}$$

$$J_y = \sum_{i=1}^n p_{iy}^2 \quad \text{Ec. 53}$$

y p_{ix} y p_{iy} son las frecuencias del alelo i en las poblaciones x y y .

La distancia genética (D) entre las dos poblaciones es:

$$D = -\ln(I) \quad \text{Ec. 54}$$

Para varios loci se promedian los valores de J_{xy} , J_x y J_y de cada locus, para obtener los promedios: J'_{xy} , J'_x y J'_y , con los cuales se calcula la identidad promedio (I'), la distancia promedio para todos los loci es:

$$D' = -\ln(I') \quad \text{Ec. 55}$$

El estimador no sesgado de D (Nei, 1978) se recomienda cuando los tamaños poblacionales son menores de 50. Para obtenerlo, se hace la siguiente corrección a la estimación de J_x y J_y .

$$\hat{J}_x = \frac{2N_x \sum \hat{p}_i^2 - 1}{2N_x - 1} \quad \text{Ec. 56}$$

$$\hat{J}_y = \frac{2N_y \sum \hat{p}_i^2 - 1}{2N_y - 1} \quad \text{Ec. 57}$$

donde N_x y N_y son el tamaño de muestra y p_i la frecuencia del i ésimo alelo de la población x .

IV. Cálculo indirecto del flujo génico

El flujo génico (Nm = número de migrantes por generación) se calcula a partir de la F_{ST} de la siguiente manera:

$$Nm = \frac{1}{4} \left(\frac{1}{F_{ST}} - 1 \right) \alpha \quad \text{Ec. 58}$$

Donde $\alpha = \left(\frac{n}{n-1} \right)^2$, y es la corrección para el tamaño de muestra, y n es el número de poblaciones.

APÉNDICE 3. Información estadística adicional de los datos genéticos

I. Parámetros para seleccionar el modelo que mejor se ajusta en el análisis con estadística bayesiana.

<i>Especie</i>	<i>Modelo</i>	\bar{D}	\hat{D}	pD	DIC
<i>A. difformis</i>	Modelo completo	956.7930	867.2873	89.5057	1046.2987
	$f=0$	957.1462	871.3710	85.7752	1043.1087
	$\theta^b=0$	965.9438	885.7175	80.2262	1046.1700
	f libre	1001.4362	853.9517	147.4842	1148.9204
<i>A. hidalguensis</i>	Modelo completo	419.2510	349.6836	69.5674	488.8184
	$f=0$	418.1765	349.7659	68.4105	486.5870
	$\theta^b=0$	441.2634	368.9979	72.2655	513.5288
	f libre	429.7470	350.3949	79.3521	509.0991
<i>A. xylonacantha</i>	Modelo completo	1039.9323	944.4424	95.4898	1135.4221
	$f=0$	1039.4357	945.1193	94.3164	1133.7520
	$\theta^b=0$	1048.2883	962.2769	86.0114	1134.2997
	f libre	1083.4137	930.6441	152.7696	1236.1833
<i>A. celsii</i>	Modelo completo	870.5239	791.7743	78.7496	949.2735
	$f=0$	870.6151	792.1376	78.0927	949.0927
	$\theta^b=0$	869.1184	782.8229	86.2955	955.4140
	f libre	918.6170	781.5367	137.0802	1055.6972
<i>A. striata</i>	Modelo completo	984.5466	888.9174	95.6293	1080.1759
	$f=0$	984.2570	888.7215	95.5356	1079.7926
	$\theta^b=0$	1000.3884	908.1674	92.2210	1092.6094
	f libre	1025.0604	874.1611	150.899	1175.9598

LITERATURA CITADA

- Abrams, D. A. 1983. The theory of limiting similarity. *Annual Review of Ecology and Systematics* 14: 359-376.
- Abrams, P. A. 2001. The unified neutral theory of biodiversity and biogeography. *Nature* 412: 858-859.
- Addicott, J. F., J. L. Bronstein, y F. Kjellberg. 1990. Evolution of mutualistic life-cycles: yucca moths and fig wasps. En F. Gilbert [ed.], *Insect life cycles*, 143-161. Springer, New York.
- 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, UNAM, México, D. F.
- Aigner, P. A. 2001. Optimality modeling and fitness trade-offs: when should plants become pollinator specialists? *Oikos* 95: 177-184.
- Alvarez de Zayas, A. 1989. Distribución geográfica y posible origen de las Agavaceae. *Revista del Jardín Botánico Nacional* 10: 25-36.
- Ammiraju, J. S. S., B. B. Dholakia, D. K. Santra, H. Singh, M. D. Lagu, S. A. Tamhankar, H. S. Dhaliwal, V. S. Rao, V. S. Gupta, y P. K. Ranjekar. 2001. Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 726-732.
- Amos, W., y A. Balmford. 2001. When does conservation genetics matter? *Heredity* 87: 257-265.
- Arizaga, S., y E. Ezcurra. 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. R. 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: 1004-1010.
- _____. 2000b. Pollination ecology of *Agave macroacantha* (Agavaceae) in a Mexican tropical desert. II. The role of pollinators. *American Journal of Botany* 87: 1011-1017.
- Axelrod, D. I. 1983. Paleobotanical history of the western deserts. En S. G. Wells y D. R. Haragan [eds.], *Origin and evolution of deserts*, 113-129. University of New Mexico Press, Albuquerque, NM.
- Barot, S. 2004. Mechanisms promoting plant coexistence: can all the proposed processes be reconciled? *Oikos* 106: 185-192.
- Barraclough, T. G., y S. Nee. 2001. Phylogenetics and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 391-399.
- Barrett, S. C. H., y J. R. Kohn. 1991. Genetic and evolutionary consequences of small population size in plants: implications for conservation. En D. A. Falk y K. E. Holsinger [eds.], *Genetics and conservation of rare plants*, 3-30. Oxford University Press, Oxford.
- Bartish, I. V., N. Jeppsson, y H. Nybom. 1999. Population genetic structure in the dioecious pioneer plant species *Hippophae rhamnoides* investigated by random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Molecular Ecology* 8: 791-802.
- Bazzaz, F. A. 1987. Experimental studies on the evolution of niche in successional plant populations. En A. J. Gray, M. J. Crawley, y P. J. Edwards [eds.], *Colonization,*

- succession, and stability, 245–272. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Begon, M., J. L. Harper, y C. R. Townsend. 1996. Ecology: Individuals, populations and communities. Blackwell science, Oxford.
- Berlocher, S. H. 1998. Can sympatric speciation be proven from phylogenetic and biogeographic evidence? *En* D. J. Howard y S. H. Berlocher [eds.], *Endless forms: species and speciation*, 99-113. Oxford University Press, Oxford.
- Bevill, R. L., y S. M. Louda. 1999. Comparisons of related rare and common species in the study of plant rarity. *Conservation Biology* 13: 493-498.
- Blair, M. W., O. Panaud, y S. R. McCouch. 1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 98: 780-792.
- Bornet, B., C. Muller, F. Paulus, y M. Branchard. 2002a. Highly informative nature of inter simple sequence repeat (ISSR) sequences amplified using tri- and tetra-nucleotide primers from DNA of cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.). *Genome* 45: 890-896.
- Bornet, B., F. Goraguer, G. Joly, y M. Branchard. 2002b. Genetic diversity in European and Argentinian cultivated potatoes (*Solanum tuberosum* subsp. *tuberosum*) detected by inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Genome* 45: 481-484.
- Briones, O. 1994. Origen de los desiertos mexicanos. *Ciencia* 45: 263-279.
- Brown, J. H. 1975. Geographical ecology of desert rodents. *En* M. L. Cody y J. R. Diamond [eds.], *Ecology and evolution of communities*, 315-341. Belknap Press, Cambridge, MA.
- Bussell, J. D. 1999. The distribution of random amplified polymorphic DNA (RAPD) diversity amongst populations of *Isotoma petraea* (Lobeliaceae). *Molecular Ecology* 8: 775-789.
- Camacho, F. J., y A. Liston. 2001. Population structure and genetic diversity of *Botrychium pumicola* (Ophioglossaceae) based on inter-simple sequence repeats (ISSR). *American Journal of Botany* 88: 1065-1070.
- Campbell, D. R., N. M. Waser, y E. J. Meléndez-Ackerman. 1997. Analyzing pollinator-mediated selection in a plant hybrid zone: Hummingbird visitation patterns on three spatial scales. *American Naturalist* 149: 295-315.
- Challenger, A. 1998. Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México. Pasado, presente y futuro. CONABIO, Instituto de Biología-UNAM, Agrupación Sierra Madre S.C., México.
- Charlesworth, D., y B. Charlesworth. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 237-268.
- Chesson, P. 1991. A need for niches? *Trends in Ecology and Evolution* 6: 26-28.
- _____. 2000. Mechanisms of maintenance of species diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31: 343–366.
- Cockerham, C., y B. S. Weir. 1986. Estimation of inbreeding parameters in stratified populations. *Annals of Human Genetics* 50: 271-281.
- Cockerham, C. C. 1969. Variance of gene frequencies. *Evolution* 23: 72-83.
- _____. 1973. Analyses of gene frequencies. *Genetics* 74: 679-700.
- Colunga-GarcíaMarín, P., J. Coello-Coello, L. E. Eguiarte, y D. Piñero. 1999. Isozymatic variation and phylogenetic relationships between henequén (*Agave fourcroydes*) and its wild ancestor *A. angustifolia* (Agavaceae). *American Journal of Botany* 86: 115-123.
- Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. 2003. Programa de manejo reserve de la Biosfera Barranca de Metztitlán, México, D. F.

- Crepet, W. L. 1983. The role of insect pollination in the evolution of angiosperms. *En* L. A. Real [ed.], *Pollination Biology*, 29-50. Academic Press, Orlando, Florida.
- Cresswell, J. E., y C. Galen. 1991. Frequency-dependent selection and adaptive surfaces for floral trait combinations - The pollination of *Polemonium viscosum*. *American Naturalist* 138: 1342-1353.
- Culley, T. M., y A. D. Wolfe. 2001. Population genetic structure of the cleistogamous plant species *Viola pubescens* Aiton (Violaceae), as indicated by allozyme and ISSR molecular markers. *Heredity* 86: 545-556.
- Darwin, C. 1859. On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life. John Murray, London.
- _____. 1862. On the various contrivances by which British and foreign orchids are fertilized. Murray, London.
- Dawson, I. K., A. J. Simons, R. Waugh, y W. Powell. 1995. Diversity and genetic differentiation among subpopulations of *Gliricidia sepium* revealed by PCR-based assays. *Heredity* 74: 10-18.
- Doebeli, M., y U. Dieckmann. 2000. Evolutionary branching and sympatric speciation caused by different types of ecological interactions. *American Naturalist* 156: S77-S101.
- _____. 2003. Speciation along environmental gradients. *Nature* 421: 259-264.
- Doyle, J. J., y J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19: 11-15.
- 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.
- Esselman, E. J., L. Jianqiang, D. J. Crawford, J. L. Windus, y A. D. Wolfe. 1999. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecology* 8: 443-451.
- Excoffier, E., P. E. Smouse, y J. M. 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* D. J. Balding, M. Bishop, y C. Cannings [eds.], *Handbook of Statistical Genetics*, 271-307. John Wiley and Sons.
- Faegri, K., y L. van der Pijl. 1966. The principles of pollination ecology. Pergamon, Oxford.
- Fang, D. Q., y M. L. Roose. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 408-417.
- Fernandez, M. E., A. M. Figueiras, y C. Benito. 2002. The use of ISSR and RAPD markers for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity among barley cultivars with known origin. *Theoretical and Applied Genetics* 104: 845-851.
- Fiedler, P. L., y J. J. Ahouse. 1992. Hierarchies of cause: toward an understanding of rarity in vascular plant species. *En* P. L. Fiedler y S. K. Jain [eds.], *Conservation biology: the theory and practice on nature conservation, preservation and management*, 23-47. Chapman and Hall, Londres.
- Fleming, T. H., y J. N. Holland. 1998. The evolution of obligate pollination mutualisms: senita cactus and senita moth. *Oecologia* 114: 368-375.

- Frankham, R. 1995. Conservation genetics. *Annual Review of Genetics* 29: 305–327.
- Frankham, R., J. D. Ballou, y D. A. Briscoe. 2002. Introduction to conservation genetics, Cambridge.
- Fulton, R. E. 1983. Reproductive ecology of *Agave deserti* Engelm (Agavaceae) in the absence of coevolved bat pollinators. M.S. thesis, Fullerton,, California State University.
- Futuyma, D. J. 1998. Evolutionary Biology. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts.
- Galen, C. 1996. Rates of floral evolution: adaptation to bumblebee pollination in an alpine wildflower, *Polemonium viscosum*. *Evolution* 50: 120-125.
- Galván, R., y L. Hernández-Sandoval. 2002. *Agave garciae-mendozae*, a new species from central Mexico. *Cactus and Succulent Journal* 74: 188-191.
- García, E. 1973. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Koeppen. Instituto de Geografía, UNAM, México.
- García-Mendoza, A. 1995. Riqueza y endemismos de la familia Agavaceae en Mexico. En E. Linares, P. Dávila, F. Ching, R. Bye, y T. Elias [eds.], Conservación de plantas en peligro de extinción: Diferentes enfoques, 59-83. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F.
- _____. 2002. Distribution of *Agave* (Agavaceae) in Mexico. *Cactus and Succulent Journal* 74: 177-186.
- Gaston, K. J. 1994. Rarity. Chapman and Hall, London.
- Gaston, K. J., y S. L. Chown. 2005. Neutrality and the niche. *Functional Ecology* 19: 1-6.
- Gaudeul, M., P. Taberlet, y I. Till-Bottraud. 2000. Genetic diversity in an endangered alpine plant, *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae), inferred from amplified fragment length polymorphism markers. *Molecular Ecology* 9: 1625-1637.
- Ge, X. J., Y. Yu, N. X. Zhao, H. S. Chen, y W. Q. Qi. 2003. Genetic variation in the endangered Inner Mongolia endemic shrub *Tetraena mongolica* Maxim. (Zygophyllaceae). *Biological Conservation* 111: 427-434.
- Ge, X. J., L. B. Zhang, Y. M. Yuan, G. Hao, y T. Y. Chiang. 2005a. Strong genetic differentiation of the East-Himalayan *Megacodon stylophorus* (Gentianaceae) detected by Inter-Simple Sequence Repeats (ISSR). *Biodiversity and Conservation* 14: 849-861.
- Ge, X. J., Y. Yu, Y. M. Yuan, H. W. Huang, y C. Yan. 2005b. Genetic diversity and geographic differentiation in endangered *Ammopiptanthus* (Leguminosae) populations in desert regions of northwest China as revealed by ISSR analysis. *Annals of Botany* 95: 843-851.
- Gentry, H. S. 1982. Agaves of continental North America. The University of Arizona Press, Arizona.
- Gil, K., M. González, M. Martínez, J. Simpson, y G. Vandemark. 2001. Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. Azul using RAPD markers. *Euphytica* 119: 335-341.
- Gil-Vega, K., C. Diaz, A. Nava-Cedillo, y J. Simpson. 2006. AFLP analysis of *Agave tequilana* varieties. *Plant Science* 170: 904-909.
- Gitzendanner, M. A., y P. S. Soltis. 2000. Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *American Journal of Botany* 87: 783-792.
- Gómez, J. M. 2002. Generalizations in the interactions between plants and pollinators. *Revista Chilena de Historia Natural* 75: 105-116.
- González, A. 2004. Biología reproductiva y genética de poblaciones del *Agave garciae-mendozae*. Tesis de Licenciatura, UNAM, México, D. F.

- González, F., y P. Hiriart. 1978. La vegetación de la cuenca del río Metztitlán. Resúmenes de los trabajos del VII Congreso mexicano de Botánica, México: 88-89.
- Grubb, P. J. 1977. The maintenance of species-richness in plant communities: the importance of the regeneration niche. *Biological Reviews* 52: 107-145.
- Halldén, C., M. Hansen, N. O. Nilsson, y A. Hjerdin. 1996. Competition as a source of errors in RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 1185-1192.
- Hamrick, J. L., y M. 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, 43-63. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- _____. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. En J. Silvertown, M. Franco, y J. L. Harper [eds.], Plant life histories, ecology, phylogeny and evolution. The Royal Society and Cambridge University Press, Cambridge.
- Hamrick, J. L., M. J. W. Godt, D. A. Murawski, y M. D. Loveless. 1991. Correlations between species traits and allozyme diversity: implications for conservation biology. En D. A. Falk y K. E. Holsinger [eds.], Genetics and conservation of rare plants, 75-86. Oxford University Press, Oxford.
- Hartl, D. L., y A. G. Clark. 1989. Principles of population genetics. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- _____. 1997. Principles of population genetics. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Hedrick, P. W. 1995. Gene flow and genetic restoration: The Florida Panther as a case study. *Conservation Biology* 9: 996-1007.
- _____. 2000. Genetics of populations. Jones and Bartlett Pub, Mass.
- _____. 2001. Conservation genetics: where are we now? *Trends in Ecology and Evolution* 16: 629-636.
- Herrera, C. M. 1988. Variation in mutualisms: The spatio-temporal mosaic of a pollinator assemblage. *Biological Journal of the Linnean Society* 35: 95-125.
- _____. 1996. Floral traits and plant adaptation to insect pollinators: a devil's advocate approach. En D. G. Lloyd y S. C. H. Barrett [eds.], Floral biology. Chapman and Hall, New York.
- Holsinger, K. E. 1999. Analysis of genetic diversity in geographically structured populations: A Bayesian perspective. *Hereditas* 130: 245-255.
- Holsinger, K. E., y L. D. Gottlieb. 1991. Conservation of rare and endangered plants: principles and prospects. En D. A. Falk y K. E. Holsinger [eds.], Genetics and conservation of rare plants, 195-208. Oxford University Press, Oxford.
- Holsinger, K. E., y P. O. Lewis. 2003. Hickory: A package for the analysis of population genetic data. Ver. 0.8. University of Connecticut, Storrs, CT.
- Holsinger, K. E., y L. E. Wallace. 2004. Bayesian approaches for the analysis of population genetic structure: an example from *Platanthera leucophaea* (Orchidaceae). *Molecular Ecology* 13: 887-894.
- Holsinger, K. E., P. O. Lewis, y D. K. Dey. 2002. A Bayesian approach to inferring population structure from dominant markers. *Molecular Ecology* 11: 1157-1164.
- Howell, D. 1972. Physiological adaptations in the syndrome of chiropterophily with emphasis on the bat *Leptonycteris* Lydekker. Ph.D. Dissertation, University of Arizona, Tucson.
- Howell, D., y B. S. Roth. 1981. Sexual reproduction in agaves: the benefits of bats, the cost of semelparous advertising. *Ecology* 62: 1-7.

- Hubbell, S. P. 2001. The unified neutral theory of Biodiversity and Biogeography. Princeton University Press, Princeton.
- _____. 2003. Modes of speciation and the lifespans of species under neutrality: a response to the comment of Robert E. Ricklefs. *Oikos* 100: 193-199.
- Husband, B. C., y H. A. Sabara. 2004. Reproductive isolation between autotetraploids and their diploid progenitors in fireweed, *Chamerion angustifolium* (Onagraceae). *New Phytologist* 161: 703-713.
- Hutchinson, G. E. 1957. Concluding remarks. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 22: 415-427.
- INEGI, S. 1992. Síntesis geográfica del estado de Hidalgo, Aguascalientes, México.
- Isabel, N., J. Beaulieu, P. Theriault, y J. Bousquet. 1999. Direct evidence for biased gene diversity estimates from dominant random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprints. *Molecular Ecology* 8: 477-483.
- Janzen, D. H. 1980. When is it coevolution? *Evolution* 34: 611-612.
- Johnson, S. D., y K. E. Steiner. 2000. Generalization versus specialization in plant pollination systems. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 140-143.
- Johnson, S. D., H. P. Linder, y K. E. Steiner. 1998. Phylogeny and radiation of pollination systems in *Disa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* 85: 402-411.
- 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 *Oryza*. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 1311-1320.
- Kantety, R. V., X. Zeng, J. L. Bennetzen, y B. E. Zehr. 1995. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Molecular Breeding* 1: 365-373.
- Karron, J. D. 1987. A comparison of levels of genetic polymorphism and self-compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners. *Evolutionary Ecology* 1: 47-58.
- Kearns, C. A., D. W. Inouye, y N. M. Waser. 1998. Endangered mutualisms: The conservation of plant-animal interactions. *Annual Review of Ecology and Systematics* 29: 83-112.
- Kochieva, E. Z., N. N. Ryzhova, I. A. Khrapalova, y V. A. Pukhalskyi. 2002. Genetic diversity and phylogenetic relationships in the genus *Lycopersicon* (Tourn.) Mill. as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis. *Russian Journal of Genetics* 38: 958-966.
- Krauss, S. L. 2000. Accurate gene diversity estimates from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Molecular Ecology* 9: 1241-1245.
- Kruckeberg, A. R., y D. Rabinowitz. 1985. Biological aspects of endemism in higher plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 447-479.
- 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, New York.
- Kuban, J. F., J. Lawley, y R. L. Neill. 1983. The partitioning of flowering century plants by black-chinned and lucifer hummingbirds. *Southwestern Naturalist* 28: 143-148.
- Lande, R. 1995. Mutation and conservation. *Conservation Biology* 9: 782-791.

- Lande, R., y G. F. Barrowclough. 1987. Effective population size, genetic variation, and their use in populations management. *En* M. Soulé [ed.], *Viable populations for conservation*, 87-123. Cambridge University Press, Cambridge.
- Lavorel, S., y P. Chesson. 1995. How species with different regeneration niches coexist in patchy habitats with local disturbances. *Oikos* 74: 103-114.
- Lewontin, R. 1972. The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology* 6: 381-398.
- Liu, B., y J. F. Wendel. 2001. Intersimple sequence repeat (ISSR) polymorphisms as a genetic marker system in cotton. *Molecular Ecology Notes* 1: 205-208.
- Lynch, M. 1993. The mutational meltdown in asexual populations. *Journal of Heredity* 84: 339-344.
- Lynch, M., y B. G. Milligan. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.
- Lynch, M., J. Conery, y R. Bürger. 1995. Mutational meltdowns in sexual populations. *Evolution* 49: 1067-1080.
- Maddison, D. R., D. Swofford, y W. P. Maddison. 1997. NEXUS: an extensible file format for systematic information. *Systematic Biology* 46: 590-621.
- Malécot, G. 1948. *Les Mathématiques de l'Hérédité*. Masson et Cie, Paris.
- Mariette, S., V. Le Corre, F. Austerlitz, y A. Kremer. 2002. Sampling within the genome for measuring within-population diversity: trade-offs between markers. *Molecular Ecology* 11: 1145-1156.
- Martinez-Palacios, A., L. E. Eguiarte, y G. R. Furnier. 1999. Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan Desert. *American Journal of Botany* 86: 1093-1098.
- Martínez-Palacios, A., L. E. Eguiarte, y G. Furnier. 1999. Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoria-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan desert. *American Journal of Botany* 86: 1093-1098.
- Massey, L. K., y J. L. Hamrick. 1998. Genetic diversity and population structure of *Yucca filamentosa* (Agavaceae). *American Journal of Botany* 85: 340-345.
- McGill, B. J. 2003. A test of the unified neutral theory of biodiversity. *Nature* 422: 881-885.
- McGlaughlin, M., K. Karoly, y T. Kaye. 2002. Genetic variation and its relationship to population size in reintroduced populations of pink sand verbena, *Abronia umbellata* subsp. *breviflora* (Nyctaginaceae). *Conservation Genetics*: 411-420.
- Mengistu, L. W., y C. G. Messersmith. 2002. Genetic diversity of kochia. *Weed Science* 50: 498-503.
- Miller, M. P. 1997. Tools for population genetic analyses (TFPGA). Ver.1.3. Northern Arizona University, Arizona, USA.
- Miranda, F., y E. Hernández X. 1963. Los tipos de vegetación de México y su clasificación. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 28: 29-179.
- 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: 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.
- Nagaraju, J., M. Kathirvel, R. R. Kumar, E. A. Siddiq, y S. E. Hasnain. 2002. Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 5836-5841.

- Navarro-Quezada, A., R. Gonzalez-Chauvet, 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: 238-292.
- _____. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70: 3321-3323.
- _____. 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics* 41: 225-233.
- _____. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- _____. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.
- Nei, M., y R. K. Chesser. 1983. Estimation of fixation indices and gene diversities. *Annals of Human Genetics* 47: 253-259.
- Nilsson, L. A. 1988. The evolution of flowers with deep corolla tubes. *Nature* 334: 147-149.
- Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13: 1143-1155.
- Nybom, 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: 93-114.
- O'Brien, S. J. 1994. A role for molecular genetics in biological conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 5748-5755.
- Ollerton, J. 1996. Reconciling ecological processes with phylogenetic patterns: the apparent paradox of plant-pollinator systems. *Journal of Ecology* 84: 767-769.
- Page, R. D., M., y E. C. Holmes. 1998. Molecular evolution. A phylogenetic approach. Blackwell Science, Oxford.
- Petit, R. J., A. Mousadik, y O. Ponds. 1998. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* 12: 844-855.
- Pianka, E. R. 1973. The structure of lizard communities. *Annual Review of Ecology and Systematics* 4: 53-74.
- _____. 1975. Niche relations of desert lizards. En M. L. Cody y J. M. Diamond [eds.], *Ecology and evolution of communities*, 292-314. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Primack, R. 2001. Problemas de las poblaciones pequeñas. En R. Primack, R. Rozzi, P. Feinsinger, R. Dirzo, y F. Massardo [eds.], *Fundamentos de conservación biológica*, 363-383. Fondo de cultura económica, México.
- Pujar, S., S. A. Tamhankar, V. S. Gupta, V. S. Rao, y P. K. Ranjekar. 2002. Diversity analysis of Indian tetraploid wheat using intersimple sequence repeat markers reveals their superiority over random amplified polymorphic DNA markers. *Biochemical Genetics* 40: 63-69.
- Rabinowitz, D. 1981. Seven forms of rarity. En H. Synge [ed.], *The biological aspects of rare plant conservation*, 205-217. Wiley, New York.
- Raymond, M., y F. Rousset. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280-1283.
- Ricklefs, R. E., y G. L. Miller. 2000. *Ecology*. W. H. Freeman and Company, New York.

- Rocha, M., A. Valera, y L. E. Eguiarte. 2005. Reproductive ecology of five sympatric *Agave Littaea* (Agavaceae) species in central Mexico. *American Journal of Botany* 92: 1330-1341.
- Rzedowski, J. 1968. Las principales zonas áridas de México y su vegetación. *Bios* 1: 4.
- _____. 1991. Diversidad y origen de la flora fanerogámica de México. *Acta Botánica Mexicanana* 14: 3-21.
- _____. 1994. Vegetación de México. Limusa, México, D. F.
- Saini, N., N. Jain, S. Jain, y R. K. Jain. 2004. Assessment of genetic diversity within and among Basmati and non-Basmati rice varieties using AFLP, ISSR and SSR markers. *Euphytica* 140: 133-146.
- Sánchez-Mejorada, H. 1978. Manual de campo de las cactáceas y suculentas de la Barranca de Metztitlán. Sociedad Mexicana de Cactología, Mexico.
- Schaal, B. A., D. A. Hayworth, K. M. Olsen, J. T. Rauscher, y W. A. Smith. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology* 7: 465-474.
- 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. W. 1983. Limits to specialization and coevolution in plant-animal mutualisms. En M. H. Nitecki [ed.], *Coevolution*, 67-110. The University of Chicago, Chicago.
- Schemske, D. W., y H. D. Bradshaw. 1999. Pollinator preference and the evolution of floral traits in monkeyflowers (*Mimulus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 11910-11915.
- Schemske, D. W., B. C. Husband, M. H. Ruckelshaus, C. Gooswillie, Y. M. Parker, y J. G. Bishop. 1994. Evaluating approaches to the conservation of arare and endangered plants. *Ecology* 75: 584-606.
- Schlotterer, C. 2004. The evolution of molecular markers - just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics* 5: 63-69.
- Schneider, S., D. Roessli, y E. Excoffier. 2000. Arlequin Version 2.0 A Software for Population Genetic Data Analysis. University of Geneva, Geneva.
- Schoener, T. W. 1974. Resource partitioning in ecological communities. *Science* 185: 27-39.
- _____. 1986. Overview: kinds of ecological communities -ecology becomes pluralistic. En J. Diamond y T. Case [eds.], *Community ecology*. Harper and Row, New York.
- Shannon, C. E., y W. Weaver. 1949. The mathematical theory of communication. The University of Illinois Press, Urbana.
- 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: 377-387.
- _____. 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: 700-706.
- Silvertown, J. 2004. Plant coexistence and the niche. *Trends in Ecology and Evolution* 19: 605-611.
- Slatkin, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of populations. *Science* 236: 787-792.
- Slauson, L. A. 2000. Pollination biology of two chiropterophilous agaves in Arizona. *American Journal of Botany* 87: 825-836.

- _____. 2001. Insights on the pollination biology of *Agave* (Agavaceae). *Haseltonia*: 10-23.
- Smith, J. F., y T. A. Bateman. 2002. Genetic differentiation of rare and common varieties of *Eriogonum shockleyi* (Polygonaceae) in Idaho using ISSR variability. *Western North American Naturalist* 62: 316-326.
- Sokal, R., y F. J. Rohlf. 1995. Biometry. W.H. Freeman and Co., New York.
- Spiegelhalter, D. J., N. G. Best, B. P. Carlin, y A. van der Linde. 2002. Bayesian measures of model complexity and fit. *Journal of the Royal Statistical Society Series B-Statistical Methodology* 64: 583-639.
- Stebbins, G. L. 1970. Adaptive radiation of reproductive characteristics in angiosperms: I. Pollination mechanisms. *Annual Review of Ecology and Systematics* 1: 307-326.
- _____. 1980. Rarity of plant species: a synthetic viewpoint. *Rhodora* 82: 77-86.
- Sutherland, S. D. 1987. Why hermaphroditic plants produce many more flowers than fruits: experimental tests with *Agave mckelveyana*. *Evolution* 41: 750-759.
- Szmidt, A. E., X.-R. Wang, y M.-Z. Lu. 1996. Empirical assessment of allozyme and RAPD variation in *Pinus sylvestris* (L.), using haploid tissue analysis. *Heredity* 76: 412-420.
- Tambutti, M. 2002. Diversidad del género *Agave* en México: una síntesis para su conservación. Tesis de licenciatura, UNAM, Mexico.
- Tautz, D., y M. Renz. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* 12: 4127-4138.
- Templeton, A. R. 1986. Coadaptation and outbreeding depression. En M. E. Soule [ed.], *Conservation biology: the science of scarcity and diversity*, 105-116. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Thompson, J. N. 1994. The coevolutionary process. The University of Chicago Press, Chicago.
- Tikunov, Y. M., L. I. Khrustaleva, y G. I. Karlov. 2003. Application of ISSR markers in the genus *Lycopersicon*. *Euphytica* 131: 71-80.
- Tokeshi, M. 1999. Species coexistence. Ecological and evolutionary perspectives. Blackwell Science, Cambridge, Reino Unido.
- Toledo, V. M., y M. J. Ordóñez. 1993. The biodiversity scenario of Mexico: A review of terrestrial habitats. En T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot, y J. Fa [eds.], *Biological diversity of Mexico: Origins and distribution*, 757-777. Oxford University Press, Nueva York.
- Trame, A. M., A. J. Coddington, y K. N. Paige. 1995. Field and genetic studies testing optimal outcrossing in *Agave schottii*, a long-lived clonal plant. *Oecologia* 104: 93-100.
- Tregenza, T., y R. K. Butlin. 1999. Speciation without isolation. *Nature* 400: 311-312.
- Tsumura, Y., K. Ohba, y S. H. Strauss. 1996. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theoretical and Applied Genetics* 93: 40-45.
- Turelli, M., N. H. Barton, y J. A. Coyne. 2001. Theory and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 330-343.
- Via, S. 2001. Sympatric speciation in animals: the ugly duckling grows up. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 381-390.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de 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, M. V. Price, N. M. Williams, y J. Ollerton. 1996. Generalization in pollination systems, and why it matters. *Ecology* 77: 1043-1060.
- Weir, B. S. 1996. Genetic Data Analysis II. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Weir, B. S., y C. Cockerham. 1984. Estimating F- Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Whitkus, R., M. de la Cruz, L. Mota-Bravo, y A. Gómez-Pompa. 1998. Genetic diversity and relationships of cacao (*Theobroma cacao* L.) in southern Mexico. *Theoretical and Applied Genetics* 96: 621-627.
- Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski, y S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- Wolfe, A. D. 2005. ISSR techniques for evolutionary biology. *Methods in enzymology* 395: 134-144.
- Wolfe, A. D., y A. Liston. 1998. Contribution of PCR-based methods to plant systematics and evolutionary biology. En D. E. Soltis, P. S. Soltis, y J. J. Doyle [eds.], *Molecular systematics of plants*, 43-86. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Wolfe, A. D., y C. P. Randle. 2001. Relationships within and among species of the holoparasitic genus *Hyobanche* (Orobanchaceae) inferred from ISSR banding patterns and nucleotide sequences. *Systematic Botany* 26: 120-130.
- Wolfe, A. D., J. Q. Y. Xiang, y S. R. Kephart. 1998. Assessing hybridization in natural populations of *Penstemon* (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat markers. *Molecular Ecology* 7: 1107-1125.
- Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28: 114-138.
- _____. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19: 395-420.
- _____. 1969. *Evolution and the genetics of populations. Volúmen II: The theory of gene frequencies.* The University of Chicago Press, Chicago.
- Wright, S. D. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics* 15: 395-420.
- Yeh, F. C., R.-C. Yang, y T. J. B. Boyle. 1999. Popgene: Microsoft Windows-Based Freeware for Population Genetic Analysis. Release 1.31. University of Alberta, Edmonton.
- Young, A. B., y H. D. Brown. 1996. Comparative population genetic structure of the rare woody shrub *Daviesia suaveolens* and its common congener *D. mimosoides*. *Conservation Biology* 10: 1220-1228.
- Zawko, G., S. L. Krauss, K. W. Dixon, y K. Sivasithamparam. 2001. Conservation genetics of the rare and endangered *Leucopogon obtectus* (Ericaceae). *Molecular Ecology* 10: 2389-2396.
- Zhivotovsky, L. A. 1999. Estimating population structure in diploids with multilocus dominant markers. *Molecular Ecology* 8: 907-913.
- Zietkiewicz, E., A. Rafalski, y D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored polimerase chain reactions amplification. *Genomics* 20: 176-183.