



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN ECOSISTEMAS

**Coevolución a nivel macroevolutivo entre *Ficus*
(Moraceae) y sus polinizadoras, las avispas
Agaonidae.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

ALEJANDRA SERRATO DÍAZ

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Alberto Ken Oyama Nakagawa

MÉXICO, D. F.

Agosto 2007



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.

Por supuesto...

...a César Daniel

Quiero agradecer a todas las personas que de muchas maneras me brindaron su tiempo, conocimientos, paciencia, apoyo y amistad durante la realización de esta tesis, en especial:

Al Dr. Ken Oyama, por haberme aceptado en su extraordinario grupo de trabajo, por su paciencia, consejos y apoyo, por permitirme entrar al fascinante mundo de *Ficus*. Muchas gracias Ken.

Al Dr. Daniel Piñero por haber formado parte de mi comité tutorial durante tanto tiempo y sobre todo con tanto compromiso.

Al Dr. Gerardo Pérez Ponce de León por haber aceptado formar parte de mi comité tutorial (a pesar de solo conocerme por correo electrónico) y posteriormente por el apoyo que me brindó y el espacio que me prestó para los tutorales.

A los Drs. Juan Fornoni, Esperanza Martínez, Pablo Vinuesa y Mauricio Quesada por formar parte del jurado de este trabajo.

A los Drs. Juan Núñez Farfán y Guillermo Ibarra Manríquez por haber formado parte de mi comité tutorial cuando estaba en el ahora extinto posgrado de Ecología y por el apoyo que me siguieron brindando durante todo el tiempo que estuve en este proyecto, muchas gracias a los dos.

Al M. en C. Miguel Ángel Pérez por su apoyo en la colecta de la mayoría de las muestras con un gran compromiso y entrega en el trabajo de campo. Miky, sobre todo, gracias por todo lo compartido en más de 15 años de amistad.

Al los Drs. Alfonso Valiente y Alejandro Casas por su asesoría y apoyo económico en la colecta realizada en el valle de Tehuacán-Cuicatlán.

Al Dr. Guillermo Ibarra por su ayuda en la colecta de Morelos y por compartir conmigo su amplio conocimiento del género *Ficus*.

A Xochitl, Jeny, Juan Carlos y señora Dolores, por ayudarme con la extracción de DNA de *Ficus*.

Al Dr. David Gernand que me ayudó de manera muy comprometida en el intento de amplificar la región de ITS y RPB2 de *Ficus*.

Al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biología por permitirme trabajar en sus instalaciones, donde conocí a tantas personas maravillosas, gracias también a todas ellas.

A la M. en C. Laura M. Márquez V. por su invaluable apoyo y asesoría en la amplificación de diferentes regiones de DNA de las especies de *Ficus* y por la secuenciación de éstas. Lau, sin tu ayuda y amistad no lo hubiera logrado, muchas gracias, te admiro y quiero mucho.

A Jeny Solange Sotuyo por haberme prestado muchos de los oligos usados en este trabajo, por su apoyo, asesoría y compañía, pero sobre todo por su amistad. Jeny te quiero mucho.

A Juan Carlos Montero por los oligos que me prestó y por compartir conmigo su tiempo y conocimiento.

Al Dr. Felipe Cruz García por enseñarme la técnica de AFLP, por su apoyo académico y personal, por darme un lugar en su laboratorio y por financiar en gran medida esta parte del proyecto. Gracias también a la Dra. Irma Bernal por el apoyo e interés durante esta estancia. Un agradecimiento especial a los alumnos del laboratorio 104 del edificio E de la facultad de Química, muchas gracias Lluvia, Valeria, Andrea, Javier Andrés, Yuridia, Gregorio, Grethel, Claudia, Vanesa, Adriana y Lety por haber estado conmigo en una etapa muy muy difícil de mi vida, los quiero.

A Efraín Tovar por su compañía en el auto exilio, por tantas pláticas de desahogo, por su gran apoyo con material de laboratorio y por su amistad.

Al Biól. Gumersindo Sánchez por su asesoramiento en técnicas de biología molecular, por el material que me prestó y por tantos momentos de alegría. Gracias Gume.

A Gloria Selene Serrato y a Alejandro Díaz por su incansable apoyo, asesoría y paciencia en la realización de los mapas.

Nuevamente a Alejandro Díaz por haberme prestado su computadora y libros, en verdad agradezco mucho tu apoyo en esos momentos.

También quiero agradecer a todos los profesores que me compartieron su pasión y entrega a la ciencia, en particular a la Dra. Luz Ma. Zamudio, Dr. Zenón Cano, Dr. A. Valiente y especialmente a los Drs. Alicia Negrón Mendoza y Ken Oyama.

A mis compañeros de generación, Alex, Ana, Derik, Eduardo, Juan, Noé, Pablo, Ricardo, Sergio, Toño, e incluyo a Alicia, gracias por todo lo que aprendí a su lado, por todos los momentos compartidos, por tanta risa, por su compromiso, su amistad, a todos los admiro y quiero muchísimo.

A Mary Santos, Pablo y Toño, Ken, Sofía y Oscar, gracias por las veces que me dieron alojamiento durante mis estancias en Morelia.

A Tony y René mil gracias por siempre estar.

Sofía Solórzano, gracias por tooodo lo compartido.

A Jessica, César, Fernando, Raúl, Rosalinda, René, Rodolfo y demás amigos del Instituto de Ecología gracias por el tiempo, conocimientos y consejos que compartieron conmigo.

Al Dr. F. Pedroche por su confianza, permisos y apoyo para concluir este trabajo.

A Bety, Amelia y Martha por incorporarme a su grupo de trabajo, por escucharme, por su tiempo, sus consejos y su amistad.

A Mónica Bonilla por su interés y sugerencias para terminar la tesis.

Marilú, Aurora y Bibiana gracias por su gran amistad y por las terapias.

César, gracias por darme tanto y tanto y tanto mas, por tu lucha, tu amor y por darme vida.

Papá, gracias por tu entrega, amor y respeto. Te quiero y extraño mucho.

Mamá, mil gracias por todo, por darme fuerza y escucharme, pero especialmente gracias por cuidar con tanto amor a mi hijo, sin tu incansable ayuda y paciencia no hubiera terminado. Te quiero mucho.

Rosy, gracias por darme dos de las alegrías más grandes de mi vida: tener una hermana mayor y ser tía (con todo lo que implican ambas cosas).

Goly, gracias por prestarme tu compu, por imprimirme tantos artículos, por revisar mi correo, por hacerme trámites, por cuidar a Dany, por alentarme incansablemente, por escucharme, por tu gran inteligencia, excelencia, entrega y compromiso. Te admiro y quiero muchísimo.

Sandy, gracias por tu ejemplo de crecimiento y lucha en la adversidad, por tu apoyo, por tu tiempo, por escucharme, por tus consejos, por amar a Daniel y por haber sido mi primer bebé.

Leo y Gaby, gracias por existir. Los quiero con todo el corazón.

Daniel, gracias por tu risa, tus pies, tus manos, tus ojos, tu energía, tu amor. Gracias por haber llegado a mi vida. Te amo.

Finalmente a J. S. gracias por acompañarme siempre, sobre todo... "cuando pongo un circo y me crecen los enanos".

ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPITULO 1 <i>Ficus</i> - avispas Agaonidae: historia de un mutualismo obligado	5
CAPÍTULO 2 Biogeography and conservation of the genus <i>Ficus</i> (<i>Moraceae</i>) in Mexico	30
CAPÍTULO 3 Relaciones filogenéticas y de distancia entre especies de <i>Ficus</i> mexicanas usando secuencias de DNA Y AFLPs	42
CAPITULO 4 Breakdown of the one-to-one rule in Mexican fig-wasp associations inferred by molecular phylogenetic analysis	64
CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS	74

RESUMEN

El género *Ficus* (Moraceae) junto con las avispas de la familia Agaonidae constituyen un ejemplo clásico de coevolución por ser uno de los sistemas de polinización obligada más específicos y diversos que se conocen.

A pesar de la gran importancia ecológica y evolutiva de la interacción, en México se desconocían muchos aspectos biológicos importantes de este mutualismo. Con este trabajo se buscó contribuir al conocimiento de la diversidad y evolución de la interacción en el país y formar parte del esfuerzo que se realiza a nivel mundial por entender e integrar los patrones y procesos ecológicos y evolutivos de este mutualismo.

Se realizó una revisión de herbario para conocer la diversidad, endemismos, estado de conservación y patrones de distribución de cada una de las especies de *Ficus* que se distribuyen en México. Se encontró un total de 21 especies descritas que se incluyen en dos subgéneros, *Urostigma* y *Pharmacosycea*, y se reveló que México es uno de los países con mayores endemismos para el género.

Una vez que se conocieron algunas características ecológicas de las especies *Ficus* que se distribuyen en México, se realizó la reconstrucción de las relaciones fenéticas y filogenéticas con marcadores moleculares. No se encontró una región de DNA que nos resolviera las relaciones entre las especies por lo que se recurrió al uso de AFLPs. Los resultados soportan la monofilia de los subgéneros *Urostigma* y *Pharmacosycea*, y permiten proponer una explicación para el alto endemismo de *Ficus* en México.

La especificidad de la interacción y procesos de coespeciación se evaluaron por medio de un análisis filogenético de algunas especies de avispas Agaonidae con secuencias del gen mitocondrial COI. La filogenia presentó dos grandes clados que corresponden con los dos subgéneros de *Ficus* presentes en México. Sin embargo, se encontraron avispas que polinizan a la misma especie de *Ficus*, ubicadas en más de un clado. Con la finalidad de ampliar el área de muestreo, se incluyeron secuencias del gen COI de avispas Agaonidae de Panamá que polinizan a especies de *Ficus* que también se distribuyen en México. Se encontraron diferentes niveles de especificidad y la probabilidad de eventos de colonización y especiación independientes por parte de las avispas.

Los resultados muestran que la interacción *Ficus*-Agaonidae es más dinámica de lo que se planteó cuando se propuso como ejemplo clásico de coevolución especie-específica.

INTRODUCCIÓN

El número de interacciones que mantienen las plantas con los insectos es incalculable. Sin embargo, es muy raro encontrar mutualismos con larvas de insectos que se alimentan de flores de especies que de adultos polinizan. Dentro de estas pocas interacciones, se encuentra la que mantiene la hierba perenne *Silene vulgaris* (Caryophyllaceae) con las mariposas nocturnas del género *Hadena* (Noctuidae). Sin embargo, esta interacción es más predación que mutualismo por la baja eficiencia de polinización de las palomillas (Pettersson, 1991). También, está el sistema de las palomillas *Greya politella* (Prodoxidae) que polinizan a *Lithopragma* (Saxifragaceae), pero en este caso existen numerosos co-polinizadores que disminuyen el efecto positivo de las palomillas (Thompson y Pellmyr, 1992).

Hasta el momento solo se conocen cuatro casos en los que las plantas dependen completamente de los insectos para la polinización y las larvas de insectos solo se pueden desarrollar en los ovarios de las flores que especializadamente polinizan. Estos mutualismos son el del cactus del desierto de Sonora *Lophocereus schottii* (Cactaceae) y la mariposa nocturna *Upiga virescens* (Pyralidae) (Holland y Fleming, 1999). El de la hierba perenne alpina *Trollius europaeus* (Ranunculaceae) y tres especies de moscas polinizadoras del género *Chiastocheta* (Anthomyiidae) (Pellmyr, 1992) y los dos ejemplos clásicos de coevolución, el de las 48 especies de *Yucca* (Agavaceae) y las mariposas polinizadoras de los géneros *Tegeticula* y *Parategeticula* (Prodoxidae) que se distribuyen en las zonas áridas del norte de América (Pellmyr, 2003) y finalmente el mutualismo entre *Ficus* (Moraceae) y las avispas de la familia *Agaonidae* (Janzen, 1979).

Aunque existen semejanzas entre estos mutualismos, el sistema *Ficus*-*Agaonidae* tiene características muy específicas. La vida de las avispas *Agaonidae* consiste exclusivamente en el transporte de polen de su higo natal a otro higo que polinizará, donde ovipositará y morirá. Para *Ficus*, la única opción de exportar polen es a través de la progenie de las avispas que se desarrolló en una porción de sus flores. En contraste, en los otros tres sistemas, los polinizadores son libres de moverse de una

planta a otra y transportar el polen de varios individuos a lo largo de su vida (Bronstein, 1992).

Además, este mutualismo es indudablemente el que involucra a un mayor número de especies. *Ficus* es uno de los géneros más diversos de plantas. Está compuesto por más de 750 especies que se distribuyen principalmente en las regiones tropicales de todo el mundo (Berg, 1989). Para muchas de estas especies, solo se ha reportado una especie de polinizador y muchas especies de avispa solo se han encontrado en una especie de *Ficus* (Bronstein, 1992; Kerdelhue, Clainche y Rasplus, 1999).

A pesar de la gran importancia de este sistema, en México no se conocían aspectos básicos como la riqueza, diversidad y endemismos de *Ficus* y tampoco se tenía conocimiento sobre los niveles de especificidad e historia evolutiva de la interacción. Con este trabajo se buscó contribuir al conocimiento de la diversidad, biogeografía, especificidad, evolución y coespeciación de la interacción entre *Ficus* y las avispa Agaonidae en México.

El presente trabajo se desarrollo en cuatro capítulos. En el primero, se realizó una revisión bibliográfica exhaustiva de aspectos ecológicos y evolutivos de la interacción de *Ficus*-Agaonidae. En el segundo capítulo se documentó la diversidad, patrones biogeográficos, endemismos y estado de conservación, de las especies de *Ficus* que se distribuyen en México, a partir de datos de herbario. En el tercer capítulo se propusieron relaciones fenéticas y filogenéticas de las especies de *Ficus* de México con ayuda de marcadores moleculares. Finalmente, en el cuarto capítulo se evaluaron los niveles de especificidad de los polinizadores por medio de un análisis filogenético con secuencias del gen COI y se discutió sobre los niveles de coespeciación en la interacción.

Referencias

- Berg CC. 1989. Classification and distribution of *Ficus*. *Experientia* **45**:605-611.
- Bronstein JL. 1992. Seed predators as mutualists: Ecology and evolution of the fig/pollinator interaction. En: Bernays E. (Ed.) *Insect-plant interactions*. CRC Press London. Pp 2-38.
- Holland NJ y Fleming TH. 1999. Mutualistic interactions between *Upiga virescens* (Pyralidae), a pollinating seed-consumer, and *Lophocereus schottii* (Cactaceae). *Ecology* **80**:2074-2094.
- Janzen DA. 1979. How to be a fig. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **10**:13-51
- Kerdelhue C, Clainche I. Rasplus, J-Y. 1999. Molecular phylogeny of the Ceratolasen species pollinating *Ficus* of the subgenus *Sycomorus* sensu stricto: Biogeographical history and origins of the species-specificity breakdown cases. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **11**:401-414.
- Pellmyr O. 1992. The phylogeny of a mutualism: evolution and coadaptation between *Trollius* and its seed-parasitic pollinators. *Biological Journal of the Linnean Society* **47**:333-365.
- Pellmyr O. 2003. Yuccas, yucca moths, and coevolution: a review. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **90**:35-55.
- Pettersson MW. 1991. Flower herbivory and seed predation in *Silene vulgaris* (Caryophyllaceae): effects of pollination and phenology. *Holarctic Ecology* **14**:45-50.
- Thompson JN y Pellmyr O. 1992. Mutualism with pollinating seed parasites amid co-pollinators: constraints on specialization. *Ecology* **73**: 1780-1791.
- Wiebes J. T. 1979. Co-evolution of figs and their insects pollinators. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **10**:1-12.

***Ficus* - avispas Agaonidae: historia de un mutualismo obligado**

Ficus (Moraceae), también conocido como el género de los higos, se caracteriza por tener un complejo mutualismo con sus avispas polinizadoras (Hymenoptera, Chalcidoidea, Agaoninae, Agaonidae). Juntos representan el caso más especializado de polinización obligada que se conoce (Janzen, 1979; Bronstein, 1992; Machado y cols. 2000). Los higos necesitan de las avispas para la dispersión de polen y polinización y las avispas dependen completamente de las flores *Ficus* para el desarrollo de su progenie. Esta interacción es altamente diversa, específica y constituye un caso único entre plantas e insectos (Janzen, 1979; Jermy, 1984; Ibarra-Manríquez, 1990; Ibarra-Manríquez, 1991; Anstett, McKey y Kjellberg, 1997).

EL GENERO *Ficus*

Ficus (Moraceae) es uno de los géneros más diversos de plantas. Está compuesto por más de 750 especies distribuidas en todo el mundo. Se divide en cuatro subgéneros (*Pharmacosycea*, *Urostigma*, *Sycomorus* y *Ficus*), los cuales a su vez se subdividen en numerosas secciones (Machado y cols. 2001). La mitad de las especies son funcionalmente dioicas (Patel, 1996), y la otra mitad son monoicas (Bronstein y McKey, 1989). Presenta diversas formas de vida como árboles, epífitas, hemiepífitas y arbustos, son caducifolios o perennifolios y generalmente son tropicales (Berg, 1989).

El género se caracteriza por la presencia del sícono (fig. 1), una estructura carnosa y cerrada casi en su totalidad que actúa como inflorescencia e infrutescencia (Verkerke, 1989). En el interior de esta inflorescencia, hay flores masculinas y femeninas, distribuidas de manera especial dependiendo de la especie (Janzen, 1979; Berg, 1989).

El sícono solo se comunica con el exterior por una apertura apical, el ostiolo, que está cerrado casi en su totalidad por pequeñas brácteas con características

particulares en cada especie (fig. 1) (Heywood, 1988; Michaloud, Carrière y Kobbi, 1996; van Noort y Compton, 1996). El ostiolo es el único contacto de las flores con el exterior y debido a su morfología actúa como una barrera selectiva que generalmente previene la entrada de especies parásitas que son competidoras de las polinizadoras (Janzen, 1979).

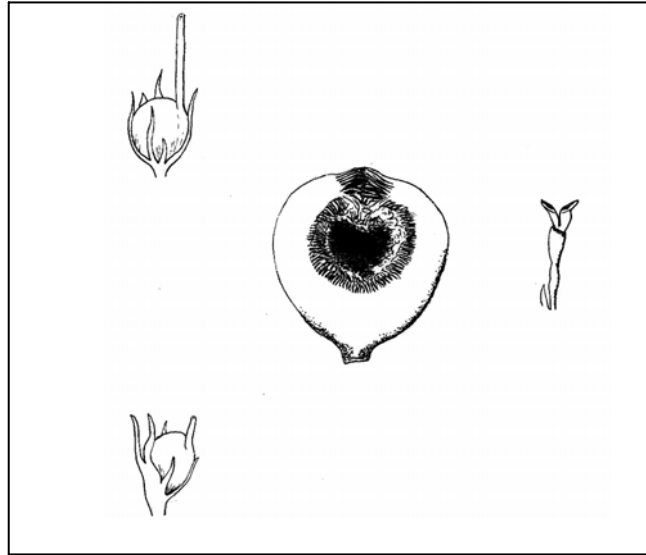


Figura 1. Corte transversal de un sícono, en el interior se distribuyen flores masculinas (derecha) y femeninas que pueden ser de estilo corto o largo (izquierda).

LAS AVISPAS AGAONIDAE

Las avispas de la familia *Agaonidae sensu* Rasplus son los únicos polinizadores de *Ficus*. Durante mucho años se propuso que para cada especie de *Ficus* existía una especie de avispa polinizadora (Cook y Rasplus, 2003). Hasta el momento las especies de avispas descritas se agrupan en 20 géneros. Con excepción de *Ceratosolen*, *Platyscapa* y *Wiebesia*, cada género se asocia a un solo subgénero y sección de *Ficus* (Machado y cols. 2001).

Las avispas *Agaonidae* son completamente dependientes de las flores femeninas del higo para completar su ciclo de vida. Las hembras entran en el sícono, polinizan y colocan sus huevos en algunas de flores donde se desarrolla su progenie consumiendo el contenido de lo que sería una semilla (Herre 1989, Herre y cols. 1999).

La familia se caracterizan por presentar adaptaciones morfológicas relacionadas con el mutualismo que mantienen. Las adaptaciones varían ampliamente de una especie a otra (Frank, 1989). Las hembras tienen la cabeza alargada y aplanada, en sus mandíbulas llevan hileras de dientes invertidas, en las tibias tienen estructuras en forma de ganchos y tienen un cuerpo aplanado que les permite pasar a través de los herméticos paquetes de brácteas del ostiolo (van Noort y Compton, 1996) (fig. 2). Algunas avispas presentan antenas especiales para poder detectar al sícono. Una característica importante de la familia es el marcado dimorfismo sexual morfológico y conductual (fig. 2). Los machos, a diferencia de las hembras, son ápteros, ciegos y pequeños (Ibarra-Manríquez, 1991; van Noort y Compton, 1996; Cook y cols., 1997).

Las avispas Agaonidae pueden controlar la proporción sexual de su progenie dependiendo de las condiciones locales. Ovipositan huevos fertilizados para procrear hembras, o sin fertilizar, para procrear machos (Herre, 1985; Kinoshita, Kasua y Yahara, 1998).

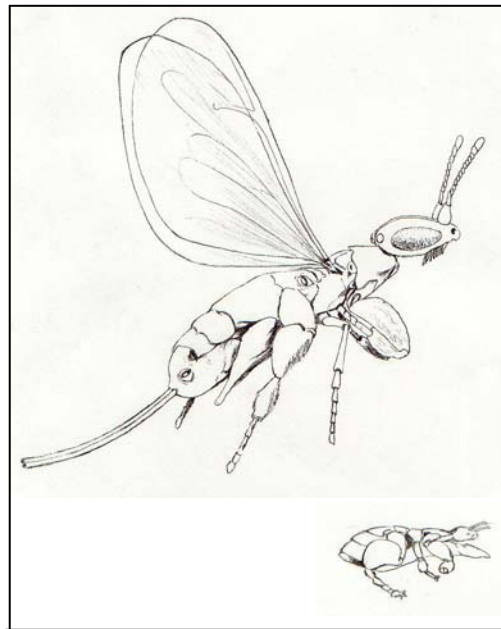


Figura 2. Hembra (izquierda) y macho (derecha) de avispa Agaonidae.

ACOPLAMIENTO DE LOS CICLOS REPRODUCTIVOS

El desarrollo del sícono se ha dividido en cinco etapas que se encuentran perfectamente acopladas al ciclo de vida de las avispas (Ibarra-Manríquez, 1990).

Fase A, prefloral.

Esta fase inicia con la aparición de yemas de inflorescencia del higo y termina con la maduración de las flores femeninas antes de la apertura del ostiolo (Ibarra-Manríquez, 1990).

Fase B, femenina o receptiva

En esta fase empieza la sincronía del desarrollo del sícono con el ciclo de vida de las avispas. Las flores femeninas se encuentran maduras y producen compuestos volátiles altamente específicos que son liberados por el ostiolo (Grisón-Pigé, Bessiere y Hossaert-MacKey 2002). Las avispas Agaonidae detectan los compuestos a través de sus alargadas antenas que funcionan como receptores olfatorios y se dirigen al sícono (Ibarra-Manríquez, 1990; van Noort y Compton, 1996).

Una vez que el sícono receptivo ha sido localizado, las avispas “fundadoras” arriban y entran a través del ostiolo que en este periodo presenta mayor diámetro y brácteas blandas que facilitan la entrada de las avispas (Gibernau y cols. 1996). Para pasar a través de las brácteas, las avispas se ayudan con la compleja estructura mandibular y la estructura tibial que presentan (van Noort y Compton, 1996). Para atravesar por las brácteas abren y cierran la mandíbula para ayudarse a avanzar activamente, al abrirla, van colocando los “dientes” lo mas lejano posible del margen exterior del ostiolo y al cerrarla enganchan los dientes en las brácteas para no perder el avance obtenido. La estructura tibial es importante en el inicio y en el empuje final del cuerpo cuando la cabeza ya ha pasado y actúa como ancla para mantener la posición adelantada (van Noort y Compton, 1996). Durante este complicado proceso algunas avispas pierden sus antenas y alas (Janzen, 1979).

Una vez adentro, algunas especies de avispas polinizan pasivamente y el resto llevan a cabo la complicada polinización activa. Las especies que polinizan activamente, tienen estructuras especializadas para cargar el polen en la parte externa del tórax y en las patas delanteras. Presentan distintas conductas para

colectar y depositar el polen (Frank, 1985). Al mismo tiempo que polinizan, depositan sus huevecillos en una proporción de de flores para que se alimente y desarrolle su progenie en un periodo de 26 a 43 días según la especie (Galil y Eisikowitch, 1968; Janzen, 1979; Wiebes, 1979; Bronstein, 1992; Patiño, Herre y Tyree 1994; Herre,1996).

Fase C, interfloral

Es el periodo en el que las larvas de avispa completan su desarrollo mientras las semillas y las flores masculinas maduran (Ibarra-Manríquez, 1990).

Fase D, masculina o donadora

Al final de la madurez del fruto las avispas macho son las primeras en emerger, rasgan su camino hacia fuera de las flores en que se desarrollaron y se arrastran buscando a las flores en donde están las avispas hembras. Introducen su abdomen por la apertura de la flor para poder copular sin necesidad de salir de su higo natal (Ramírez, 1970; Frank, 1985). Los machos no tienen adaptaciones relacionadas con la búsqueda de síconos en estado receptivo ni con la entrada al ostiolo, son ápteros, polígamos, pequeños y ciegos. Invierten la mayoría de sus recursos en la producción de esperma y en copular con muchas hembras (Frank, 1985). Las hembras colectan el polen activa o pasivamente y salen a través de un túnel que los machos cavan en las paredes del sícono (Ramírez, 1970; Gibernau y cols., 1996).

Fase E, postfloral

Las avispas fecundadas y cargadas de polen salen del sícono en busca de otro que se encuentre en estado receptivo. El ciclo finaliza con la maduración del sícono que sirve como alimento a una gran variedad de animales dispersores de semillas (Wiebes, 1979; Verkerke, 1989; Bronstein, 1992).

DIVERSIDAD EN EL ACOPLAMIENTO DE LOS CICLOS REPRODUCTIVOS

El acoplamiento de ciclos reproductivos que presenta *Ficus* con las avispas Agaonidae tiene considerables modificaciones dependiendo del comportamiento de polinización de cada avispa, del tamaño poblacional de ambos, de las variaciones en

características físicas del sícono (tamaño, número de flores, proporción floral, ostiolo) y de los sistemas reproductivos de *Ficus* (Bronstein, 1992).

Duración del periodo receptivo de los síconos.

Antes se pensaba que el periodo receptivo del higo era muy corto y por lo tanto se necesitaba de una extrema eficiencia por parte de las avispas para poder localizarlo (Khadari y cols., 1995). Sin embargo, se ha encontrado que cada sícono alarga su periodo receptivo hasta tres o cuatro semanas cuando no ha sido polinizado (Khadari y cols., 1995). Una vez que ha sido polinizado, la etapa de receptividad llega a su fin (Ansett, Kjellberg y Bronstein, 1996). Con el alargamiento del periodo receptivo la población de *Ficus* logra mejorar el éxito reproductivo con mayor eficiencia a la que se lograría si se aumentara el tamaño poblacional (Anstett, Michaloud, y Kjellberg, 1995).

Síndrome de polinización

Las especies de *Ficus* que son polinizadas activamente tienen menos flores masculinas y estas son relativamente pequeñas. En contraste, las especies de *Ficus* que son polinizadas pasivamente producen más flores masculinas por sícono y presentan anteras grandes que tienden a dehiscer naturalmente para facilitar la colección pasiva de polen. Las avispas que polinizan pasivamente presentan estructuras especializadas para la polinización muy reducidas o carecen de ellas y no muestran conducta de polinización (Machado y cols., 2001).

En busca de un nuevo sícono

Después de salir del sícono en que nacieron, las avispas vuelan buscando un sícono receptivo, durante este periodo la mortalidad de las avispas es extremadamente alta (Bronstein, 1989). A pesar de esto y de su pequeña talla, son muy eficientes para dispersar el polen, incluso, pueden recorrer hasta 10 km para encontrar un higo receptivo logrando cubrir una área mayor de árboles que intercambian avispas (Nasson, Herre y Hamrick, 1996; Anstett, Hossaert-Mckey y Kjellberg, 1997).

Aunque la mayoría de polinizadoras mueren en la cavidad del sícono y muchas pierden sus alas y antenas al penetrar, hay evidencias de que en raros casos, las fundadoras pueden salir e ir a ovipositar a otro higo. Una posible explicación a

esta conducta es que los sitios de oviposición estén ocupados por la presencia de otras avispas, como ocurre en *F. aurea* cuando hay mas de tres avispas polinizadoras. Sin embargo, en ocasiones la avispa sale del sícono con parte de sus huevecillos, aunque existan sitios disponibles para ellos. El salir del higo implica un gran riesgo para la avispa y para la progenie que aún lleva, pero esto le puede evitar otros riesgos como el que el higo sea abortado y con él toda su descendencia o bien parte de su progenie puede esquivar parásitos que estén en el sícono. La salida de las avispas también puede resultar ventajosa para el higo, porque si llevan polen podría incrementar la producción de semillas cuando hay menos de un polinizador por higo (Gibernau y cols., 1996).

El tamaño del sícono

La variación del tamaño del sícono entre especies es muy amplia. Se pueden encontrar especies con síconos desde 4 mm hasta 10 cm (Berg, 1989; Ibarra-Manríquez, 1991). El tamaño del sícono es proporcional al número de flores que contiene, un sícono de 4 mm tienen alrededor de 50 flores mientras que uno de 3 cm llega a tener 2500, por lo cual, el número de avispas que entran al sícono y en la producción de semillas y avispas depende directamente del tamaño de sícono (Herre, 1987).

Las especies dioicas

En especies de *Ficus* dioicas, las avispas fundadoras que llegan a higos masculinos pueden colocar sus huevos en todas las flores femeninas porque no existe ninguna restricción para ello. Pero, no llevan a cabo la polinización porque los higos masculinos no tienen flores para esta función. Estos higos no producen semillas, pero mantienen a la progenie de la avispa y siempre son donadores de polen. En higos femeninos, las avispas polinizan a las flores femeninas, pero son incapaces de ovipositar porque existen características, como un estilo largo, que no les permite hacerlo. Una gran cantidad de avispas muere en el sícono sin tener progenie (Spencer, Weiblen y Flick, 1996). La dioecia funcional en *Ficus* hace que dentro de este grupo aproximadamente la mitad de los árboles cumplan con la función femenina (producción de semillas) y la otra mitad con la función masculina

(producción y dispersión de polen). Esta separación sexual permite que la selección actúe de manera independiente en la biología reproductiva de cada sexo. Por ejemplo, la inflorescencia masculina tiene un periodo receptivo mayor que la femenina, contrario a lo que ocurre con la fase de desarrollo del sícono (Patel y McKey, 1998).

Como los síconos femeninos son letales para sus polinizadores, se podría esperar que las avispas fueran capaces de reconocerlos y discriminarlos penetrando solo en los síconos masculinos (Patel y cols., 1995; Anstett, Gibernau y Hassaert-McKey, 1998). Sin embargo, con la asincronía entre árboles femeninos y masculinos la discriminación se soluciona para el higo. (Wieblen, Flick y Spencer, 1995; Kjellberg y cols., 1987; Compton, Ross y Thornton, 1994). La asincronía entre sexos también es un factor benéfico en zonas estacionales porque cada sexo puede tomar ventaja en diferentes condiciones ambientales que beneficien la producción de semillas o de avispas. Los árboles femeninos florecen y fructifican principalmente en la estación húmeda, bajo condiciones favorables para la producción de semillas, germinación y establecimiento y los árboles masculinos producen síconos con mayor frecuencia que los femeninos manteniendo a las poblaciones locales de avispa durante las condiciones adversas. Cuando nuevamente hay condiciones óptimas, florecen los árboles femeninos y se puede presentar un pico en la producción de higos masculinos, incrementando la población de polinizadores y con esto la producción de los higos (Cook y Sally, 1996).

Existen especies en las cuales los árboles femeninos y masculinos fructifican sincrónicamente. En estos casos, se ha encontrado que las avispas prefieren penetrar en higos macho. Sin embargo, las diferencias que existen entre los químicos atractores de ambos sexos son mínimas y se incrementa la dificultad de reconocerlos (Anstett, Gibernau y Hassaert-McKey, 1998).

A pesar de que las avispas que polinizan tienen adecuación cero, no existe un mecanismo efectivo que les permita evitar síconos femeninos. Esta incapacidad, ha permitido que el mutualismo permanezca estable, de lo contrario el mutualismo podría llegar a su fin (Patel y cols. 1995).

La separación de funciones genera un conflicto también con los animales dispersores. Si un dispersor come un sícono masculino daña a la población de

avispas y con esto a la función masculina de ese individuo. Por otro lado, si los síconos femeninos no son consumidos, no hay dispersión de semillas y la germinación sería menos eficiente por la carencia de escarificación (Thomas, 1986, De Figuereido, 1993, Compton, Craig y Waters, 1996). Se observó que los síconos femeninos al madurar son mas coloridos, atractivos y preferidos por las aves, lo cual aumenta el potencial reproductivo de higos y avispas (Lambert, 1992).

Fenología floral

La fenología floral que presentan los higos incrementa la probabilidad de que las avispas transfieran polen entre ellos (Bronstein, 1992). Por lo general, los higos se encuentran en diferentes fases de desarrollo floral dentro de una población. Esta fenología ofrece a las avispas un continuo lugar de oviposición y disminuye la probabilidad de que la población de avispas sufra una extinción local (Corlett, 1987; Kjellberg F., Maurice S. 1989; Windsor y cols., 1989, Damstra, Richardson y Reeler, 1996; Spencer, Wieblen y Flick, 1996). En hábitats no estacionales, la floración de un árbol es de manera sincrónica y puede iniciar en cualquier momento del año, así se reduce la autopolinización y se obliga a las avispas a la dispersar el polen (Milton *et al.*, 1982).

Aunque *Ficus* se caracteriza por habitar zonas tropicales, existen algunas especies habitando zonas estacionales en las que la floración en un solo árbol es asincrónica. De esta manera se proveen pocos síconos pero durante mucho tiempo (Cook y Sally, 1996; Smith y Bronstein, 1996). Esta característica permite que los polinizadores puedan entrar en síconos del mismo árbol y eviten el riesgo de dispersarse en condiciones inclementes (Anstett, Hossaert-Mckey y Kjellberg, 1997).

OTRAS INTERACCIONES de *Ficus*

Cada especie de higo, se encuentra asociada a una gran diversidad de organismos con los que mantiene interacciones en una amplia gama de especificidad. Por ejemplo, existen drosófilas, del género *Lissocephala*, que se reproducen estrictamente en síconos (Lachaise, Tsacas y Couturier, 1982). También hay una gran diversidad de avispas no polinizadoras, con una gran variedad de comportamientos, en general, dependen de la producción de semillas o avispas para el desarrollo de su

progenie (Janzen 1979, Bronstein 1991). Hay evidencias que sugieren que estas avispas son también específicas (van Noort y Compton, 1996). Algunas especies son formadoras de agallas y ovipositan desde el exterior del sícono, con su largo ovipositor, en los ovarios vacantes. Otras especies colocan sus huevos en ovarios polinizados o que contiene a la progenie de las avispas polinizadoras pudiendo actuar como parasitoides de estas o bien como inquilinas alimentándose del tejido de la agalla de la polinizadora (Kerdelhué y Rasplus, 1996). La mayoría de estas avispas solo pueden reproducirse en síconos polinizados y las hembras de la progenie depende de los pasajes que cavan los machos de avispas polinizadoras para poder salir del sícono (West y cols., 1996).

Dependiendo de los hábitos alimenticios de las larvas de avispas no polinizadoras, su presencia en el sícono puede o no ser costosa para higos y/o polinizadoras. Las avispas que usurpan los sitios de oviposición de las polinizadoras o parasitan a la progenie afectan la función masculina del higo (West y cols., 1996; Kerdelhué y Rasplus, 1996b).

Aunque estas avispas por lo general disminuyen la adecuación del higo y de las polinizadoras, es difícil identificar características en los higos para evitarlas, lo anterior puede deberse a que los tiempos generacionales de higos y avispas difieren mucho y las no polinizadoras son capaces de contraatacar rápidamente las adaptaciones de los higos para excluirlas, o bien que los higos no sean capaces de distinguir entre las larvas de los polinizadores y no polinizadoras o a que estas avispas no generan graves costos en la adecuación del higo (Bronstein, 1991).

También se encontró que los higos mantiene una estrecha relación con diferentes especies de hormigas (Schatz y cols. 2003), algunas de ellas se alimentan de las avispas parásitas, protegiendo a las polinizadoras y a los higos (Cushman y cols., 1998).

Los higos y sus polinizadoras constituyen un mutualismo clave del que dependen muchas otras especies. Existen varios depredadores de las avispas como hormigas que las esperan cuando arriban al sícono. Larvas de mariposas y nemátodos que se alimentan de las avispas en desarrollo, escarabajos estafilinidos que se comen a las avispas antes de que salgan del sícono y aves que se alimentan cuando estas ya salieron (Bronstein, 1988b).

Los higos son de gran importancia para muchas especies de frugívoros debido a las abundantes y frecuentes producciones de frutos aún en periodos donde otros frutos son escasos (Lambert, 1988; 1991; Lambert y Marshall, 1991; Patel, 1997). Por esta característica se les ha considerado un recurso fundamental de algunas zonas cálidas húmedas del mundo, digno de esfuerzos de conservación (Ibarra-Manríquez, 1990). Constituyen un recurso alimenticio para una gran variedad de invertebrados como coleópteros, hemípteros e himenópteros (Slater, 1972, Bronstein, 1992; Davis y Sutton, 1997) y vertebrados como peces, reptiles, 1274 especies de aves y mamíferos (roedores, murciélagos y primates entre otros) comprendidos en 523 géneros y 92 familias (Lambert, 1988; Janzen, 1981; De Figuereido, 1993; Moll y Jansen, 1995; Kalko, Herre y Handley Jr., 1996; Horn, 1997; Sánchez-Cordero y Martínez Gallardo, 1998, Sanan y cols., 2001).

La importancia de los higos como recurso alimenticio es indiscutible, pero su impacto es diferente en cada región dependiendo de la fenología de los demás miembros productores de frutos de la comunidad (Patel, 1997). Como consecuencia del peculiar sistema de polinización, una población de higos solo puede producir frutos maduros si estos han sido polinizados. Por esto, es la interacción higo-avispa quien constituye un recurso importante para la estabilidad de algunas comunidades (Harrison, 2003). Como consecuencia, trabajos de conservación deben considerar el número mínimo de árboles necesarios para sostener a las poblaciones de avispas que según modelos matemáticos es de aproximadamente 95 individuos, dependiendo de la diversidad del género, de diferencias en la estacionalidad, del periodo de floración y de la duración de receptividad femenina de las inflorescencias (McKey, 1989; Bronstein *et al.*, 1990; Bronstein, 1992; Anstett, Hossaert-McKey y McKey, 1996; Nason, Herre y Hamrick, 1998).

CONFLICTOS DE INTERES: ¿SEMILLA O AVISPA?

En todas las interacciones mutualistas hay un costo para las especies involucradas. Sin embargo, existe un beneficio neto para cada una de ellas (Herre y cols., 1999). La estabilidad de un mutualismo requiere que los costos no excedan a los beneficios porque la interacción se podría convertir en parasitismo o predación o llegar a la extinción de uno o ambos interactuantes (Holland y cols., 2004) El entender que

factores previenen la sobreexplotación de cada una de las especies por parte de la otra es fundamental para comprender la persistencia de la asociación (Jousselin y cols. 2001). En el sistema *Ficus*-avispa Agaonidae existe un claro conflicto de interés, cada flor femenina, en teoría, puede potencialmente producir una semilla o una agalla con una avispa hija. Cuando la avispa fundadora penetra en el sícono de un higo monoica para ovipositar, frecuentemente no puede salir y ovipositar en otro higo, entonces las flores del sícono en el que entran representa el único sitio potencial para tener progenie. Sin embargo, ellas solo ovipositan en una porción de las flores y el resto son para la producción de semillas (Janzen, 1979; Jousselin y cols. 2001). En el caso de las avispas, se podría esperar que la selección natural hubiera actuado favoreciendo a aquellas que sean capaces de explotar de una forma mas eficiente las flores del sícono aumentando con esto su adecuación. Pero al parecer, esto no ha ocurrido (Anstett, Bronstein y Hossaert-McKey, 1996). Para *Ficus* es importante la repartición de flores porque las avispas Agaonidae, al ser las únicas dispersoras de polen, están directamente relacionadas con el éxito de la función masculina y el número de semillas producidas representa el éxito de la función femenina (Frank, 1989). Una sobreexplotación de flores por parte de las avispas traería como consecuencia una reducción en la adecuación de los higos y con esto un posible colapso del mutualismo (Weiblen, Spencer y Flick, 1995). Esta polémica ha generado la propuesta de varias hipótesis para explicar el destino de las flores del sícono y con ello el mantenimiento de este mutualismo.

Tamaño del ovipositor y del estilo

Debido a que se ha demostrado que las avispas prefieren ovipositar en flores con estilo corto (Janzen, 1979; Bronstein, 1992; Anstett, 2001), se propuso una hipótesis que durante mucho tiempo fue muy aceptada, en ella se plantea que el tamaño del estilo determina el destino de la flor. En flores con estilo largo se producen semillas y en flores con estilo corto se desarrollan las avispas porque en ellas las fundadoras alcanzan el ovario con su ovipositor para depositar sus huevecillos (Janzen, 1979). Sin embargo, esta situación generaría una fuerte selección de avispas con ovipositor largo porque esto aumentaría su fecundidad (Weiblen, Spencer y Flick, 1995). Esta selección podría poner en riesgo la estabilidad del mutualismo porque se podría

llegar a una sobreexplotación de ovarios de *Ficus*. Sin embargo, se ha encontrado que las polinizadoras de especies monoicas poseen oviposidores de tamaño tal que pueden alcanzar la mayoría de los ovarios y se ha encontrado progenie en flores de estilo largo (Weiblen, Spencer y Flick, 1995). Por otro lado, en *F. pertusa* se ha observado que la producción de avispas es mucho mas baja al número de ovarios accesibles y el numero de semillas fue mucho más alto que el número de ovarios inaccesibles (Bronstein, 1988). Esta hipótesis ha sido desechada debido a que se ha demostrado que los polinizadores se pueden desarrollar en todas las flores de un sícono monoico sin importar la longitud del estilo (Nefdt y Compton, 1996; Weiblen, Spencer y Flick, 1995, Anstett, 2001).

Etapas de receptividad

Otra hipótesis es la que propone que el momento del periodo receptivo en el cual el sícono es arribado por las avispas determina la proporción de semillas y avispas de éste. En *F. pertusa*, se ha observado que cuando las avispas penetran en un sícono que se encuentra en los primeros momentos del periodo receptivo, la proporción de avispas es mas alta en relación a las semillas, siendo este sícono un exitoso donador de polen. Cuando las avispas penetran en los últimos momentos de receptividad, el resultado es una alta producción de semillas (Frank, 1989). Pero no se ha realizado ningún otro estudio que apoye esta hipótesis.

Suministro limitado de huevecillos

Nefdt y Compton (1996), proponen que las avispas no tienen suficientes huevecillos como para saturar las flores del sícono. Sin embargo, se ha demostrado que aunque en algunos casos esto es cierto, en muchos otros no se cumple debido a que pueden existir hasta 24 avispas fundadoras en un sícono y claramente pueden saturar a todas las flores pero no lo hacen (Anstett, 2001).

Número de fundadoras

Otra hipótesis, muy relacionada con la anterior, propone que el número de avispas fundadoras no alcanza a saturar el número de ovarios disponibles. En general se ha encontrado que la producción relativa de semillas y avispas es altamente

dependiente de número de fundadoras y de si estas están parasitadas o no por nemátodos debido a que estos disminuyen su adecuación (Herre, 1996).

El número de avispas fundadoras, de ovarios accesibles, de semillas y progenie incrementa con el tamaño del sícono (Bronstein y Hossaert-McKey, 1996), a pesar de lo cual, se pueden dar casos en los que en síconos con 237 ovarios disponibles solo se encuentre una fundadora con un promedio de 79 huevos y por lo tanto no alcance a ovipositar en todos los sitios disponibles (Anstett, Bronstein y Hossaert-McKey, 1996).

Se ha propuesto la posibilidad de que existan factores que limitan el número de fundadoras dentro de un sícono incluyendo las tasas de cierre y apertura ostiolar y la baja densidad de poblaciones de avispas (Hawkins y Compton, 1992). Estas restricciones permitirían la permanencia de ovarios productores de semillas dentro de un higo y con ello la estabilidad de este mutualismo (Nefdt y Compton, 1996).

El único mecanismo que se ha encontrado para limitar el número de fundadoras es que el periodo receptivo del sícono termina una vez que las flores han sido polinizadas (Ansett, Kjellberg y Bronstein, 1996) eliminando la probabilidad de la entrada de fundadoras después de que algunas ya han penetrado.

Semillas invencibles

Posteriormente, surgen varias hipótesis entre las que destacan, por estar soportadas por datos, la de “las semillas invencibles” (Herre y West, 1997). Esta idea, propone que una proporción de las flores no puede ser usada por avispas polinizadoras ni parásitas, esta propuesta está basada en el hecho de que las avispas parásitas compiten por las flores con las polinizadoras y no con las semillas. Sin embargo, en especies de higos monoicas, los ovarios de todas las flores son iguales y no se han encontrado aun ninguna características en las flores que apoyen esta hipótesis.

Ventaja individual

La hipótesis más reciente es la que contempla que los polinizadores experimentan una ventaja individual al colocar sus huevos en flores de estilo corto (Anstett, 2001, Jouselin y cols., 2001), esto puede deberse a que a los machos les es mas fácil tener acceso y copular con hembras que se encuentren en estos ovarios (Anstett,

Bronstein y Hossaert-McKey, 1996) y a las avispas les es más fácil salir de estas agallas y del sícono. Por otro lado, las agallas de flores de estilo corto, tienen mayor espacio y son mas grandes que las de estilo largo y los polinizadores de mayor tamaño tienen mayores probabilidades llegar a un nuevo sícono receptivo y ovipositar (Herre, 1989). Sin embargo, esta hipótesis tampoco resuelve satisfactoriamente el porque las avispas no explotan el 100% de las flores de un sícono, sobre todo cuando existe más de una fundadora y la demanda de flores genera la necesidad de ovipositar en aquellas que no sean las más apropiadas para el buen desarrollo de la progenie. Por lo que el destino de los ovarios y como consecuencia la estabilidad de esta interacción, está determinado por una restricción no superada (Anstett, Hossaert-McKey y Kjellberg, 1997) impuesta, al parecer, por *Ficus* a sus polinizadores (Herre y cols. 1999).

ORIGEN DEL MUTUALISMO

Estudios basados en filogenias morfológicas y moleculares soportan la monofilia de las avispas Agaonidae e indican que la polinización pasiva es la forma mas antigua (Cook y Rasplus, 2003). Para *Ficus*, también se soporta la monofilia y el subgénero *Pharmacosycea*, aparece como el más primitivo (Machado y cols. 2001). Machado y cols., (2001) calibraron un reloj molecular con un fósil de avispa de 25 millones de años y estimaron que el origen del mutualismo se dio hace aproximadamente 87 millones de años y se estableció una sola vez. Se propone que el mutualismo inició con avispas que visitaban las inflorescencias de los ancestros de *Ficus* para alimentarse de sus semillas (Janzen, 1979; Wiebes, 1979) y la transición de antagonista a mutualista comenzó con incidentales y casuales transferencias pasivas de polen por parte de las avispas (Bronstein, 1992; Anstett, Hossaert-McKey y Kjellberg, 1997).

ESPECIFICIDAD Y COEVOLUCION

La especificidad, diversidad, adaptaciones y antigüedad que presenta este mutualismo ha generado que se proponga que este sistema es resultado de una larga historia coevolutiva. La idea de una interacción 1:1 ha sido uno de los puntos que mas ha generado interés en este sistema. Sin embargo, existen problemas al

intentar evaluar la especificidad. Uno de ellos es la dificultad de determinar fenotípicamente a las avispas Agaonidae. En ocasiones son necesarios datos genéticos para lograr distinguir especies de avispas polinizadoras que coexisten en un solo sícono (Molbo y cols. 2003). Otro problema es que las especies de *Ficus* muestran alta variabilidad intraespecífica que hace difícil su delimitación (Cook y Rasplus, 2003) y finalmente, el resultado del trabajo taxonómico de los grupos es disparado, solo se han descrito la mitad de especies de avispas de las que se han descrito para *Ficus*.

Se ha encontrado que la forma más común de romper la especificidad es por dos o más especies de avispas polinizando a una especie de *Ficus*, sugiriendo que los polinizadores especian más rápido que los higos que tienen un tiempo generacional muchas veces mayor que el de sus polinizadores (Cook y Rasplus, 2003).

Uno de los primeros trabajos que intentó evaluar el grado de coevolución, se realizó por medio de la comparación de filogenias morfológicas que se tenían de algunos miembros de *Ficus* y de avispas Agaonidae. El resultado de este trabajo fue una congruencia parcial entre las filogenias (Funk y Brooks 1990). Sin embargo, las filogenias utilizadas en este trabajo son incompletas y al estar basadas en caracteres morfológicos involucrados en la interacción sugieren que la congruencia filogenética se debe a una relación funcional de los caracteres usados para realizar las filogenias (Machado y cols., 1996). Por esto, surge la necesidad de tener evidencias independientes para poder sustentar la idea de coevolución desde una perspectiva filogenética histórica. Como un acercamiento preliminar, en 1996 (Herre, 1996; Herre y cols., 1996; Machado y cols., 1996), se realizó la reconstrucción filogenética de siete especies de *Ficus* y sus respectivas polinizadoras. La filogenia de *Ficus* se realizó con secuencias de DNA de las regiones tRNA y rbcL (de cloroplasto) y electroforesis de proteínas y la de las avispas con secuencias de los genes COI y COII mitocondriales. Los resultados muestran una congruencia total entre las filogenias sugiriendo que la coevolución estricta ha predominado en esta asociación. Este estudio fue la primera evidencia con caracteres independientes que apoya la idea de que este sistema es producto de una historia coevolutiva. Sin embargo, el que solo incluya siete especies y sea local no permitió que fuera una evidencia contundente. En 1999, Kerdelhue, Clainche y Rasplus, realizaron un estudio sobre especificidad de

la interacción relacionada con la distribución del subgénero *Sycomorus* de África. El análisis se basó únicamente en la filogenia molecular de las especies polinizadoras del subgénero. Encontraron estricta especificidad entre 12 especies y dos excepciones, en ambas, hay dos especies de avispas polinizadoras en una especie de *Ficus*. Una excepción probablemente se debe a un evento independiente de especiación del polinizador porque ambas son especies hermanas filogenéticamente y en la otra excepción probablemente hubo una transferencia horizontal a un nuevo *Ficus* porque las especies se encuentran alejadas filogenéticamente. Este trabajo apoya desde una perspectiva geográfica y filogenética la especificidad en este mutualismo y proporciona explicaciones sustentadas a las excepciones de especificidad. El primer estudio que realizó comparaciones estadísticas de ambas filogenias, fue realizado con diecinueve especies de avispas del género *Ceratosoleny* y las diecinueve especies de *Ficus* hospederas de la sección *Sycomorus*. El resultado es un alto grado de coespeciación (Weiblen y Bush, 2002).

Al aumentar el número de trabajos, utilizar diferentes marcadores moleculares e incorporar a más especies en los estudios, se ha encontrado que este sistema es sumamente dinámico. Existen especies de avispas crípticas, que no habían permitido determinar que existe más de una especie de avispa polinizadora en algunas especies de *Ficus*, algunas de ellas son especies hermanas y otras solo son producto de las presiones selectivas impuestas por la morfología del sícono y en particular del ostiolo. Estos estudios también han permitido demostrar la existencia de casos de cambios de hospedero, especiación independiente y eventos de extinción seguidos de eventos de colonización (Molbo y cols. 2003).

A partir de todos los datos nuevos, se necesita abordar la interacción con diferentes enfoques para generar el desarrollo y evaluación de modelos que reflejen más cercanamente los patrones de evolución, especificidad y diversificación de este sistema biológico, de los mutualismos y en general del resto de interacciones.

REFERENCIAS

- Anstett M. C., Michaloud G., Kjellberg F. 1995. Critical population size for fig/wasp mutualism in a seasonal environment: effect and evolution of duration of female receptivity. *Oecologia* **103**:453-461.
- Anstett M. C., Bronstein J. L., Hossaert-McKey M. 1996. Resource allocation: a conflict in the fig/fig wasp mutualism? *J. Evol. Biol.* **9**:417-428.
- Anstett M. C., Hossaert-McKey M., McKey D. 1996. Modeling the persistence of small population of strangly interdependent species: Figs and fig wasps. *Conservation Biology* **11**:204-213.
- Anstett M. C., Kjellberg F., Bronstein J. L. 1996. Waiting for wasp: consequences for pollination of dynamic of *Ficus pertusa*. *Journal of Biogeography* **23**: 459-467.
- Anstett M. C., Hossaert-McKey M., Kjellberg F. 1997. Figs and fig pollinators: evolutionary conflicts in a coevolved mutualism. *TREE* **12**:94-99.
- Anstett M. C., Gibernau M., Hossaert-McKey M. 1998. Partial avoidance of female inflorescences of a dioecious fig by their mutualistic pollinating wasps. *Proc. R. Soc. Lond. B* **265**:45-50.
- Anstett M.C. 2001. Unbeatable strategy, constraint and coevolution, or how resolve evolutionary conflicts: the case of fig/wasp mutualism. *Oikos* **95**:476-484.
- Berg C.C. 1989. Classification and distribution of *Ficus*. *Experientia* **45**:605-611.
- Bronstein J. L. 1988. Mutualism, antagonism, and the fig-pollinator interaction. *Ecology* **69**:1298-1302.
- Bronstein J. L. 1988b. Predators of fig wasps. *Biotropica* **20**:215-219.
- Bronstein J. L. 1989. A mutualism at the edge of its range. *Experientia* **45**: 622-629.
- Bronstein J. L., McKey D. 1989. The comparative biology of figs. *Experientia* **45**:601-604.
- Bronstein J. L., Gouyon P-H., Glinddon C., Kjellberg F., Michaloud G. 1990. The ecological consequences of flowering asynchrony in monoecious figs: a simulation study. *Ecology* **71**:2145-2156.
- Bronstein J. L. 1991. The non-pollinating wasp fauna of *Ficus pertusa*: exploitation of a mutualism? *Oikos* **61**: 175-186.
- Bronstein J. L. 1992. Seed predators as mutualists: Ecology and evolution of the fig/pollinator interaction. En: Bernays E. (Ed.) *Insect-plant interactions*. CRC Press London. Pp 2-38.
- Bronstein J. L., Hossaert-McKey M. 1996. Variation in reproductive success within a subtropical fig/pollinator mutualism. *Journal of Biogeography* **23**:433-446.

- Compton S. G., Ross S. J., Thornton I. W. B. 1994. Pollinator limitation of fig tree reproduction on the island of Anak Krakatau (Indonesia). *Biotropica* **26**(2):180-186.
- Compton S. G., Craig A. J. F. K., Waters I. W. R. 1996. Seed dispersal in an African fig tree: birds as high quantity low quality dispersers?. *Journal of Biogeography* **23**:553-563.
- Cook J. M., Sally A. D. 1996. Effects of within-tree flowering asynchrony on the dynamics of seed and wasp production in an Australian fig species. *Journal of Biogeography* **23**: 487-494.
- Cook J.M., Compton S.G., Herre E.A., West S.A. 1997. Alternative mating tactics and extreme male dimorphism in fig wasp. *Proc. R. Soc. Lond. B* **264**:747-754.
- Cook J. y Rasplus J-Y. 2003. Mutualism with attitude: coevolving fig wasps and figs. *TRENDS in Ecology and Evolution*. **18**:241-248.
- Corlett R. T. 1986. The phenology of *Ficus fistulosa* in Singapore. *Biotropica* **19**:122-124.
- Cushman J. H., Compton S. G., Zachariades C., Ware A. B., Nefdt R. J. C., Rashbrook V. K. 1998. Geographic and taxonomic distribution of positive interaction: ant-tended homopterans indirectly benefit figs across southern Africa. *Oecologia* **116**:373-380.
- Damstra K. S. J., Richardson S., Reeler B. 1996. Synchronized fruiting between trees of *Ficus thonningii* in seasonally dry habitats. *Journal of Biogeography* **23**:495-500.
- Davies A. J., Sutton S. L. 1997. A dung beetle that feeds on fig: implications for the measure of species rarity. *Journal of Tropical Ecology* **13**:759-766.
- De Figueiredo R. A. 1993. Ingestion of *Ficus enormis* seeds by howler monkeys (*Alouatta fusca*) in Brazil: effects on seed germination. *Journal of Tropical Ecology* **9**:541-543.
- Frank S. A. 1985. Are mating and mate competition by the fig wasp *Pegoscarpus assuetus* (Agaonidae) random within a fig?. *Biotropica* **17**:170-172.
- Frank S. A. 1989. Ecological and evolutionary dynamics of fig communities. *Experientia* **45**: 674-680.
- Funk V. A. & Brooks, D.R. 1990. Phylogenetic Systematics as the basis of comparative biology. Smithsonian Institution Press. Washington. 45 pp.
- Galil J., Eisikowitch D. 1968. On the pollination ecology of *Ficus sycomorus* in east African. *Ecology* **49**:259-269.

- Gibernau M., Hossaert M. M., Anstett M. C., Kjellberg F. 1996. Consequences of protecting flowers in a fig: a one-way trip pollinators? *Journal of Biogeography* **23**: 425-432.
- Grisón-Pigé L., Bessiere J-M., Hossaert-MacKey. M. 2002. Specific attraction of fig-pollinating wasps: role volatile compounds released by tropical figs. *Journal of chemical Ecology* **28**:282-295.
- Harrison R.D. 2003 Fig wasp dispersal and the stability of a keystone plant resource in Borneo. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* **270** Suppl 1: S76-9.
- Hawkins B. A., Compton S. G. 1992. African fig wasp communities: undersaturation and latitudinal gradients in species richness. *Journal of Animal Ecology* **61**:361-372.
- Herre E. A. 1985. Sex ratio adjustment in fig wasps. *Science* **228**:896-898.
- Herre E. A. 1987. Optimality, plasticity and selective regime in fig wasp sex ratio. *Nature* **329**:627-629.
- Herre E. A. 1989. Coevolution of reproductive characteristics in 12 species of New World figs and their pollinators wasps. *Experientia* **45**:637-647.
- Herre E. A. 1996. An overview of studies on Panamian figs. *Journal of Biogeography* **23**:593-607
- Herre E. A., Machado C. A., Bermingham E., Nason J. D., Windsor D. M., McCafferty S. S. 1996. Molecular phylogenies of fig and their pollinators wasp. *Journal of Biogeography* **23**:521-530.
- Herre E. A., West S. A. 1997. Conflict of interes in a mutualism: documenting the elusive fig wasp-seed trade-off. *Proc. R. Soc. Lond. B* **264**:1501-1507.
- Herre E. A., Knowlton N., Mueller U. G., Rehner S. A. 1999. The evolution of mutualism: exploring the paths between conflict and cooperation. *TREE* **14**:49-53.
- Heywood V. W. 1988. Las plantas con flores. Reverté. Barcelona.
- Holland J. N., De Angelis D.L, Schultz, S.T. 2004. Evolutionary stability of mutualism: interspecific population regulation as an evolutionary stable strategy. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **271**:1807-1814.
- Horn M. H. 1997. Evidence for dispersal of fog seeds by the fruit-eating characid fish *Brycon guatemalensis* Regan in Costa Rican tropical rain forest. *Oecologia* **109**:259-264.
- Ibarra-Manríquez G. 1990. Taxonomía del género *Ficus*, subgénero *Pharmacosycea* (Moraceae en Veracruz, México. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. México.

- Ibarra-Manríquez G. 1991. *Ficus* (Moraceae) Un género interesante para estudios en ecología y sistemática tropical. *Ciencia* **42**:283-293.
- Janzen D. A. 1979. How to be a fig. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **10**:13-51
- Janzen D. A. 1981. *Ficus ovalis* seed predation by an orange-chinned parakeet (*Brotogeris jugularis*) in Costa Rica. *Auk* **98**:841-844.
- Jermy T. 1984. Evolution of insect/host plant relationships. *Am. Nat.* **124**:609-630.
- Jousselin E., Hossaert-McKey M., Vernet D., Kjellberg F. 2001. Egg deposition patterns of fig pollinating wasps: implications for studies on the stability of the mutualism. *Ecological Entomology* **26**: 602-608.
- Kalko E. K., Herre E. A., Handley Jr. C. O. 1996. Relation of fig fruit characteristics to fruit-eating bats in the New and Old World tropics. *Journal of Biogeography* **23**:565-576.
- Kerdelhué C., Rasplus J. Y. 1996. Non-pollinating Afrotropical fig wasps affect the fig-pollinator mutualism in *Ficus* within the subgenus *Sycomorus*. *Oikos* **75**: 3-14.
- Kerdelhué C., Rasplus J. Y. 1996b. The evolution of dioecy among *Ficus* (Moraceae): an alternative hypothesis involving non-pollinating fig wasps pressure on the fig-pollinator mutualism. *Oikos* **77**:163-166.
- Kerdelhué C., Hochberg M. E., Rasplus J. Y. 1997. Active pollination of *Ficus sur* by two sympatric fig wasp species in west African. *Biotropica* **29**(1): 69-75.
- Kerdelhue, C., Clainche, I., Rasplus, J-Y. 1999. Molecular phylogeny of the Ceratolasen species pollinating *Ficus* of the subgenus *Sycomurus* sensu stricto: Biogeographical history and origins of the species-specificity breakdown cases. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **11**:401-414.
- Khadari B., Gibernau M., Anstett M-C., Kjellberg F., Hossaert-McKey M. 1995. When figs wait for pollinators: the length of fig receptivity. *American Journal of Botany* **82**:992-999.
- Kinoshita M., Kasua E., Yahara T. 1998. More highly female-biased sex ratio in fig wasp, *Blastophaga nipponica* Grandi (Agaonidae). *Res. Popul. Ecol.* **40**:239-242.
- Kjellberg F., Gouyton P-H., Ibahim M., Raymond M., Valdeyron G. 1987. The stability of the symbiosis between dioecious figs and their pollinators: a study of *Ficus carica* L. and *Blastophaga psenes* L. *Evolution* **41**:693-704.
- Kjellberg F., Maurice S. 1989. Seasonality in the reproductive phenology of *Ficus*. Its evolution and consequences. *Experientia* **45**:653-660.
- Lachaise D., Tsacas L., Couturier G. 1982. The Drosophilidae associates with tropical african figs. *Evolution* **36**:141-151.

- Lambert F. R. 1988. Pigeons as seed predators and dispersers of figs in a Malasian lowland forest. *IBIS* **131**:521-527.
- Lambert F. R. 1991. The conservation of fig-eating birds in Malaysia. *Biological Conservation* **58**:31-40.
- Lambert F. R., Marshall A. G. 1991. Keystone characteristics of bird-dispersed *Ficus* in a Malasian lowland rain forest. *Journal of Ecology* **79**:793-809.
- Lambert F. R. 1992. Fig dimorfism in bird-dispersed gynodioecious *Ficus*. *Biotropica* **24**:214-216.
- Machado C. A., Herre E.A., McCafferty S., Bermingham E. 1996. Molecular phylogenies of fig pollinating and no-pollinating wasps and the implications for the origin and evolution of fig-fig wasp mutualism. *Journal of Biogeography* **23**:531-542.
- Machado C.A., Jusselin E., Kjellberg F., Compton, G. y Herre E. A. 2001. Phylogenetic relationships, historical biogeography and character evolution of fig-pollinating wasps. *Proc. R. Soc. Lond. B.* **268**:685-694.
- Machado y cols 2000.
- McKey D. 1989. Population biology of figs: Applications for conservation. *Experientia* **45**:661-673.
- Michaloud G., Carrière S., Kobbé M. 1996. Exceptions to the one:one relationship between African fig trees and their pollinators: possible evolutionary scenarios. *Journal of Biogeography* **23**:513-520.
- Milton K., Windsor D. M., Morrison D.W., Estriba M. A. 1982. Fruiting phenologies of two neotropical *Ficus* species. *Ecology* **63**:752-762.
- Moll D., Jansen K. P. 1995. Evidence for a role in seed dispersal by two tropical herbivorous turtles. *Biotropica* **27**:121-127.
- Molbo D., Machado, C., Sevendter J., Keller L. Herre E. 2003. Cryptic species of fig-pollinating wasps: implications for the evolution of the fig-wasp mutualism, sex, allocation. And precision of adaptation. *PNAS* **100**(10): 5867-5872.
- Nason J. D., Herre E. A., Hamrick J. L. 1996. Paternity analysis of the breeding structure of strangler fig population, evidence for substantial long-distance wasp dispersal. *Journal of Biogeography* **23**:501-512.
- Nason J. D., Herre E. A., Hamrick J. L. 1998. The breeding structure of tropical keystone plant resource. *Nature* **391**:685-687.
- Nefdt R. J. C., Compton S. G. 1996. Regulation of seed and pollinator production in the fig-fig wasp mutualism. *Journal of Animal Ecology* **65**:170-182.
- Patel A., Anstett M-C., Hossaert-McKey M., Kjellberg F. 1995. Pollinators entering female dioecious figs: why commit suicide?. *J. Evol. Biol.* **8**: 301-313.

- Patel A. 1996. Variation in a mutualism: phenology and the maintenance of gynodioecy in two Indian fig species. *Journal of Ecology* **84**:667-680.
- Patel A. 1997. Phenological patterns of *Ficus* in relation to other forest trees in southern India. *Journal of Tropical Ecology* **13**:681-695.
- Patel A., McKey D. 1998. Sexual specialization in two tropical dioecious figs. *Oecologia* **115**:391-400.
- Patiño S., Herre E. A., Tyree M. T. 1994. Physiological determinants of *Ficus* fruit temperature and implications for survival of pollinator wasp species: comparative physiology through an energy budget approach. *Oecologia* **100**:13-20.
- Ramírez B. W. 1970. Taxonomic and biological studies of neotropical fig wasps (Hymenoptera: Agaonidae). *The University of Kansas Science Bulletin* **49**:1-44.
- Sánchez-Cordero V., Martínez-Gallardo R. 1998. Postdispersal fruit and seed removal by forest-dwelling rodents in a lowland rainforest in Mexico. *Journal of Tropical Ecology* **14**:139-151.
- Shanahan M., So S., Compton S.G., Corlett R. 2001 Fig-eating by vertebrate frugivores: a global review. *Biol Rev Camb Philos Soc.* **76**(4): 529-72.
- Slater J. A. 1972. Lygaeid Bugs (Hemiptera: Lygaeidae) as predators of figs. *Biotropica* **4**:145-151.
- Smith C. M., Bronstein J. L. 1996. Site variation in reproductive synchrony in three neotropical figs. *Journal of Biogeography* **23**:477-486.
- Spencer H. S., Weiblen G., Flick B. 1996. Phenology of *Ficus variegata* in a seasonal wet tropical forest at Capa Tribulation, Australia. *Journal of Biogeography* **23**:467-476.
- Thomas D. W. 1986. The influence of aggressive ants on fruit removal in the tropical tree, *Ficus capensis* (Moraceae). *Biotropica* **20**:49-53.
- van Noort S., Compton S. G. 1996. Convergent evolution of agaonine and sycoecine (Agaonidae, Chalcidoidea) head shape in response to the constraints of host fig morphology. *Journal of Biogeography* **23**:415-424.
- Verkerke W. 1989. Structure and function of the fig. *Experientia.* **45**:612-621.
- Ware A. B. y Compton S. G. 1992. Breakdown of pollinator specificity in an African fig tree. *Biotropica* **24**:544-549.
- Weiblen G., Flick B., Spencer H. 1995. Seed set and wasp predation in dioecious *Ficus variegata* from an Australian wet tropical forest. *Biotropica* **27**:391-394.
- Weiblen G. y Bush G. 2002. Speciation in fig pollinators and parasites. *Molecular Ecology.* **11**:1573-1578.

- West S. A., Herre E. A., Windsor D. M., Green P. R. S. 1996. The ecology and evolution of the New World non-pollinating fig wasp communities. *Journal of Biogeography* **23**:447-458.
- Wiebes J. T. 1979. Co-evolution of figs and their insects pollinators. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **10**:1-12.
- Windsor D. M., Morrison D. W., Estribi M. A., de León B. 1989. Phenology of fruit and leaf production by strangler figs on Barro Colorado Island, Panamá. *Experientia* **45**:647-653.



Biogeography and conservation of the genus *Ficus* (Moraceae) in Mexico

Alejandra Serrato, Guillermo Ibarra-Manríquez* and Ken Oyama

Centro de Investigaciones en Ecosistemas,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Morelia, Michoacán, México

ABSTRACT

Aim The main objective of this study is to document the biogeographical patterns, endemism and degree of conservation of the species of *Ficus* (Moraceae) in Mexico. There are over 750 species of the genus *Ficus* distributed worldwide, and Mexico practically represents its northernmost limit in the American continent. Detailed studies at regional scales may help to understand the biogeography of large genera such as *Ficus*.

Location Mexico.

Methods The biogeographical patterns of Mexican *Ficus* were obtained from information of fig specimens available in two of the main herbaria of Mexico (2140 vouchers), collecting figs throughout this country, and revising the specialized literature. The presence of each species of *Ficus* was recorded for every one of Mexico's states and several tropical countries of America. Besides, the Mexican territory was divided into cells of $1^\circ \times 1^\circ$ and the presence or absence of all species of the genus was recorded. Rarity of species was classified based on the width of geographic distribution, habitat specificity and population size.

Results A total of 21 species of *Ficus* occur in Mexico, including six species (28.6%) that are endemic to this country. Five species are included in subgenus *Pharmacosycea* and 16 species are documented under subgenus *Urostigma*. Affinities of *Ficus* flora with other tropical countries in America generally decreased as geographical distances from Mexico increased. Mexican states and cells with highest values of *Ficus* species richness (both total and endemic species) were located. Ten species, including three endemics, presented a wide distribution. Five species, including two endemics, possess the three attributes of rarity (narrow geographical distribution, high habitat specificity and scarce local populations). Three species of *Ficus*, including the endemic and very rare *Ficus lapathifolia* (Liebm.) Miq., are not recorded in any protected area existing in Mexico.

Main conclusions Most of the Mexican *Ficus* show a great morphological variation and occupy different habitats along their geographic distribution. The biogeographical patterns described here establish a fundamental scenario for ongoing studies on *Ficus*–pollinator interactions. However, many local populations are considered to be at risk, as there have been significant reductions in the number and size of local populations. Further studies are needed to understand the process of colonization, maintenance and persistence of fig–pollinator mutualism in species with different patterns of geographic distribution. Mexican *Ficus* require special policies for conservation due to their complex degree of rarity, particularly their geographic distribution in different types of vegetation, ranging from dry scrublands to tropical rain forests.

Keywords

Biogeography, *Ficus*, Moraceae, distribution, endemism, conservation, rarity, tropics, Mexico.

*Correspondence: Guillermo Ibarra-Manríquez,
Centro de Investigaciones en Ecosistemas,
Universidad Nacional Autónoma de México,
Antigua Carretera a Pátzcuaro No. 8701,
Col. San José de la Huerta, C.P. 58190, Morelia,
Michoacán, México.
E-mail: gibarra@oikos.unam.mx

INTRODUCTION

Fig trees (*Ficus* spp., Moraceae) and their pollinators are currently attracting unprecedented attention. This genus includes more than 750 species distributed in the tropical and subtropical regions of the world (Corner, 1962; Berg, 1989). The genus *Ficus* is classified into four subgenera (Berg, 1989): *Ficus* with c. 350 species distributed in Africa, Asia, Australasia and the Mediterranean; *Pharmacosycea* with c. 75 species in Africa, America, Asia and Australasia; *Sycomorus* with 13 species in Africa and Asia; and *Urostigma* with c. 280 species in Africa, America, Asia and Australasia. Except for some cases (Michaloud *et al.*, 1996; López-Vaamonde *et al.*, 2002; Molbo *et al.*, 2003), most *Ficus* species rely on a specific wasp species (Hymenoptera, Chalcidoidea, Agaoninae, Agaonidae) for pollination. In turn, the pollinator wasp reproduces only on a particular species of *Ficus*, implying strong coevolutionary relations (Janzen, 1979; Wiebes, 1979, 1986; Herre, 1989; Compton *et al.*, 1996; Anstett *et al.*, 1997). For instance, phenological studies on *Ficus* suggest that constant flower and fruit production throughout the year should be maintained to avoid the local extinction of pollinators (Milton *et al.*, 1982; Anstett *et al.*, 1995; Mawdsley *et al.*, 1998).

Despite the great interest to know the evolutionary relationships between *Ficus* and wasps of the world, systematic studies on American species of *Ficus* are scarce. Currently, there are many unsolved taxonomical problems in both subgenera *Pharmacosycea* (c. 20 species) and *Urostigma* (c. 120 species) (Berg & Simonis, 1981; Berg, 1989). Mexico represents practically the northernmost distributional limit of the genus in the Neotropics (although *Ficus aurea* Nutt. and *Ficus citrifolia* P. Mill. are native species recorded in Florida, USA; Nelson, 1994) but very few systematic studies exist on Mexican *Ficus* (Standley, 1922; Ibarra-Manríquez & Wendt, 1992; Quintana & Carvajal, 2001).

Detailed studies to obtain biogeographical patterns of large taxonomic groups such as *Ficus* at regional or local scales are very important to understand their evolutionary and biogeographic histories as well as to evaluate their status of conservation (e.g. Brown & Lomolino, 1998). In this paper, we present information on the species of Mexican *Ficus* and their patterns of geographic distribution to (1) detect regions with high species richness, (2) estimate the degree of endemism and (3) determine the type of rarity and degree of conservation of each species.

STUDY AREA

Mexico has an area of two million square kilometres and is divided into 32 states that differ in size and the range of ecological environments represented in them (Fig. 1 and Table 1). The country has a very complex topography, with 67% of the continental surface lying above 500 m of altitude and 50% over 1000 m. Ferrusquía-Villafranca (1993) divides the country into 17 geological regions, the oldest ones dating

from the Paleozoic. Based on the climatic classification of Köppen, García (1988) states that all main climates of the Earth (except boreal climate D) exist in Mexican territory. In terms of vertebrates and flowering plants, Mexico is situated among those countries with major species diversity and endemism of the world (Mittermeir, 1988; Rzedowski, 1991a,b; Ramamoorthy *et al.*, 1993), distributed in at least 14 vegetation types that range from xerophytic shrublands to tropical evergreen forests (Rzedowski, 1986).

METHODS

The herbarium specimens of the two most important herbaria of Mexico (ENCB, MEXU) were revised because it is expected that their collections include the whole geographical range of Mexican *Ficus*. Basic taxonomy and identification of each voucher was revised to avoid misidentifications and synonyms. This activity was done based on personal experience (e.g. Ibarra-Manríquez & Wendt, 1992) and published taxonomic and flora reports (Berg & Simonis, 1981; Berg *et al.*, 1984; Balick *et al.*, 2000; Quintana & Carvajal, 2001). In addition, information published in tropical floras was used to assess the limits of geographic distribution and endemism of species of *Ficus* (Woodson & Schery, 1960; Adams, 1972; Molina, 1975; Burger, 1977; Berg & Simonis, 1981; Vázquez, 1981; Berg *et al.*, 1984; Bisse, 1988; Carauta, 1989; Ibarra-Manríquez & Wendt, 1992; Brako & Zarucchi, 1993; Hartshorn & Poveda, 1993; Killeen *et al.*, 1993; Nelson, 1994; Ibarra-Manríquez & Sinaca, 1996; Carauta *et al.*, 1996; Liogier, 1996; Jørgensen & León-Yáñez, 1999; Balick *et al.*, 2000; Quintana & Carvajal, 2001). A data base was made containing information of each species of *Ficus* including locality (state, town and geographical coordinates), altitude and vegetation type following Rzedowski's classification (1986). To evaluate areas with major species richness of *Ficus* and their geographical distribution ranges, the territory of Mexico was divided into 253 cells of 1° × 1°. The presence or absence of each species of the genus in each cell was recorded.

Using the rarity classification of Rabinowitz *et al.* (1986), who proposed eight categories based on simultaneous information of geographic range (wide or narrow), habitat specificity (broad or restricted) and local population size (large or small), an evaluation of rarity for all species of Mexican *Ficus* was done. Categories of geographical range were assigned according to the number of cells in which *Ficus* species were found: species with a narrow range are those located in less than 19 cells, equivalent to 25% of the maximum number of cells occupied by *Ficus pertusa* L.f. To determine the category of habitat specificity, we considered the number of vegetation types to which a species has been associated, using as a reference *F. pertusa*, which occurs in eight vegetation types. Species with a restricted habitat are located in one to three vegetation types. Local population size is a very difficult trait to evaluate without demographic information. Hence, a *Ficus* species with a small local population was defined as having less than 96 specimens

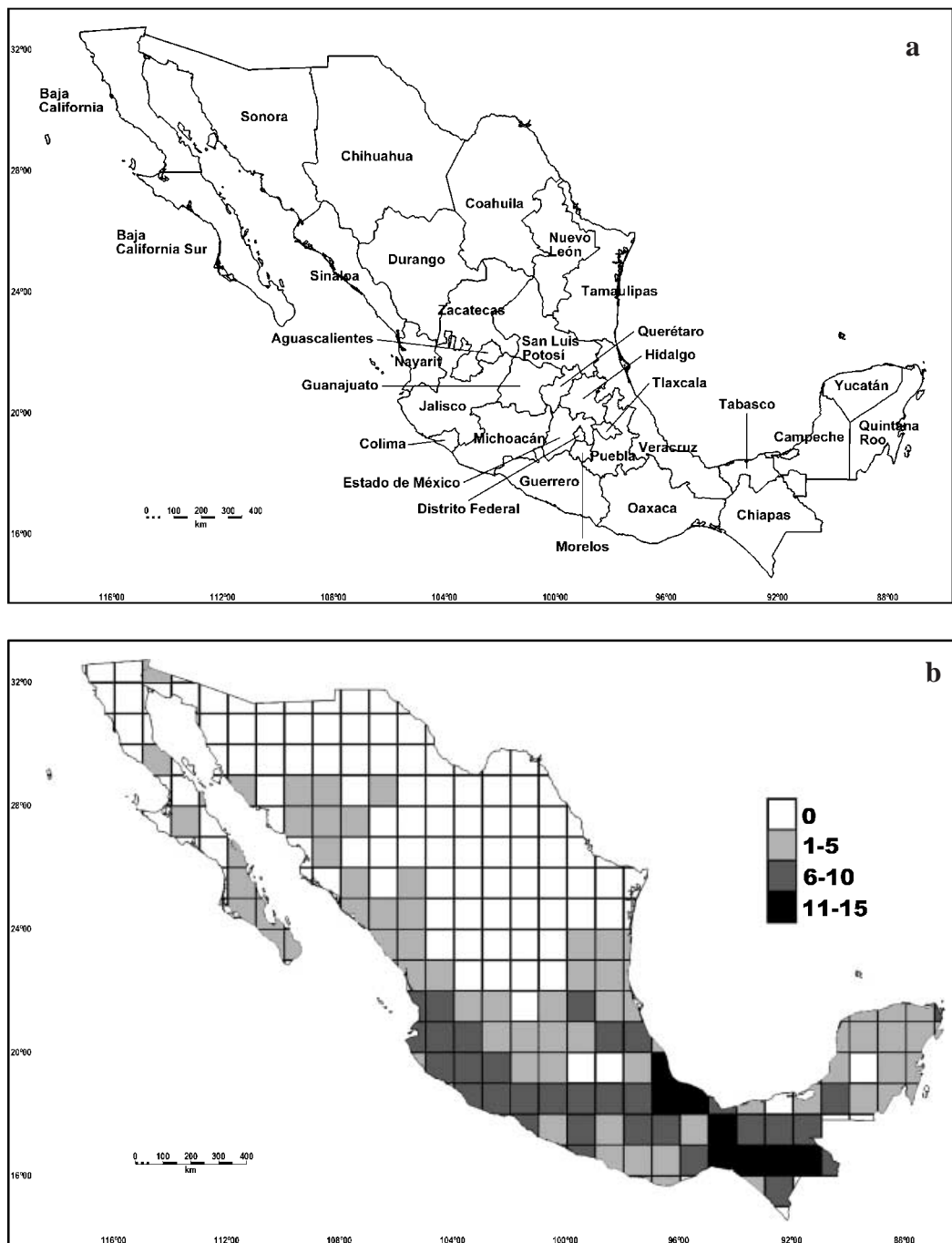


Figure 1 (a) Political divisions of Mexico and (b) *Ficus* species richness categories in cells of $1^{\circ} \times 1^{\circ}$.

collected in different localities. This value represents 25% of the maximum number of records for *F. pertusa*, which possesses the maximum number of records (384). Finally, to determine the conservation status of *Ficus* species in Mexico, we revised the available checklists of vascular flora of the National System of Protected Areas as well as vouchers collected in these areas, and verified which species of *Ficus* were recorded in them (Table 1).

RESULTS AND DISCUSSION

Based on 2140 herbarium specimens and visits to different localities in 16 states of Mexico, we recorded 21 species of *Ficus*. Five species belong to the subgenus *Pharmacosycea* and 16 species to *Urostigma* (Table 1). A total of 15 species extend their geographic distribution into Central America, 11 species are found from Mexico to South America and seven species

Table 1 Species names (endemic species in bold) and location in protected areas in parentheses for *Ficus* genus located in Mexico. The geographical distribution in America and Mexico (number of states, grid cells 1° × 1°, and vouchers), vegetation types according to Rzedowski (1986) and altitudinal ranges are provided for each species. Species that belong to the subgenus *Pharmacosycea* are indicated by asterisk (*)

Species (protected areas)	Distribution in America	Distribution in Mexico (states/cells/vouchers)	Vegetation types	Altitudinal range (m)
<i>Ficus americana</i> Aubl. ^(1,9)	Mx, CA, SA, WI	5/8/22	Aq, Ok, Dc, Ev	150–1300
* <i>Ficus apollinaris</i> . Dugand ⁽⁹⁾	Mx, CA, SA	5/10/44	Aq, Cl, Ev, Se	10–1128
<i>Ficus aurea</i> Nutt. ^(2,5,7,9)	Fl, Mx, CA	10/17/70	Aq, Cl, Dc, Ev, Se	0–1700
<i>Ficus calyculata</i> P. Mill. ^(2,7,12)	Mx	12/23/107	Aq, Cl, Co, Ok, Dc, Ev, Se	0–2433
<i>Ficus citrifolia</i> P. Mill.	Fl, Mx, CA, SA, WI	7/15/30	Aq, Cl, Co, Dc, Se	4–940
<i>Ficus colubrinae</i> Standley ⁽⁹⁾	Mx, CA, SA	3/12/37	Aq, Cl, Co, Dc, Ev	130–1700
<i>Ficus cotinifolia</i> Kunth ^(1,2–4,6,7,10,11)	Mx, CA	22/67/337	Aq, Du, Co, Ok, Dc, Ev, Se, Xe	0–1850
<i>Ficus glyxicarpa</i> (P. Mill.) P. Mill. ^(2–4)	Mx	12/31/86	Aq, Cl, Co, Ok, Dc, Ev	100–2200
* <i>Ficus insipida</i> Willd. ^(2,3,6,7,9)	Mx, CA, SA, WI	21/60/247	Aq, Co, Ok, Dc, Ev, Se	0–1750
* <i>Ficus lapathifolia</i> (Liebm) Miq.	Mx	4/7/27	Aq, Cl, Ev, Se	70–1800
* <i>Ficus maxima</i> P. Mill. ^(1,2,6,7,9–11)	Mx, CA, SA, WI	14/45/163	Aq, Ok, Dc, Ev, Se	0–2416
<i>Ficus obtusifolia</i> Kunth ^(3,5–7,9,10)	Mx, CA, SA	19/49/148	Aq, Cl, Co, Ok, Dc, Ev, Se	0–1300
<i>Ficus ovalis</i> (Liebm.) Miq. ^(10,11)	Mx, CA	6/11/37	Aq, Du, Dc, Ev, Se	0–350
<i>Ficus palmeri</i> S. Wats. ⁽⁸⁾	Mx	3/12/45	Aq, Dc, Xe	30–1200
<i>Ficus paraensis</i> (Miq.) Miq. ⁽⁹⁾	Mx, CA, SA	2/3/5	Ev	150–300
<i>Ficus pertusa</i> L.f. ^(1–3,7,9,11)	Mx, CA, SA, WI	24/77/384	Aq, Cl, Co, Dc, Ok, Ev, Se, Xe	0–2000
<i>Ficus petiolaris</i> Kunth ^(4,7)	Mx	15/29/90	Aq, Co, Ok, Dc, Se, Xe	0–1960
<i>Ficus pringlei</i> Standley ⁽⁷⁾	Mx	6/12/28	Aq, Ok, Dc	50–1850
<i>Ficus trigonata</i> L. ^(1–7,9–11)	Mx, CA, SA, WI	19/54/176	Aq, Co, Du, Ok, Dc, Ev, Se	0–2016
<i>Ficus turrialbana</i> Burger	Mx, CA	7/9/12	Aq, Dc, Ev	130–1200
* <i>Ficus yoponensis</i> Desv. ⁽⁹⁾	Mx, CA, SA, WI	2/10/45	Ev, Se	40–1020

Abbreviations: Protected areas: (1) Reserva de la Biosfera Sian Ka'an (Durán & Olmsted, 1987), (2) Reserva Estatal de 'El Jabalí' (Sanders, 1992), (3) Estación Biológica Chamela (Lott, 1993), (4) Reserva de la Biosfera Tehuacán (Dávila *et al.*, 1993), (5) Estación Biológica Chajul (Martínez *et al.*, 1994), (6) Reserva Ecológica Sierra de San Juan (Téllez *et al.*, 1995), (7) Reserva de la Biosfera Sierra de Manantlán (Vázquez *et al.*, 1995), (8) Reserva de la Biosfera 'El Vizcaino' (León *et al.*, 1995), (9) Estación de Biología Tropical 'Los Tuxtlas' (Ibarra-Manríquez & Sinaca, 1996), (10) Reserva Especial de la Biosfera Ría Celestún (Durán *et al.*, 1999a), (11) Reserva Especial de la Biosfera Ría Lagartos (Durán *et al.*, 1999b), (12) Reserva 'El Triunfo' (record from data base). Continental distribution: CA, Central America; Fl, Florida, USA; Mx, Mexico; SA, South America; WI, West Indies. Vegetation types: Aq, aquatic or subaquatic vegetation; Cl, cloud forest; Co, coniferous forest; Du, dunes; Ok, oak forest; Dc, tropical deciduous forest; Ev, tropical evergreen forest; Se, tropical semi-evergreen forest; Xe, xerophytic shrubland.

share their distribution between Mexico and the West Indies; six species (28.6%) are endemic to Mexico. This percentage of endemism is remarkable because in some regions like as Cameroon, Gabon or Malaysia, *Ficus* species are usually wide-ranging with low rates of endemism (McKey, 1989). In fact, there are no reports of endemism for countries such as Argentina (Vázquez, 1981), Belize (Balick *et al.*, 2000), Dominican Republic (Liogier, 1996) or Jamaica (Adams, 1972). Contrary of this situation, Berg (1990) mentioned that the Mascarene Islands, Madagascar and the Comoro Islands (Africa) displayed 60%, 58.3% and 12.5% of endemism, respectively, without offering any argument to explain these figures. The high level of endemism of *Ficus* in Mexico could be explained by the great heterogeneity of climates, physiography, soils and the geological history of this country. All these factors have been proposed by Rzedowski (1991a,b) to explain the high levels of endemism of the entire Mexican flora (c. 50% of more than 20,000 species).

The geographic distribution of *Ficus* species in Mexico shows very diverse patterns, from wide to narrow ranges

assessed by both presence in states or cells (Figs 1 & 2). Some species are restricted to a few states (e.g. *Ficus palmeri* S. Wats. and *Ficus paraensis* Miq.) while others are found in more than 20 states (*Ficus cotinifolia* Kunth or *Ficus insipida* Willd.) (Table 1). *Ficus* species are distributed throughout the states of Mexico, with the exception of Nuevo Leon, Tlaxcala and Mexico City. The states with the highest number of *Ficus* species are located in the southeastern part of Mexico, between 16–20°N and 91–98°W. A total of 20, 19 and 18 species, respectively, are found in the states of Veracruz, Chiapas and Oaxaca. Veracruz and Oaxaca are also important localities harbouring four endemic species each. The same number of endemics is also found in the states of Jalisco and Puebla. Tropical evergreen rain forests and cloud forests dominate the region with the highest richness of fig species (states of Veracruz, Oaxaca, and Chiapas) (Fig. 1). This region is part of the Mesoamerican region (from southeast Mexico to Panama), which is characterized by high endemism and plant diversity (e.g. Rzedowski, 1991a,b; Wendt, 1993). These patterns are noteworthy if we assume that the present distribution of

Mexican rain forests is a recent phenomenon (Graham, 1975, 1982), formed by ancestral lineages of Eocene rain forests as well as recent immigrations of South American taxa (Wendt, 1993). *Ficus* has recently radiated and dispersed from the Indo-Malaysian region into the Neotropics (Berg, 1983). Even though the oldest paleontological records of Moraceae date from the Eocene (Tiffney, 1986), the origin of fig–wasp mutualism is older and pre-dates the earliest fossils of *Ficus*. A recent molecular study showed that the ancestors of Neotropical *Pharmacosycea* figs and *Tetrapus* wasps arose c. 90 Ma when the continents were joined as Gondwana, and that the *Urostigma* figs and *Pegoscopus* arrived from Africa c. 55 Ma (Machado *et al.*, 2001).

The coast of the Pacific Region in Mexico is dominated by tropical deciduous forests. These forests are considered as an important biogeographical area harbouring many endemic species and a high richness of species (Lott, 1993; Ceballos & García, 1995; Gentry, 1995). In the case of *Ficus*, this diversity is not reflected by the number of species of the genus, but in the remarkable number of endemics distributed in this area (four out of six endemic species occur in this region): *Ficus glyxicarpa* P. Mill. located in the southeastern part of the region (Fig. 2i), *F. palmeri*, restricted to the northwestern part of the Peninsula of Baja California and surrounding areas (Fig. 2o), *Ficus petiolaris* Kunth, occurring all through the Pacific region (Fig. 2r), and *Ficus pringlei* Standley, found in the centre of the states of Jalisco, Colima and Michoacan (Fig. 2s).

Ten Mexican fig species (Fig. 2 and Table 1) with different population sizes have wide geographic distributions, including three endemics. The species of *Ficus* also occupy a wide altitudinal range, from 0 to 2433 m, which is similar to the *Ficus* flora of Costa Rica (Burger, 1977). Some species, like *Ficus calyculata* P. Mill., are distributed along the genus' altitudinal range, but others, such as *Ficus ovalis* (Liebm.) Miq. and *F. paraensis*, are restricted to a range that goes from sea level to 350 m. Likewise, location according to vegetation types varied among species (Table 1). *Ficus pertusa* and *F. cotinifolia* can be found in eight of the 14 vegetation types recognized by the classification of Rzedowski (1986), and six species are found in six or seven vegetation types. In contrast, *F. paraensis* is restricted to tropical evergreen forests. Most of the *Ficus* species in the world are found in tropical regions and secondary vegetation (McKey, 1989). In Mexico, 19 species of *Ficus* have been found in tropical evergreen forests, 17 in riparian forests and 12 in secondary forests. The number of species decreases drastically for arid regions, with only three species found in xerophytic shrublands. *Ficus* are common in moderately to strongly disturbed sites, such as riparian edges, edges of secondary forests, along roads, temporal agricultural fields or cattle ranches; only some species are relatively frequent in mature forests like tropical rain forests (e.g. *F. aurea* or *Ficus yoponensis* Desv.), cloud forest (e.g. *F. calyculata*) or tropical deciduous forests (e.g. *F. cotinifolia*).

Berg (1983) considered that geographic and ecological isolation, reproductive vigour and age of species might explain the distributional ranges of *Ficus* species. In particular, the

amplitude of the geographic distribution of this genus may be explained by the fruits dispersed by many species of wide-ranging frugivores and dispersers (e.g. Milton *et al.*, 1982; Anstett *et al.*, 1995; Herre, 1996; Kalko *et al.*, 1996; Mawdsley *et al.*, 1998; Korine *et al.*, 2000; Shanahan *et al.*, 2001). However, colonization and establishment of new individuals in new habitats have important implications given the particular reproduction form of *Ficus*. The maintenance and persistence of new populations of *Ficus* depend on the flowering synchronization among trees in order to coincide with the short life span of species-specific pollinators. It is unknown how the one-to-one interaction between a fig species and a pollinator has been maintained in species of *Ficus* that have successfully colonized different habitats at different altitudes and latitudes. Even though it has been observed that for most Mexican *Ficus* species of wide distribution there is specificity of pollinators, in many local populations there have been fruits found without wasps (K. Oyama, unpubl. data). It is unknown whether these local populations without wasps are of recent origin or are an expression of the failure of species-specific pollinators to follow the migrating and colonizing fig plants. It is also important to know if the remaining forest fragments are still connected and maintain gene flow. The point here is that *Ficus* and wasps are dependent on one another for reproduction, but they are dispersed independently. Long-distance dispersal for both *Ficus* and wasps has been documented (McKey, 1989; Kalko *et al.*, 1996; Nason *et al.*, 1998; Korine *et al.*, 2000), but there is little evidence that demonstrates and quantifies the dispersal distance. For agaoiid wasps, Nason *et al.* (1996) used genetic markers and showed that wasps can routinely move up to 10 km.

Furthermore, *Ficus* species with wide distribution in Mexico have been subject to taxonomical uncertainties because many species present high morphological variation. Some taxonomists grouped similar species in groups or complexes (De Wolf, 1965; Berg & Simonis, 1981; Berg, 1989; Ibarra-Manríquez & Wendt, 1992; Machado *et al.*, 2001; López-Vaamonde *et al.*, 2002; Molbo *et al.*, 2003), while others recognize different species or subspecies for some local or regional variants (e.g. Burger, 1974; Quintana & Carvajal, 2001). We found that some of the species' complexes did not present too much variation in Mexico, although we recognize that this variation could be present within the whole range of the species distribution. This latter situation is showed by *Ficus americana* Aubl. and *Ficus obtusifolia* Kunth, which are easily distinguished, based on diagnostic characters, within their range of distribution in Mexico, but these species can be confounded in Central and South America with other species such as *Ficus guianensis* Desv. and *Ficus nymphaeifolia* P. Mill., respectively. Conversely, some Mexican species have high morphological variation that causes it to overlap with other species like *F. aurea*, which some authors split their populations in *Ficus isophlebia* Standley, *Ficus jimenezii* Standley, or *Ficus tuerckheimii* Standley (Standley, 1917). Actually, these species are included in *F. aurea* complex (Berg, 1989).

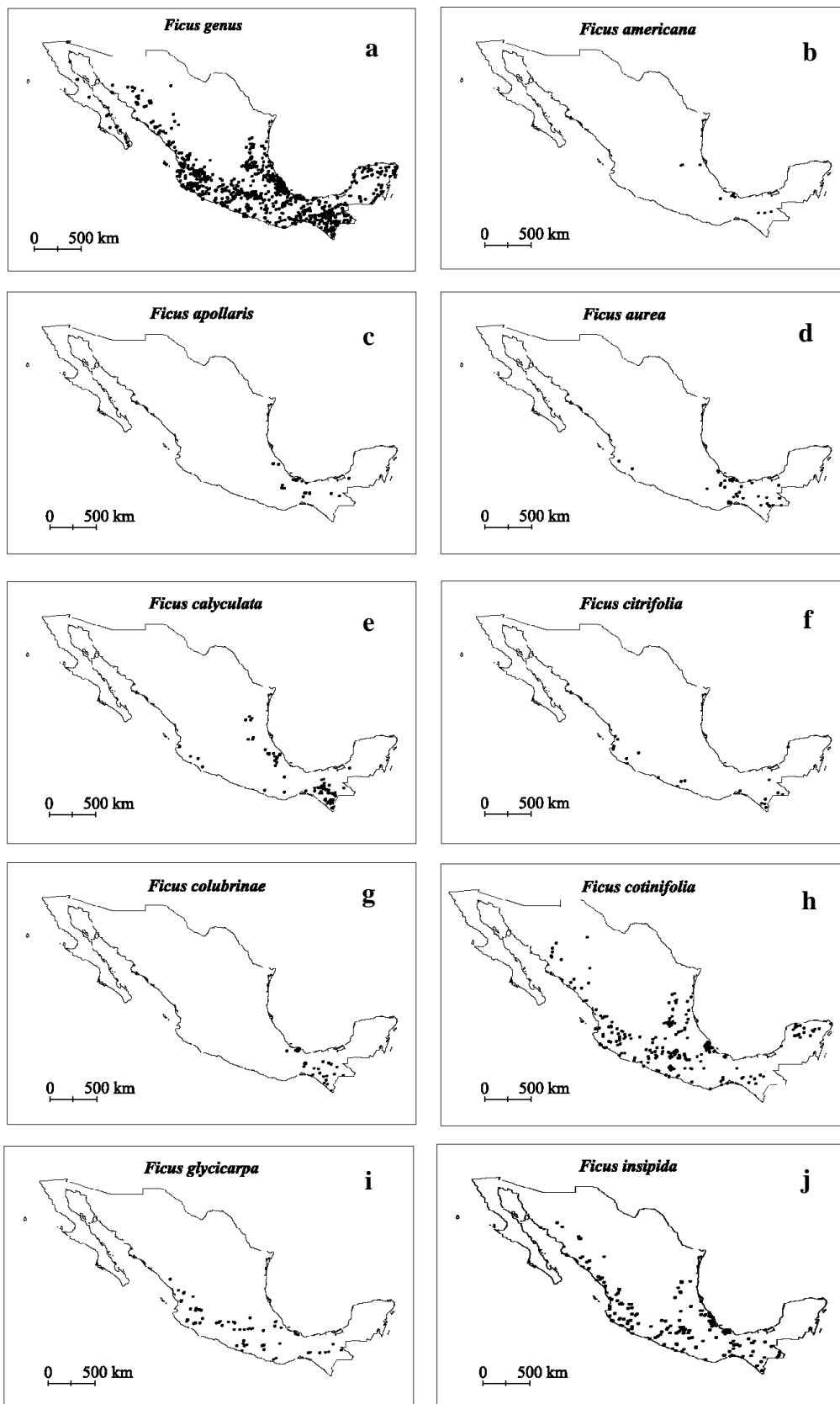


Figure 2 Distribution of (a) the genus *Ficus* and (b–v) each *Ficus* species throughout Mexico.

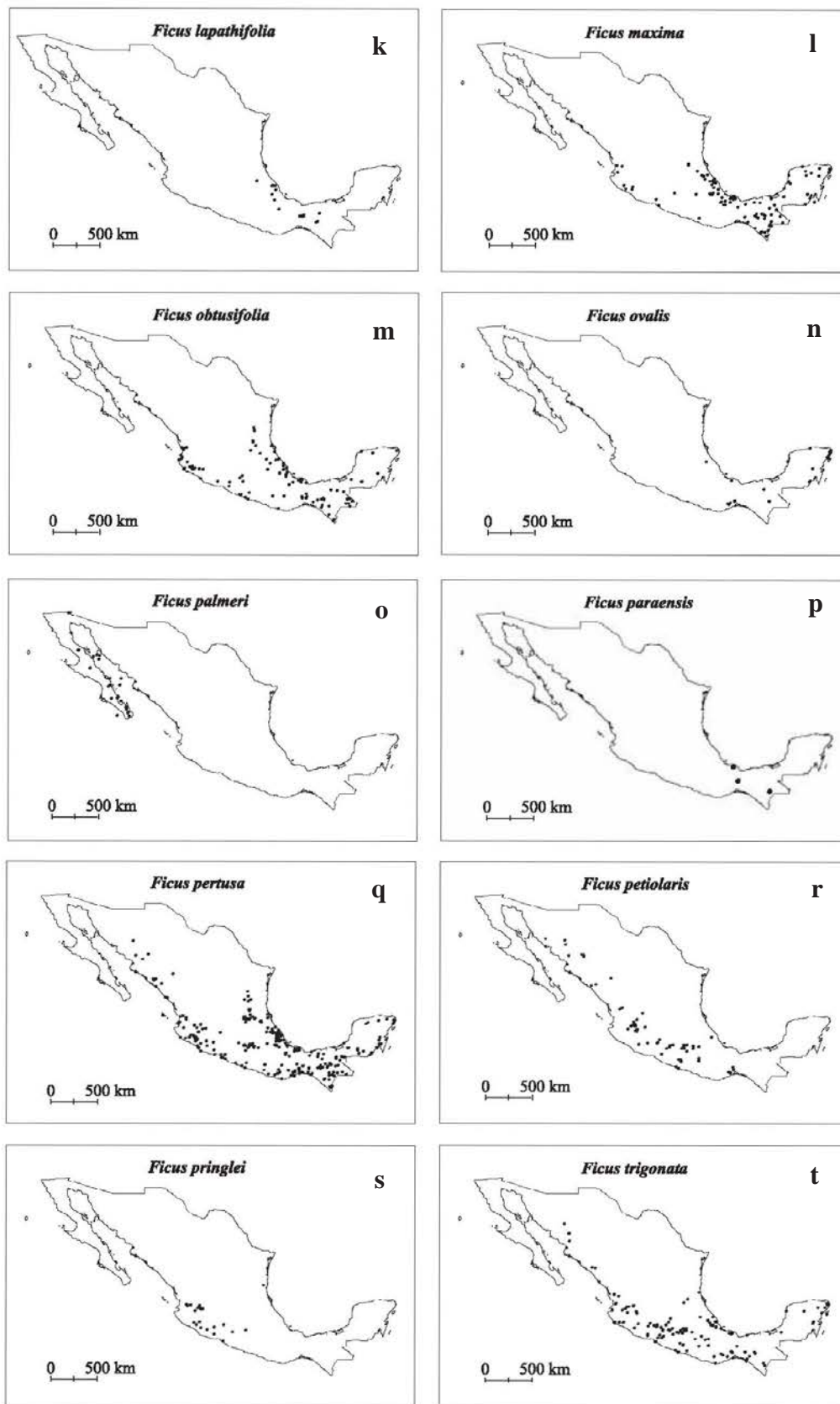


Figure 2 continued.

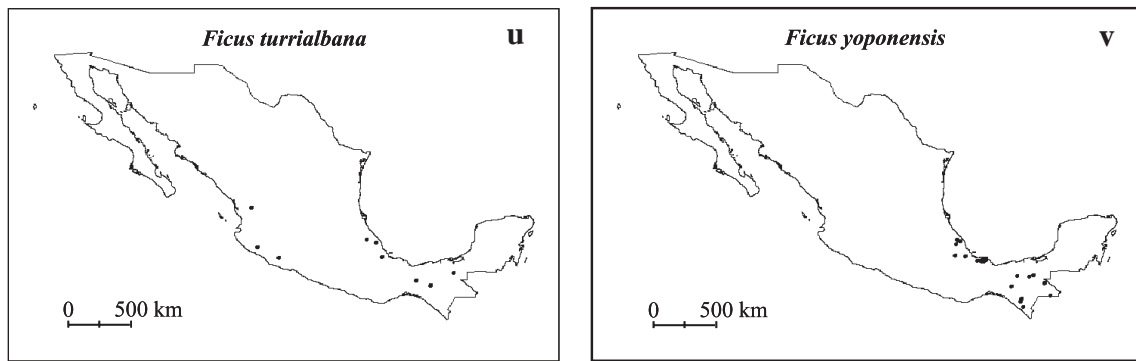


Figure 2 continued.

Local population size	Geographical distribution			
	Wide		Narrow	
	Habitat specificity			
	Broad	Restricted	Broad	Restricted
Abundant	<i>Ficus calyculata</i> <i>Ficus cotinifolia</i> <i>Ficus insipida</i> <i>Ficus máxima</i> <i>Ficus obtusifolia</i> <i>Ficus pertusa</i> <i>Ficus trigonata</i>			
Scarce	<i>Ficus glyxicarpa</i> <i>Ficus petiolaris</i>	<i>Ficus aurea</i> <i>Ficus americana</i> <i>Ficus apollinaris</i> <i>Ficus citrifolia</i> <i>Ficus colubrinae</i> <i>Ficus lapathifolia</i> <i>Ficus ovalis</i>	<i>Ficus palmeri</i> <i>Ficus paraensis</i> <i>Ficus pringlei</i> <i>Ficus turrialbana</i> <i>Ficus yoponensis</i>	

Table 2 Placement of Mexican *Ficus* species (endemic species in bold) to categories of rarity based on classification of Rabinowitz *et al.* (1986)

Rarity and conservation

According to the rarity classification of Rabinowitz *et al.* (1986), we can assign seven *Ficus* species to the non-rarity category, or 'abundant species' (wide geographic distribution, broad habitat and abundant local populations), including an endemic (*F. calyculata*) (Table 2). Two endemic species of *Ficus* (*F. glyxicarpa* and *F. petiolaris*) have wide geographic distributions, broad habitat and scarce local populations. A third group of six species, including one endemic (*F. lapathifolia*), had broad habitat but narrow geographic distribution, and scarce local populations. Finally, we detected a group of five 'rare species' with narrow geographic distributions, restricted habitats and scarce local populations, including two endemics (*F. palmeri* and *F. pringlei*).

All natural protected areas revised in Mexico include at least one species of *Ficus* (Table 1). A total of 11 species, which represents the highest number found in one site, are found in

Estación de Biología Tropical Los Tuxtlas in the state of Veracruz (southeast Mexico). Conversely, Reserva El Vizcaíno, in northwest Mexico, has only one species, *F. palmeri*. The frequency of *Ficus* species in each protected area has a gross relation with the range of the species: species with wide geographic distribution, such as *Ficus trigonata* L. and *F. cotinifolia*, can be found in nine and eight protected areas, respectively. Seven *Ficus* species were found in only one protected area, and there are three species (*F. citrifolia*, *F. lapathifolia* and *Ficus turrialbana* Burger), which do not occur in any protected area. Unfortunately, the presence of fig species in protected areas or reserves does not guarantee the persistence of their local populations in Mexico. Nevertheless, all these reserves are exceptional opportunities to evaluate this topic through realizing long-term populations studies.

Forest destruction and fragmentation pose new problems to the maintenance of mutualistic interactions due to the reduction of original large populations (McKey, 1989). It has

been shown that reduced forest fragments affect plant–pollinator interactions compared with those that occur in large or undisturbed forests (Bawa, 1990; Aizen & Feinsinger, 1994; Nason *et al.*, 1998; Cunningham, 2000; Cascante *et al.*, 2002; Stoner *et al.*, 2002; Quesada *et al.*, 2003), and studies like these do not exist for any fig species. Another important consequence of forest destruction is the reduction of population sizes. Bronstein *et al.* (1990), based on a stochastic simulation model, proposed that the critical population size for adult trees of a fig species needed to maintain its mutualistic interaction is large (median = 95), but we did not find such large populations in the Mexican *Ficus* that we examined. It seems that the maintenance and persistence of the mutualism depends on long-distance dispersal by agaonid wasps (see Nason *et al.*, 1996).

In conclusion, Mexican fig species present a great variation in morphological traits as well as patterns of geographic distribution, occupying different habitats along broad altitudinal and latitudinal ranges. This complex pattern of geographic distribution poses challenges to the maintenance of mutualistic interactions, persistence of large populations and in general, the conservation of keystone species in Mexican ecosystems. Further studies are necessary to understand the process of colonization and establishment of *Ficus* species with different ranges of geographic distribution, and of the population dynamics and gene flow patterns of agaonid wasps to explain the persistence and coupling with their host trees. Additional studies are also needed to develop management recommendations for particular species of *Ficus* in Mexico, especially those with small population sizes.

REFERENCES

- Adams, C.D. (1972) *Flowering plants of Jamaica*. University of the West Indies. The University Press, London.
- Aizen, M.A. & Feinsinger, P. (1994) Forest fragmentation, pollination, and plant reproduction in a Chaco dry forest, Argentina. *Ecology*, **75**, 330–351.
- Anstett, M.C., Michaloud, G. & Kjellberg, F. (1995) Critical population size for fig/wasp mutualism in a seasonal environment: effect and evolution of the duration of female receptivity. *Oecologia*, **103**, 453–461.
- Anstett, M.C., Hossaert-McKey, M. & Kjellberg, F. (1997) Figs and fig pollinators: evolutionary conflicts in a coevolved mutualism. *Trends in Ecology and Evolution*, **12**, 94–99.
- Balick, M.J., Nee, M.H. & Atha, D.E. (2000) Checklist of the vascular plants of Belize. *Memoirs of the New York Botanical Garden*, **85**, 1–246.
- Bawa, K.S. (1990) Plant–pollinator interactions in tropical rainforests. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **21**, 399–422.
- Berg, C.C. (1983) Dispersal and distribution in the Urticales – an outline. *Sonderbände des naturwissenschaftlichen Vereins in Hamburg*, **7**, 219–229.
- Berg, C.C. (1989) Classification and distribution of *Ficus*. *Experientia*, **45**, 605–611.
- Berg, C.C. (1990) Distribution of African taxa of *Ficus* (Moraceae). *Mitteilungen aus dem Institut für Allgemeine Botanik in Hamburg*, **23**, 401–405.
- Berg, C.C. & Simonis, J.F. (1981) The *Ficus* flora of Venezuela: five species complexes discussed and two new species described. *Ernestia*, **6**, 1–11.
- Berg, C.C., Vázquez A.M. & Kooy, F. (1984) *Ficus* species of Brazilian Amazonian and the Guianas. *Acta Amazonica*, **14**, 159–194.
- Bisse, J. (1988) *Árboles de Cuba*. Ed. Científico-Técnica. Cuba.
- Brako, L. & Zarucchi, J.L. (1993) Catalogue of the flowering plants and gymnosperms of Peru. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, **45**, 1–1286.
- Bronstein, J.L., Gouyon, P.-H., Glidon, C., Kjellberg, F. & Michaloud, G. (1990) The ecological consequences of flowering asynchrony in monoecious figs: a simulation study. *Ecology*, **71**, 2145–2156.
- Brown, J.H. & Lomolino, M.V. (1998) *Biogeography*. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA.
- Burger, W.C. (1974) Ecological differentiation in some congeneric species of Costa Rican flowering plants. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **61**, 297–306.
- Burger, W.C. (1977) Moraceae. Flora Costaricensis. *Fieldiana: Botany*, **40**, 94–215.
- Carauta, J.P.P. (1989) *Ficus* (Moraceae) no Brasil: conservação e taxonomia. *Albertoia*, **2**, 1–365.
- Carauta, J.P.P., Neto, S.R. & Sastre, C. (1996) Índice das espécies de Moráceas do Brasil. *Albertoia*, **4**, 77–93.
- Cascante, A., Quesada, M., Lobo, J.J. & Fuchs, E.J. (2002) Effects of dry tropical forest fragmentation on the reproductive success and genetic structure of the tree *Samanea saman*. *Conservation Biology*, **16**, 137–147.
- Ceballos, G. & García, A. (1995) Conserving neotropical biodiversity: the role of dry forests in western México. *Conservation Biology*, **9**, 1349–1356.
- Compton, S.G., Wiebes, J.T. & Berg, C.C. (1996) The biology of fig trees and their associated animals. *Journal of Biogeography*, **23**, 405–407.
- Corner, E.J.H. (1962) The classification of Moraceae. *Gardens' Bulletin Singapore*, **19**, 187–252.
- Cunningham, S.A. (2000) Depressed pollination in habitat fragments causes low fruit set. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **267**, 1149–1152.
- Dávila, P., Villaseñor, J.L., Medina, R., Ramírez Roa, A., Salinas, A., Sánchez-Ken, J. & Tenorio, P. (1993) *Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán*. Listados Florísticos de México X. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. México, Distrito Federal, México.
- De Wolf, G.P., Jr. (1965) *Ficus*, subgenus *Pharmacosycea* in America. *Elliotia*, **4**, 1–20.
- Durán, R. & Olmsted, I. (1987) *Listado florístico de la reserva de Sian Ka'an*. Amigos de Sian Ka'an. Quintana Roo, México.

- Durán, R., Simá, P. & Juan-Qui, M. (1999a) *Listado florístico de Ría Celestún*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Yucatán, México.
- Durán, R., Simá, P., Juan-Qui, M., Méndez, M. & Tun, F. (1999b) *Listado florístico de Río Lagartos*. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Yucatán, México.
- Ferrusquía-Villafranca, I. (1993) Geology of Mexico: a synopsis. *Biological diversity of Mexico: origins and distribution* (ed. by T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot and J. Fa), pp. 3–108. Oxford University Press, Oxford.
- García, E. (1988) *Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana)*. Offset Larios, México.
- Gentry, A.H. (1995) Diversity and floristic composition on Neotropical dry forests. *Seasonally dry forests* (ed. by S.H. Bullock, H.A. Mooney and E. Medina), pp. 146–194. Cambridge University Press, Cambridge.
- Graham, A. (1975) Late Cenozoic evolution of tropical lowland vegetation in Veracruz, Mexico. *Evolution*, **29**, 723–735.
- Graham, A. (1982) Diversification beyond the Amazon basin. *Biological diversification in the tropics* (ed. by G.T. Prance), pp. 78–90. Columbia University Press, New York.
- Hartshorn, G.S. & Poveda, L.J. (1993) Checklist of trees. *Costa Rican Natural History* (ed. by D.H. Janzen), pp. 158–183. The University Chicago Press, Chicago, IL.
- Herre, E.A. (1989) Coevolution of reproductive characteristics in 12 species of New World figs and their pollinators wasps. *Experientia*, **45**, 637–647.
- Herre, E.A. (1996) An overview of studies on a community of Panamanian figs. *Journal of Biogeography*, **23**, 593–607.
- Ibarra-Manríquez, G. & Sinaca C.S. (1996) Estación de Biología Tropical ‘Los Tuxtlas’, Veracruz, México: lista florística comentada (Mimosaceae a Verbenaceae). *Revista de Biología Tropical*, **44**, 41–60.
- Ibarra-Manríquez, G. & Wendt, T.L. (1992) El género *Ficus*, subgénero *Pharmacosycea* (Moraceae) en Veracruz, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, **52**, 3–29.
- Janzen, D.A. (1979) How to be a fig. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **10**, 13–51.
- Jørgensen, P.M. & León-Yáñez, S. (1999) Catalogue of the vascular plants of Ecuador. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, **75**, 1–1181.
- Kalko, E.K.V., Herre, E.A. & Handley, C.O. (1996) Relation of fig characteristics to fruit-eating bats in the New World and Old World tropics. *Journal of Biogeography*, **23**, 565–576.
- Killeen, T.J., García, E. & Beck, S.G. (1993) *Guía de árboles de Bolivia*. Quipus S.R.L., Bolivia.
- Korine, C., Kalko, E.K.V. & Herre, E.A. (2000) Fruit characteristics and factors affecting dispersal in a Panamanian fig community. *Oecologia*, **123**, 560–568.
- Liogier, A.H. (1996) *La flora de la Española*. VIII. Serie Científica 29. Vol. LXXII. Universidad Central del Este. 1ª. Ed. República Dominicana.
- León de la, L.J.L., Coria, R.C. & Cansino, J. (1995) *Reserva de la Biosfera El Vizcaíno, Baja California Sur. Listados Florísticos de México XI*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- López-Vaamonde, C., Dixon, D.J., Cook, J.M. & Rasplus, J.-Y. (2002) Revision of the Australian species of *Pleistodontes* (Hymenoptera: Agaonidae) fig-pollinating wasps and their host-plant associations. *Zoological Journal of the Linnean Society*, **136**, 637–683.
- Lott, E.J. (1993) Annotated checklist of the vascular flora of the Chamela bay region, Jalisco, México. *Occasional Papers of the California Academy of Sciences*, **148**, 1–60.
- Machado, C.A., Jousellin, E., Kjellberg, F., Compton, S.G. & Herre, E.A. (2001) The evolution of fig pollinating wasps: phylogenetic relationships, character evolution, and historical biogeography. *Proceedings of the Royal Society of London B*, **268**, 685–694.
- Martínez, E., Ramos, C. & Chiang, F. (1994) Lista florística de La Lacandona, Chiapas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, **54**, 99–177.
- Mawdsley, N.A., Compton, S.G. & Whittaker, R.J. (1998) Population persistence, pollination mutualisms, and figs in fragmented tropical landscapes. *Conservation Biology*, **12**, 1416–1420.
- McKey, D. (1989) Population biology of figs: applications for conservation. *Experientia*, **45**, 661–673.
- Michaloud, G., Carriere, S. & Kobbi, M. (1996) Exceptions to the one : one relationships between African figs trees and their fig wasp pollinators: possible evolutionary scenarios. *Journal of Biogeography*, **23**, 513–520.
- Milton, K., Windsor, D.M., Morrison, D.W. & Estribi, M.A. (1982) Fruiting phenologies of two Neotropical *Ficus* species. *Ecology*, **63**, 752–762.
- Mittermeir, R.A. (1988) Primate diversity and the tropical forest: case studies from Brazil and Madagascar and the importance of the megadiversity countries. *Biodiversity* (ed. by E.O. Wilson), pp. 145–154. National Academy Press, Washington, DC.
- Molbo, D., Machado, C.A., Sevenster, J.G., Séller, L. & Herre, E.A. (2003) Cryptic species of fig-wasp mutualism, sex allocation, and precision of adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **100**, 5867–5872.
- Molina R.A. (1975) Enumeración de las plantas de Honduras. *Ceiba*, **19**, 1–117.
- Nason, J.D., Herre, E.A. & Hamrick, J.L. (1996) Paternity analysis of the breeding structure of strangler fig populations: evidence for substantial long-distance wasp dispersal. *Journal of Biogeography*, **23**, 501–512.
- Nason, J.D., Herre, E.A. & Hamrick, J.L. (1998) The breeding structure of a tropical keystone plant resource. *Nature*, **391**, 685–687.
- Nelson, G. (1994) *The trees of Florida. A reference and field guide*. Pineapple Press, Inc., Florida.
- Quesada, M., Stoner, K.E., Rosas-Guerrero, V., Palacios-Guevara, C. & Lobo, J.A. (2003) Effects of habitat disruption on the activity of nectarivorous bats (Chiroptera: Phyllostomidae) in a dry tropical forest: implications for the

- reproductive success of the neotropical tree *Ceiba grandiflora*. *Oecologia*, **135**, 400–406.
- Quintana, R. & Carvajal, S. (2001) Las especies jaliscienses del género *Ficus* L. (Moraceae). *Boletín del Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara*, **8**, 1–64.
- Rabinowitz, D., Cairns, S. & Dillon, T. (1986) Seven forms of rarity and their frequency in the flora of the British Isles. *Conservation biology. The science of scarcity and diversity* (ed. by M.E. Soulé), pp. 82–204. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Ramamoorthy, T.P., Bye, R., Lot, A. & Fa, J. (1993) *Biological diversity of Mexico: origins and distribution*. Oxford University Press, Oxford.
- Rzedowski, J. (1986) *La vegetación de México*. Limusa, México.
- Rzedowski, J. (1991a) Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta Botánica Mexicana*, **14**, 3–21.
- Rzedowski, J. (1991b) El endemismo de la flora fanerogámica de México: una apreciación analítica preliminar. *Acta Botánica Mexicana*, **15**, 47–64.
- Sanders, A. (1992) *Annotated checklist of the vascular flora of El Jabalí, Colima, México*. A report to the Fundación Ecológica de Cuixmala on the floristic surveys of 1990–91 of the Cuixmala-Cumbres and El Jabalí reserves in Mexico. Appendix 2, pp. 107–131.
- Shanahan, M., Samson, S., Compton, S.G. & Corlett, R. (2001) Fig-eating by vertebrate frugivores: a global review. *Biological Review*, **76**, 529–572.
- Standley, P.C. (1917) The Mexican and Central American species of *Ficus*. *Contributions from the United States National Herbarium*, **20**(1), 1–35.
- Standley, P.C. (1922) Trees and shrubs of Mexico. *Contributions from the United States National Herbarium*, **23**, 205–213.
- Stoner, K., Quesada, M., Rosas-Guerrero, V. & Lobo J.A. (2002) Effects of forest fragmentation on the Colima long-nosed bat (*Musonycteris harrisoni*) foraging dry forest of Jalisco, Mexico. *Biotropica*, **34**, 462–467.
- Téllez, O., Flores, G., Martínez, A., González, R.E., Segura, G., Ramírez, R., Domínguez, A. & Calzada, I. (1995) *Flora de la reserva ecológica Sierra de San Juan, Nayarit, México. Listados Florísticos de México XII*. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Tiffany, H.B. (1986) Fruit and seed dispersal and the evolution of Hammamelidae. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **73**, 394–416.
- Vázquez, M.D. (1981) El género *Ficus* (Moraceae) en la República Argentina. *Darwiniana*, **23**, 605–636.
- Vázquez, G., Cuevas, G., Cochrane, T.S., Iltis, H.H., Santana, F.J., & Guzmán, H.L. (1995) Flora de Manantlán. Plantas vasculares de la reserva de la biosfera Sierra de Manantlán Jalisco–Colima, México. *Sida, Botanical Miscellany*, **13**, 1–312.
- Wendt, T. (1993) Composition, floristic affinities, and origins of the canopy tree flora of the Mexican Atlantic slope rain forest. *Biological diversity of Mexico: origins and distribution* (ed. by T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot and J. Fa), pp. 595–680. Oxford University Press, Oxford.
- Wiebes, J.T. (1979) Co-evolution of figs and their insect pollinators. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **10**, 1–12.
- Wiebes, J.T. (1986) The association of figs and fig-insects. *Revue de Zoologie Africaine*, **100**, 63–71.
- Woodson, R.E. Jr. & Schery, R.W. (1960) Moraceae. Flora of Panama. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **47**, 114–178.

BIOSKETCHES

Alejandra Serrato is interested in research into the biogeographical and evolutionary aspects of plant–animal interactions, particularly co-evolutionary relationships between Mexican species of *Ficus* and their wasp pollinators. She is also interested in the genetic aspects and specificity of *Ficus* and wasp species populations.

Ken Oyama is a full-time researcher interested in ecology, genetics, biogeography and phylogeny of *Ficus* and *Quercus* in Mexico, aiming to understand the main patterns of diversification and co-evolution. He has taught ecology and evolution for over 15 years in different Mexican universities and has authored and co-authored over 50 articles on various topics of plant biology.

Guillermo Ibarra-Manríquez is a researcher concerned with community ecology, biogeography and methods for biodiversity conservation. He has been teaching courses focused on these topics at several Mexican universities, and is currently interested in evaluating distribution patterns of tree species and their levels of endemism in order to identify priorities for setting up conservation areas.

RELACIONES FILOGENÉTICAS Y DE DISTANCIA ENTRE ESPECIES DE *Ficus* MEXICANAS USANDO SECUENCIAS DE DNA Y AFLPs.

RESUMEN

El género *Ficus* es uno de los más diversos entre las plantas, tiene gran importancia ecológica y evolutiva por mantener una de las interacciones más diversas y específicas reportadas hasta el momento. En este trabajo se investigaron las relaciones filogenéticas de las especies de *Ficus* que se encuentran en México. México prácticamente representa el límite norte de distribución del género en América y presenta un alto grado de endemismos. Utilizamos secuencias de diferentes regiones de DNA sin encontrar una que nos diera suficiente información para resolver las relaciones entre estas especies. Por este motivo utilizamos AFLP que muestran diferencias distribuidas en todo el genoma. Los datos generados con ambos marcadores muestran topologías similares que soportan la monofilia de los subgéneros *Urostigma* y *Pharmacosyceae* de tres especies endémicas de México.

INTRODUCCIÓN

El género *Ficus* (Moraceae) es uno de los más diversos entre las plantas. Cuenta con cerca de 750 especies distribuidas principalmente en las regiones tropicales del mundo (Berg, 1989). Se caracteriza por su peculiar inflorescencia encerrada (sícono o higo) con flores unisexuales que solo son accesibles por una pequeña apertura cubierta por escamas. Los únicos polinizadores que tienen acceso a las flores de *Ficus* son las avispas de la familia *Agaonidae*. Las avispas *Agaonidae* junto con *Ficus* constituyen el sistema de polinización obligada más diverso y específico que se conoce (Janzen, 1979; Wiebes, 1979; Bronstein, 1992). Las especies de *Ficus* solamente son polinizadas y dispersan

polen a través de las avispas *Agaonidae*. Por su parte, las avispas *Agaonidae*, con grandes adaptaciones morfológicas y conductuales únicamente ovipositan en una porción de flores de *Ficus* donde sus larvas se alimentan y desarrollan hasta alcanzar la madurez. Cuando son adultos salen de las flores, copulan dentro del sícono, las hembras colectan polen y completan su ciclo de vida al salir de su higo natal hacia un nuevo sícono donde polinizarán y ovipositarán (Janzen, 1979, Bronstein, 1992).

Es tan alta la especificidad en este sistema que durante varios años se propuso la existencia de una especie de avispa polinizadora por cada especie de *Ficus* (Janzen, 1979; Wiebes, 1979, 1986; Herre, 1989; Anstett *et al.*, 1997). Sin embargo, hace poco más de una década inició el estudio de esta interacción utilizando marcadores moleculares (Herre *et al.*, 1996). Los resultados de estos estudios han cambiado la perspectiva que se tenía sobre este mutualismo. Se encontraron evidencias de la existencia de más de una especie de polinizador por cada especie de *Ficus*, cambios de hospedero, eventos de especiación independiente de las avispas y especies de avispas crípticas (Kerdelhue, Clainche y Rasplus, 1999; Molbo *et al.* 2003).

La mayoría de los trabajos realizados sobre esta interacción, con marcadores moleculares, se basan principalmente en proponer filogenias de los polinizadores (Kerdelhue, Le Clainche, Rasplus, 1999; Machado, Jousselin, Kjellberg, Compton, Herre, 2001; Lopez-Vaamonde, Rasplus, Weiblen, Cook, 2001; Molbo, Machado, Herre, Keller, 2004; Haine, Martin, Cook, 2006; Jousselin, Van Noort, Rasplus, Greeff, 2006; Jiang, Huang, Zhu, Zhen, 2006) o están limitados a grupos taxonómicos mayores (subgéneros y secciones) de *Ficus* (Weiblen, 2004). Pocos son los estudios que incluyen propuestas sobre las relaciones fenéticas y filogenéticas de *Ficus* (Jousselin, Rasplus, Kjellberg, 2003; Weiblen, 2000; Ronsted, 2005; Ronsted in press; Machado 2005), debido a la dificultad que ha presentado encontrar un marcador molecular adecuado para el género.

Las primeras filogenias moleculares en plantas se basaron en la variación de secuencias de cloroplasto (por ejemplo *rbcL*) (Chase *et al.*, 1993), estas regiones han sido una poderosa herramienta en estudios con niveles taxonómicos mayores como familia. Las secuencias de DNA de diferentes regiones de organelos son una poderosa herramienta para estudios evolutivos por presentar herencia uniparental y ausencia de recombinación del genoma. Sin embargo, las bajas tasas evolutivas del DNA de

cloroplasto y la recombinación intramolecular del DNA mitocondrial en plantas limitan su uso en estudios a nivel intraespecífico (Provan, Powell y Hollingswoth, 2001). Como consecuencia, las relaciones entre taxa muy cercanos se han inferido de secuencias no codificantes en diferentes regiones del genoma como las secuencias de los espaciadores internos transcritos (ITS). Sin embargo, estas regiones presentan un problema potencial debido a introgresiones entre taxa relacionados y presencia de múltiples copias (Gernandt *et al.* 2001). Cuando las opciones que se tienen, al secuenciar regiones de DNA, fallan para proponer una filogenia, se tiene que recurrir a otro tipo de marcadores como los AFLPs (amplified fragment length polymorphism). El uso de AFLPs para inferir filogenias es controversial, por la dificultad de evaluar la homología de las bandas. Sin embargo, es una técnica altamente reproducible que permite una rápida obtención de muchas bandas polimórficas distribuidas en todo el genoma por medio de la amplificación selectiva de fragmentos de restricción de DNA. Además, se han secuenciado bandas del mismo tamaño obteniendo 95% de homología entre ellas. Por estas razones es cada vez mas frecuente el uso de AFLPs en combinación con secuencias de DNA para resolver relaciones filogenéticas entre taxa cercanos (Hodkinson *et al.* 2000; Kopman *et al.*, 2001; Beardsley *et al.*, 2003; Després *et al.*, 2003; Van EE, 2006).

El propósito de este trabajo es buscar las relaciones filogenéticas entre las especies de *Ficus* de México. En México existen veintidós especies de *Ficus*, cinco del subgénero *Pharmacosyceae* y diecisiete del subgénero *Urostigma*. Siete especies únicamente se encuentran en México, lo cual representa un alto grado de endemismo comparado con otras regiones del mundo (Adams, 1972; McKey, 1989). Estudios recientes con datos moleculares sugieren que *Ficus* y sus polinizadores surgen hace más de 60 millones de años en Gondwana cuando los continentes estaban unidos en dos grandes masas de Tierra. Probablemente el género radió y colonizó el norte del planeta durante el terciario, después del rompimiento de Gondwana, siendo México prácticamente el último sitio de colonización de *Ficus* en el continente Americano (Machado *et al.* 2005; Zerega *et al.*, 2005).

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras

En diferentes localidades de México, colectamos muestras de veintiún especies de *Ficus* y de *Poulsenia armata* que se utilizó como grupo externo (Herre *et al.*, 1996), las muestras de *F. paraensis* y *F. citrifolia* las conseguimos del herbario de la UNAM (Tabla 1). Obtuvimos los sitios de colecta a partir de datos de herbario y búsquedas en campo. Colectamos tejido de hojas jóvenes en nitrógeno líquido y después lo guardamos en el laboratorio a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabla 1. Lista de especies de *Ficus* incluidas en este estudio. En negritas se marcan las especies endémicas para México.

<i>Especie</i>	<i>Subgénero</i>	Registro
<i>F. americana</i>	<i>Urostigma</i>	Serrato 048
<i>F. apollinaris</i>	<i>Pharmacosycea</i>	Pérez-Pérez 112
<i>F. aurea</i>	<i>Urostigma</i>	Serrato 030
<i>F. calyculata</i>	<i>Urostigma</i>	Serrato 042
<i>F. citrifolia</i>	<i>Urostigma</i>	E. Ventura-E. López 2062
<i>F. colubrinae</i>	<i>Urostigma</i>	Pérez-Pérez 099
<i>F. cotinifolia</i>	<i>Urostigma</i>	Serrato 052
<i>F. glydicarpa</i>	<i>Urostigma</i>	Serrato 055
<i>F. insipida</i>	<i>Pharmacosycea</i>	Serrato 028
<i>F. irinae</i>	<i>Urostigma</i>	Serrato 058
<i>F. lapathifolia</i>	<i>Pharmacosycea</i>	Serrato 017
<i>F. maxima</i>	<i>Pharmacosycea</i>	Serrato 040
<i>F. obtusifolia</i>	<i>Urostigma</i>	Serrato 011
<i>F. ovalis</i>	<i>Urostigma</i>	Pérez-Pérez 091
<i>F. palmeri</i>	<i>Urostigma</i>	Oyama, Las Palmas, BCS 98
<i>F. paraensis</i>	<i>Urostigma</i>	Juan Ismael Calzada 1575
<i>F. pertusa</i>	<i>Urostigma</i>	Serrato 009
<i>F. petiolaris</i>	<i>Urostigma</i>	Serrato 012
<i>F. pringlei</i>	<i>Urostigma</i>	Pérez-Pérez 038
<i>F. trigonata</i>	<i>Urostigma</i>	Serrato 014
<i>F. turrialbana</i>	<i>Urostigma</i>	Pérez-Pérez 088
<i>F. yoponensis</i>	<i>Pharmacosycea</i>	Serrato 025
<i>Poulsenia armata</i>	Grupo externo	Pérez-Pérez 094

Extracción de DNA

Extrajimos DNA total a partir de 1 g de tejido con un protocolo de CTAB modificado a partir de Doyle y Doyle (1987) (Anexo 1).

Amplificación y secuenciación de diferentes regiones de DNA

Utilizamos 10 ng de DNA para amplificar la región elegida por medio de PCR. Con la finalidad de remover el exceso de primers y deoxinucleótidos, las regiones amplificadas se purificaron con el QiaQuick PCR purification Kit (Qiagen) de acuerdo al instructivo. La reacción de secuenciación se llevó a cabo con Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer) siguiendo el instructivo. El producto se purificó en columnas Centri Sep con sephadex para eliminar el colorante que no se incorporó en la reacción. Secuenciamos las muestras automáticamente en sentido 3'-5' y 5'-3' en un equipo ABI PRISM 3100 (Perkin-Elmer) y las alineamos manualmente en una matriz.

Amplificamos la región del espaciador interno transcrito ribosomal (ITS) con los iniciadores ITS 5 (GGA AGG AGA AGT CGT AAC AAG G) e ITS 4 (TCC GTA GGT GAA CCT CGC G) con un paso inicial de desnaturalización a 94° durante 60 segundos, seguido de 28 ciclos con un paso de desnaturalización de 94° por 60', un paso de alineamiento a 55° por 60' y un paso de extensión a 72° por 60' y una extensión final a 72° por 7 minutos. Sin embargo, obtuvimos múltiples copias de esta región en las especies incluidas en este estudio, por lo que buscamos otra región que no presentara este problema para un estudio filogenético.

Intentamos amplificar la región P6F - P7R del gen RNA polimerasa II RPB2 según las condiciones reportadas en Denton, et al., (1998). Pero, a pesar de hacer gradientes de temperatura, de concentración de oligos y concentración de cloruro de magnesio, solo logramos amplificar esta región en *Ficus pertusa*.

Posteriormente amplificamos la región fosfoenol piruvato carboxilasa PPC de cloroplasto pero no conseguimos una amplificación específica, probablemente por las duplicaciones en tandem de esta región (Besnard, 2003).

También amplificamos la región de MatK de cloroplasto pero no obtuvimos ninguna variación a nivel intraespecífico en las especies de *Ficus* de México.

Finalmente amplificamos la región del intrón de trnL con los iniciadores "c" (5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3') "d" (5'-GGGGATAGAGGGACTTGAAC-3') y el espaciador intergénico de trnF con los iniciadores "e" (5'-GGTTCAAGTCCCTCTATCCC-3') y "f" (5'-ATTTGAACGGTGACACGAG-3') siguiendo las condiciones de amplificación de Taberlet *et al.* 1991.

AFLP

Debido a la falta de variabilidad a nivel intragenérico detectada en secuencias de la región de trnL y trnF, analizamos la variabilidad por medio de AFLPs (amplified fragment length polymorphism) (anexo 2). El protocolo de AFLP incluyó cinco pasos. El primero fue la extracción de DNA como describe en el anexo 1, la concentración de DNA se determinó por flourometría con un espectrofotómetro BioNate 3 Thermo. El segundo paso fue la digestión-ligación. Digerimos 1 µg de DNA total con dos enzimas de restricción (EcoRI y MseI) (Tabla 2). Llevamos a cabo la reacción con 8 µl del buffer de digestión/ligamiento, 0.5 unidades de enzima EcoR1, 0.5 unidades de enzima MseI y 20 µl de agua desionizada. La digestión se hizo por 3 horas a 37°C. Posteriormente se ligaron de adaptadores para generar los “templates” quiméricos (Tabla 1). Añadimos, a la mezcla digerida, 1 µl de adaptador para Eco R1, 1 µl del adaptador para Mse1, 1 µl de ATP (10mM), 4 µl del buffer de digestión/ligamiento, 1 unidad de T4 DNA-ligasa y 2 µl de dH₂O. Incubamos la muestra a 37°C durante 14 horas para que la reacción de ligado se llevara a cabo y así obtener el DNA quimérico.

Tabla 2. Sitios de restricción (las flechas incluyen los sitios de corte), adaptadores e iniciadores preseleccionados usados en el análisis de AFLP de las especies de *Ficus* de México. (Modificada de Gaudoul, Taberlet y Till-Bottraud, 2000).

Enzimas de restricción	EcoRI	MseI
Sitios de restricción	5'-G ^A AATT C-3' 3'-C TTAA ^G -5'	5'-T ^A TA A-3' 3'-A AT ^T -5'
Adaptadores	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
Iniciador preseleccionado	5'-AGACTGCGTACCAATTC-3'	5'-GATGAGTCCTGAGT-3'

El tercer paso fue una preamplificación por PCR. Realizamos una mezcla de 5 µl de DNA quimérico, 0.5 µl de iniciador preseleccionado de EcoR1 (50ng/µl), 0.5 µl de iniciador preseleccionado de Mse1 (50ng/µl) (Tabla 1), 0.8 µl de dNTP's (5mM), 2 µl de buffer para PCR 10X, 0.6 µl de MgCl₂ (50mM), 0.4 unidades de Taq polimerasa (5U/µl) y 10.5 µl de. El ciclo de PRC consistió en un paso de desnaturalización por 2 minutos a 90 °C, seguido de 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 1 minuto a 56 °C, 1 minuto a 72 °C y finalmente 2 minutos de extensión a 72 °C. Para evaluar la eficiencia de ligado, separamos por electroforesis 10 µl del producto en un gel de agarosa al 1% y diluimos el producto restante 1:10 veces con ddH₂O.

El cuarto paso fue la reacción de PCR-AFLP. Probamos 50 combinaciones de iniciadores, amplificaron 18 combinaciones y utilizamos los 12 pares que presentaron mejor calidad de amplificación para hacer la reacción de PCR-AFLP con las especies de *Ficus* de México (tabla 3). Tomamos 5µl de DNA quimérico diluido, adicionamos 0.5 µl del primer EcoR1 marcado con radioisótopo ³³P, 0.5 µl de primer Mse1, 0.8 µl de dNTP's (5 mM), 0.6 µl de MgCl₂, 10µl de buffer de PCR 10X, 0.4 unidades de Taq polimerasa y 10.5 µl de ddH₂O. El ciclo de PCR que usamos consistió de un primer paso de desnaturalización a 94 °C durante dos minutos, seguidos de 20 ciclos de 94 °C durante 30 segundos, 56 °C durante 1 minuto, 72 °C por 1 minuto y una extensión final a 72 °C durante 2 minutos. El quinto paso fue la visualización de los fragmentos amplificados. Realizamos una electroforesis en gel de poliacrilamida al 5%. Una vez polimerizado el gel, lavamos los residuos de poliacrilamida de los vidrios y precalentamos en la cámara de electroforesis durante una hora a 1200 V. Una vez caliente, cargamos las muestras a las que previamente habíamos agregado 10 µl de buffer de secuenciación y se desnaturalizaron a 94 °C por 5 minutos y pusimos en hielo para evitar la renaturalización. Corrimos las muestras a 1000 V durante 4 horas. Posteriormente, secamos el gel con papel filtro Whatman al vacío y lo revelamos con una placa Kodak dentro de un hipercassette después de exponerla durante 48 horas. Codificamos las bandas, de seis de las combinaciones de primers utilizados, en una matriz binaria (0/1) por presencias y ausencias. El resto de combinaciones usadas no las usamos por falta de resolución por decaimiento de la marca radioactiva o por la falta de amplificación de una o dos especies (Tabla 3).

Tabla 3. Combinaciones de oligonucleótidos empleados para realizar los AFLPs con las especies de *Ficus* de México.

Combinación				Combinación				Combinación			
EcoRI	MseI	Amplificó	AFLP	EcoRI	MseI	Amplificó	AFLP	EcoRI	MseI	Amplificó	AFLP
E.ATT	M.TGAC			E.CAT	M.TGAC			E.AGG	M.TAAG	✓	
E.TCC	M.TAAA	✓	✓	E.CAT	M.TAAG			E.AGG	M.TAAC	✓	
E.GCA	M.TAAA			E.CAT	M.TCCA			E.AGG	M.TCCA	✓	
E.TCT	M.TAAA			E.CAT	M.TAAT	✓	✓✓	E.AGG	M.TAAT	✓	✓✓
E.TCT	M.TGAC			E.CAT	M.TCTT			E.AGG	M.TCTT	✓	✓
E.TCT	M.TAAG		✓	E.CAT	M.TACG			E.AGG	M.TTAA	✓	
E.TCT	M.TAAC			E.TAG	M.TAAA			E.AGG	M.TACG	✓	
E.TCT	M.TCCA			E.TAG	M.TGAC			E.GAC	M.TAAA		
E.TCT	M.TAAT			E.TAG	M.TAAG			E.GAC	M.TGAC	✓	✓✓
E.CAA	M.TAAA			E.TAG	M.TAAC			E.GAC	M.TAAG	✓	✓
E.CAA	M.TGAC			E.TAG	M.TCCA	✓	✓✓	E.GAC	M.TAAC		
E.CAA	M.TAAC	✓	✓✓	E.TAG	M.TAAT			E.GAC	M.TCCA		
E.CAA	M.TCCA			E.TAG	M.TCTT			E.GAC	M.TAAT		
E.CAA	M.TACG			E.TAG	M.TTAA	✓		E.GAC	M.TCTT		
E.CAA	M.TATT	✓	✓✓	E.TAG	M.TACG	✓		E.GAC	M.TTAA		
E.CAA	M.TTAA			E.AGG	M.TAAA	✓		E.GAC	M.TACG		✓
E.CAA	M.TAAA			E.AGG	M.TGAC	✓	✓				

Las combinaciones marcadas con dos palomas son las que se utilizaron para el análisis de datos.

Análisis de datos

Secuencias de trnL y trIF

Alineamos manualmente las secuencias 5'-3' y 3'-5', juntamos las regiones c-d y e-f en una sola matriz debido a que su ubicación en el genoma es contigua. Con estos datos, hicimos un análisis de máxima parsimonia por medio de una búsqueda heurística de 1000 réplicas en PAUP (Swofford, 2000) con optimización de caracteres ACCTRAN, algoritmo de intercambio de ramas TBR (tree bisection reconnection). Obtuvimos un árbol consenso por mayoría e inferimos el soporte de los nodos por un análisis de bootstrap de 100 réplicas.

AFLP

A partir de la matriz de presencia-ausencia generada con los datos obtenidos con los fragmentos de AFLPs de las 22 especies de *Ficus* y de *Poulsenia* realizamos dos tipos de análisis. El primero fue un análisis de distancias de acuerdo al coeficiente de disimilaridad de Nei y Li (1979) implementado en PAUP (Swofford, 2000): $E_{ij} = 1 - 2n_{ij}/(n_i + n_j)$, donde n_{ij} es el número de fragmentos mostrados entre los individuos i y j , y n_i y n_j son el número total de fragmentos del individuo i y j respectivamente. Construimos el fenograma de neighbor-joining en PAUP (Swofford, 2000) con 1000 réplicas de bootstrap. El segundo fue un análisis filogenético siguiendo las mismas condiciones que usamos en el análisis de las secuencias de trn.

Evidencia total

Con la finalidad de tener una inferencia filogenética con todos los datos obtenidos, hicimos una matriz con los datos de AFLP y secuencias de trnL. La prueba de homogeneidad de particiones sugiere que las matrices individuales de la región de trn de cpDNA y de AFLP presentan una señal filogenética similar ($p = 0.034$), por lo tanto realizar un análisis combinando dichas particiones es adecuado. Analizamos la matriz de particiones en PAUP bajo las mismas condiciones que utilizamos en el análisis de la matriz de secuencias de la región de trn.

RESULTADOS

cpDNA

El alineamiento de las dos regiones de cloroplasto trnL-trnF fue de una longitud de 978 pb con 19 indeles. De las 978 pb, 38 caracteres fueron variables y únicamente 8 fueron informativos. Obtuvimos 3 árboles mas parsimoniosos (longitud $L=39$, índice de consistencia $IC=0.9744$, índice de retención $IR=0.9655$) con muy bajos niveles de resolución. Los valores de bootstrap soportan fuertemente la monofilia del subgénero *Pharmacosyceae* y *Urostigma* y dentro de este subgénero la monofilia de *F. calyculata*, *F. palmeri* y *F. patiolaris* que son especies endémicas de México. En este último clado, el consenso por mayoría también agrupa a *F. glyxicarpa* otra especie endémica de México (figura 1).

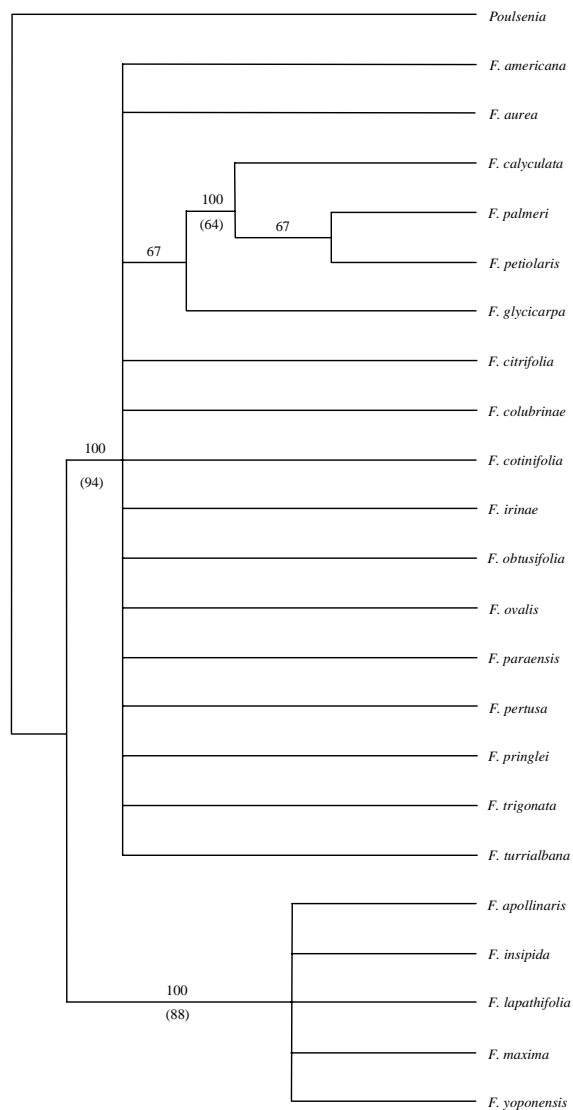


Figura 1. Árbol consenso por mayoría a partir de la región de trnL de cpDNA, los valores de bootstrap se indican entre paréntesis.

AFLP

Obtuvimos una matriz de presencia-ausencia de 298 fragmentos de los cuales 146 fueron polimórficos (48.99%). El fenograma de Neighbor-joining (figura 2) forma por

distancias dos clados principales, que a su vez agrupan a las especies de los dos subgéneros de *Ficus* presentes en México. Las distancias entre las especies concuerdan con la clasificación y la monofilia propuesta para estos subgéneros. El fenograma también coincide con los datos de DNA de cloroplasto en agrupar a *F. palmeri* y *F. petiolaris*.

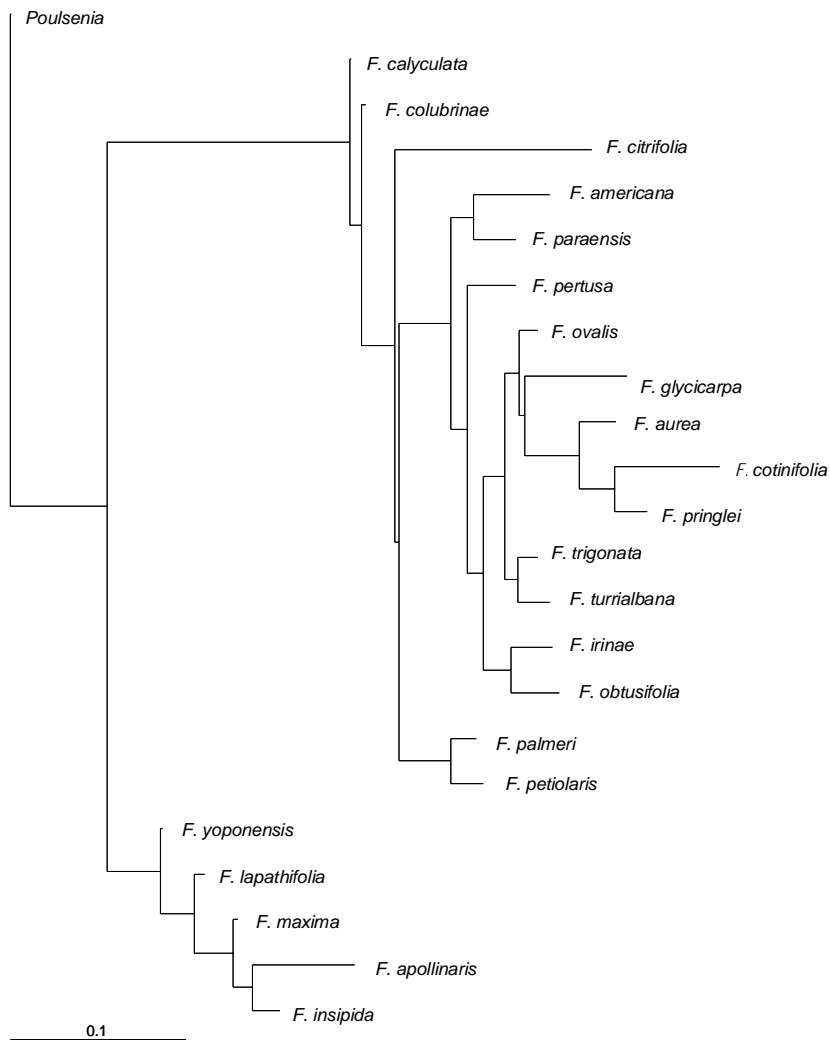


Figura 2. Árbol de Neighbor-joining basado en distancias genéticas de Nei-Li (1979) a partir AFLP obtenidos de 6 combinaciones de primers.

A partir del análisis de máxima parsimonia obtuvimos que de los 298 fragmentos solo 73 fueron cladísticamente informativos. Obtuvimos 8 árboles más parsimoniosos (L= 209, IC= 34, IR= 59). El análisis por Neighbor-joining y el de parsimonia coinciden en agrupar a las especies en dos clados principales. Estos clados están formados por las especies de cada uno de los dos subgéneros presentes en México.

El análisis cladístico de AFLP es congruente con el análisis de cpDNA en soportar la monofilia de los subgéneros *Pharmacosycea* y *Urostigma* y la monofilia de *F. palmeri*, *F. petiolaris* y *F. calyculata*. Sin embargo, presentan una mejor resolución de los clados, las relaciones entre las especies del subgénero *Pharmacosycea* quedan completamente resultas, apareciendo *F. apollinaris* como la especie ancestral, *F. maxima* especie hermana de *F. insipida* y *F. lapathifolia* especie hermana de *F. yoponensis*. Dentro del subgénero *Urostigma*, se soporta un clado más formado por *F. americana* y *F. paraensis* (figura 3)

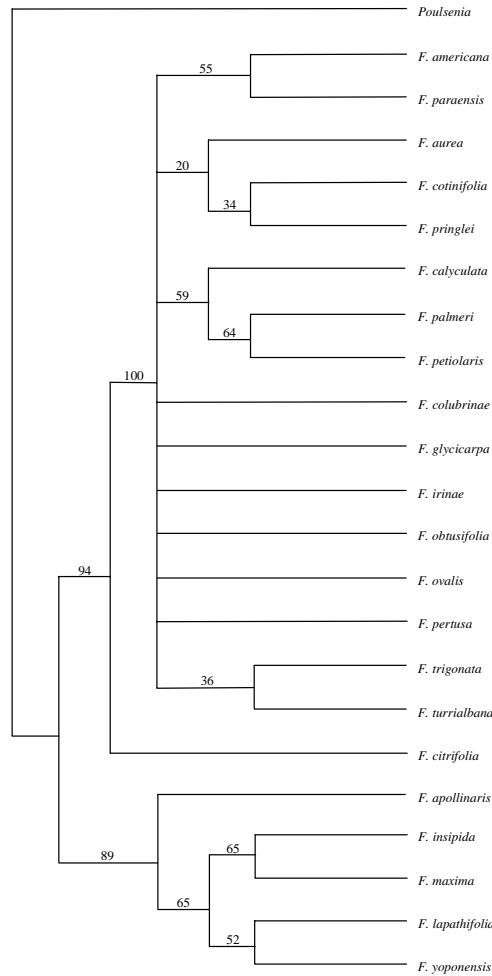


Figura 3. Consenso por mayoría de 8 árboles de máxima parsimonia obtenido a partir de AFLP de 6 combinaciones de primers. Se muestran los valores de bootstrap para cada nodo.

Evidencia total

La matriz de particiones fue de 1052 caracteres, de los cuales 81 fueron parsimoniosamente informativos. Obtuvimos un árbol consenso por mayoría (Fig. 4) a partir de 15 árboles mas parsimoniosos (L=248, IC=0.4476, IR=0.6205).

En el árbol por consenso se resuelven mejor las relaciones entre las especies del subgénero *Urostigma*. Sin embargo, los valores de bootstrap no soportan más clados de los que se soportan con los datos de AFLPs.

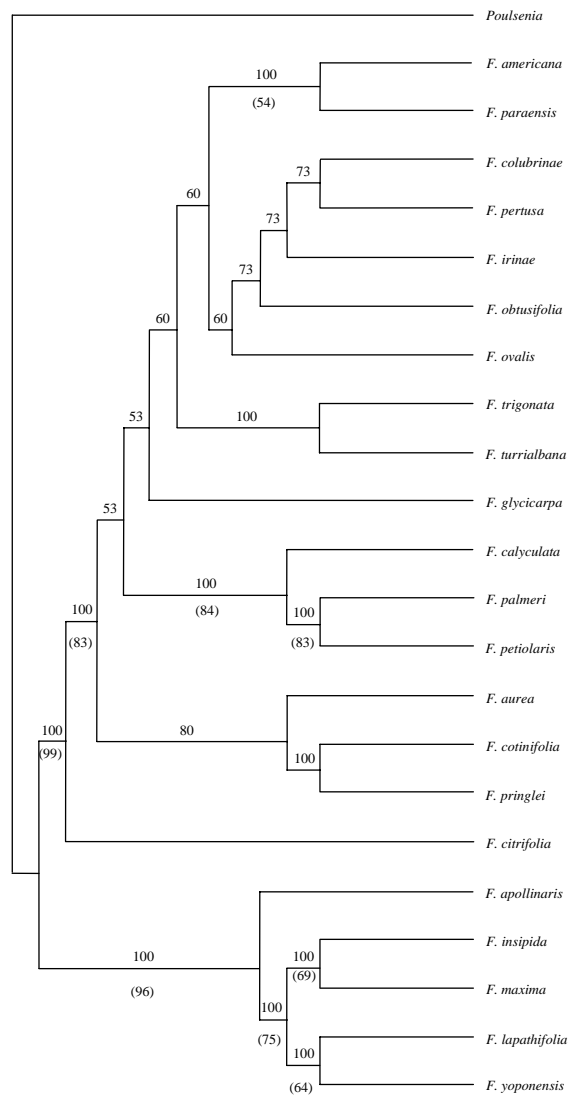


Figura 4. Consenso por mayoría de 15 árboles más parsimoniosos, a partir de cpDNA y AFLP. Los valores de bootstrap se muestran entre paréntesis.

DISCUSIÓN

Reconstrucción filogenética a partir de cpDNA

A pesar de la gran diferenciación morfológica y ecológica que presentan las especies de *Ficus*, no logramos encontrar una región de DNA que presentara suficiente variación nucleotídica para resolver satisfactoriamente las relaciones filogenéticas existentes entre las especies incluidas en este estudio. En particular, la región de trn de cloroplasto no fue útil para reconstruir las relaciones filogenéticas de las especies de *Ficus* presentes en México. Hasta la fecha, no se ha encontrado una región del DNA que permita inferir las

relaciones filogenéticas en plantas como ocurre con animales donde el DNA mitocondrial presenta una tasa evolutiva adecuada para realizar estudios a nivel intragenérico (Provan, Powell y Hollingswoth, 2001).

Reconstrucción a partir de datos de AFLP

La baja tasa evolutiva de las secuencias de DNA utilizadas en este estudio nos llevaron a utilizar un marcador como los AFLPs que permiten una rápida obtención de marcas polimórficas distribuidas a lo largo del genoma de las especies estudiadas sin necesidad de conocer previamente a este genoma (Després *et al.*, 2003). Al trabajar con todo el genoma se tiene el potencial de generar un árbol que muestre con mayor exactitud las relaciones entre las especies. Sin embargo, también fue baja la variabilidad que encontramos con AFLP en comparación con la detectada en otras especies de plantas que llega a ser mayor de 70% (Zhang, Comes y Kadereit, 2001; Després *et al.* 2003).

Falta de variabilidad

La falta de variabilidad a nivel intragenérico se ha reportado en especies de plantas de radiación reciente. Sin embargo, este no es el caso de *Ficus*, que ha radiado al menos hace 60 millones de años (Ronsted *et al.*, 2005). Otra posible explicación a la falta de variabilidad genética resulta de entrecruzamientos recientes entre entidades genéticas previamente bien diferenciadas. Esta situación puede explicar, en parte, la falta de variabilidad encontrada en *Ficus* porque estudios recientes (Machado *et al.* 2005) han planteado una alta probabilidad de eventos frecuentes de hibridación en este género como consecuencia de intercambio de polinizadores. El árbol generado con AFLPs propone a *F. maxima* y *F. insipida* como especies hermanas e incluso se ha propuesto la existencia de híbridos entre ellas (Ibarra-Manríquez, com.pers.)

También es importante considerar que tuvimos un error de muestreo al incluir solo especies mexicanas, esto fue porque no contábamos con un estudio preeliminar que nos permitiera saber que las especies de *Ficus* mexicanas no forman un grupo monofilético, como lo muestra el trabajo de Ronsted *et al.* (2005).

Relaciones entre especies de Ficus

Nuestros resultados, a pesar de no presentar una alta resolución, soportan la monofilia de los subgéneros *Pharmacosycea* y *Urostigma*, al igual que estudios filogenéticos previos (Ronsted *et al.*, 2005; Machado *et al.*, 2005).

Las relaciones entre las especies de *Ficus* mexicanas no se pudieron resolver completamente con los marcadores utilizados en este estudio. Sin embargo, ambos marcadores, a pesar de ser completamente diferentes, dan topologías similares en las que se forman dos clados principales que soportan la monofilia de los dos subgéneros *Pharmacosycea* y *Urostigma* y dentro de este último, otro clado con tres especies endémicas de México, *F. palmeri*, *F. petiolaris* y *F. calyculata*.

Especies endémicas en México

El endemismo de *Ficus* en México es muy importante comparado con el reportado para otros países (Adams, 1972; McKey, 1989). Nuestros resultados colocan a tres de esas especies, *F. palmeri*, *F. petiolaris* y *F. calyculata* como especies hermanas. El árbol consenso generado con secuencias de DNA incluyen en ese grupo monofilético de especies endémicas a *F. glyxicarpa*, también endémica en México.

En la hipótesis filogenética de Ronsted *et al.* (2005) construida con secuencias de ITS y ETS, *F. palmeri* y *F. petiolaris* también se proponen como especies hermanas en un clado cuyo origen fue hace 10 millones de años. Este dato nos hace pensar que probablemente una o más especies de *Ficus* llegaron a México, antes de que el continente Americano se uniera a través del canal de Panamá hace 3 millones de años, de la misma manera que en la actualidad han colonizado islas como Krakatoa (Thornton, Compton, Wilson, 1996). Posiblemente las especies colonizadoras, aisladas parcialmente, especiaron y como consecuencia generaron el alto endemismo de *Ficus* en México.

Aun son necesarios estudios que nos ayuden a comprender procesos de colonización y establecimiento del género en México, así como las relaciones entre las especies de México con especies del resto del continente Americano.

REFERENCIAS

- Adams, C.D. 1972. Flowering plants of Jamaica. University of the West Indies. The University Press, London.
- Anstett MC, Hossaert-Mckey M, Kjellberg F. 1997. Figs and fig pollinators: evolutionary conflicts in a coevolved mutualism. *Trends in Ecology and Evolution* **12**:94-99.
- Beardsley PM, Yen A, Olmstead RG. 2003. AFLP phylogeny of *Mimulus* section *Erythranthe* and the evolution of hummingbird pollination. *Evolution* **57**:1397-1410.
- Berg CC. 1989. Classification and distribution of *Ficus*. *Experientia* **45**:605-611.
- Besnard G, Pincon G, D'Hont A, Hoarau JY, Cadet F, Offmann B. 2003. Characterization of the phosphoenolpyruvate carboxylase gene family in sugarcane (*Saccharum* spp.). *Theoretical and Applied Genetics* **107**:470-478.
- Bronstein JL. 1992. Seed predators as mutualists: Ecology and evolution of the fig/pollinator interaction. En: Bernays E. (Ed.) *Insect-plant interactions*. CRC Press London. Pp 2-38.
- Denton AL, McConaughy BL, Hall BD. 1998. Usefulness of RNA Polymerase II coding sequences for estimation of green plant phylogeny. *Molecular Biology and Evolution* **15**:1082-1085.
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* **19**:11-15.
- Gaudeul, Taberlet y Till-Bottraud, 2000. Genetic diversity in an undangered alpine plant, *Eryngium alpinum* L (Apiaceae), inferred from amplified fragment length polymorphism markers. *Molecular Ecology* **9**:1625-1637.
- Gernandt DS, Liston A, Pinero D. 2001. Variation in the nrDNA ITS of *Pinus* subsection *Cembroides*: implications for molecular systematic studies of pine species complexes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **21**:449-67.
- Haine ER, Martin J, Cook JM. 2006. Deep mtDNA divergences indicate cryptic species in a fig-pollinating wasp. *Evolutionary Biology* **13**:6-83.
- Herre EA, Machado CA, Bermingham E, Nason JD, Windsor DM, McCafferty SS. 1996. Molecular phylogenies of fig and their pollinators wasp. *Journal of Biogeography* **23**:521-530.
- Herre EA. 1989. Coevolution of reproductive characteristics in 12 species of New World figs and their pollinators wasps. *Experientia* **45**:637-647.
- Hodkinson TR, Renvoize SA, Ni-Chonghaile G, Stapleton CMA, Chase MW. 2000. A comparison of ITS nuclear rDNA sequence data and AFLP markers for phylogenetic studies in *Phyllostachys* (Bambusoideae, Poaceae). *Journal of Plant Research* **113**:259-269.
- Janzen DA. 1979. How to be a fig. *Annual Review of Ecology and Systematic* **10**:13-51
- Jiang ZF, Huang DW, Zhu CD, Zhen WO. 2006. New insights into the phylogeny of fig pollinators using Bayesian analyses. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **38**:306-15.

- Jousselin E, Rasplus JY, Kjellberg F. 2003 Convergence and coevolution in a mutualism: evidence from a molecular phylogeny of *Ficus*. *Evolution; International Journal of Organic Evolution* **57**:1255-69.
- Jousselin E, Van Noort S, Rasplus JY, Greeff JM. 2006. Patterns of diversification of Afrotropical Otiteselline fig wasps: phylogenetic study reveals a double radiation across host figs and conservatism of host association. *Journal of Evolutionary Biology* **19**:253-66.
- Kerdelhue C, Le Clainche I, Rasplus JY. 1999. Molecular phylogeny of the Ceratosolen species pollinating *Ficus* of the subgenus *Sycomorus* sensu stricto: biogeographical history and origins of the species-specificity breakdown cases. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **11**:401-14.
- Koopman WJM, Zevenbergen MJ, Van-den-Berg RG. 2001. Species relationships in *Lactuca* S. L. (*Lactuceae*, *Asteraceae*) inferred from AFLP fingerprints. *American Journal of Botany* **88**:1881-1887.
- López –Vaamonde C, Rasplus JY, Weiblen GD, Cook JM. 2001. Molecular phylogenies of fig wasps: partial cocladogenesis of pollinators and parasites. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **21**:55-71.
- Machado CA, Jousselin E, Kjellberg F, Compton SG and Herre EA. 2001. Phylogenetic relationships, historical biogeography and character evolution of fig-pollinating wasps. *Proceedings Biological Sciences* **268**:685-94.
- Machado C, Robins N, Gilbert M, Herre EA. 2005. Critical review of host specificity and its coevolutionary implications in the fig/fig-wasp mutualism. *PNAS*. 102 S16558-6565.
- Molbo D, Machado CA, Herre EA, Keller L. 2004. Inbreeding and population structure in two pairs of cryptic fig wasp species. *Molecular Ecology* **13**:1613-23.
- Nei M, Li WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:S269-273.
- Provan J, Powell W, Hollingsworth PM. 2001. Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *TRENDS in ecology and evolution* **16**:142-147.
- Ronsted N, Weiblen GD., Cook JM, Salamin N, Machado CA, Savolainen V. 2005. 60 million years of co-divergence in the fig-wasp symbiosis. *Proceedings of the Royal Society B*. **272**:2593-9
- Ronsted N, Salvo G, Savolainen. Biogeographical and phylogenetic origins of African fig species *Ficus* section *Galaglychia*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. In press.
- Swofford DL. 2002. *PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony version 4*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Thornton IWB, Compton SG, Wilson C N. 1996. The role of animals in the colonization

- of the Krakatau Islands by fig trees (*Ficus* species). *Journal of Biogeography* **23**:577-592.
- Van EE, Jelinski N, Berry PE, Hipp L. 2006. Phylogeny and biogeography of *Croton alabamensis* (Euphorbiaceae), a rare shrub from Texas and Alabama, using DNA sequences and AFLP data. *Molecular Ecology* **15**:2735-2751.
- Wiebes J. T. 1979. Co-evolution of figs and their insects pollinators. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **10**:1-12.
- Weiblen G.D. 2000. Phylogenetic relationships of functionally dioecious *Ficus* (Moraceae) based on ribosomal DNA sequences and morphology. *American Journal of Botany*. **87**:1342-1357.
- Zerega NJ, Clement WL, Datwyler SL, Weiblen GD. 2005. Biogeography and divergence times in the mulberry family (Moraceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **37**:402-16.

Anexo 1. Protocolo de extracción de DNA de *Ficus*

- 1- Pesar 100 mg de material
- 2- Moler con N₂ líquido hasta obtener un polvo fino
- 3- Añadir 0.15 ml de CTAB previamente calentado a 65°C
- 4- Moler fuertemente hasta obtener una mezcla homogénea
- 5- Añadir 0.65 ml de buffer De la Porta y moler hasta obtener espuma
- 6- Agitar manualmente 2 minutos
- 7- Incubar la muestra 60 minutos a 60°C
- 8- Dejar enfriar la muestra a temperatura ambiente
- 9- Agregar 0.25 ml de acetato de potasio 3M
- 10-Agitar manualmente 2 minutos
- 11-Refrigerar 5 minutos a -20°C
- 12-Centrifugar 20 minutos a 13000 r.p.m.
- 13-Filtrar el sobrenadante a tubos nuevos
- 14-Agregar 400 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico (25-24-1)
- 15-Agitar lentamente y centrifugar 5 minutos
- 16-Al sobrenadante agregar 400 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico (25-24-1)
- 17-Agitar lentamente y centrifugar 5 minutos
- 18-Al sobrenadante agregar 400 µl de cloroformo-alcohol isoamilico (24-1)
- 19-Agitar y centrifugar nuevamente
- 20-Al sobrenadante agregar 1µl de isopropanol a -20°C
- 21-Agitar suavemente los tubos
- 22- Incubar a -20°C durante 15 minutos (se pueden quedar toda la noche)
- 23-Centrifugar 20 minutos a 20000 r.p.m. nivelando con isopropanol
- 24-Tirar el sobrenadante y dejar secar el pellet invirtiendo los tubos sobre una sanita
- 25-Agregar 600µl de TE y esperar a que el pellet se disuelva
- 26-Centrifugar 10 minutos a 14000 r.p.m.
- 27-Transferir el sobrenadante a otros tubos eppendorf
- 28-Agregar 600µl de isopropanol a -20°C y 60µl de acetato de sodio 3M

- 29-Agitar suavemente invirtiendo los tubos
- 30-Incubar a -20°C durante 10 minutos
- 31-Centrifugar durante 5 minutos a 14000 r.p.m.
- 32-Tirar el sobrenadante y dejar secar el pellet invirtiendo los tubos sobre una sanita
- 33-Enjuagar el pellet con 1 ml de etanol al 70%. Si se desprende volver a centrifugar
- 34-Decantar el etanol y dejar secar los tubos (en aire caliente 60°C por 30 min. o en la campana por 2 horas)
- 35-Resuspender el pellet en 100 µl de ddH₂O
- 36-Hacer una nueva extracción de DNA agregando 100 µl de fenol-cloroformo-isoamílico (50:49:1)
- 37-Mezclar muy bien inclinando el tubo en repetidas ocasiones
- 38-Centrifugar 5 min a 13000 rpm
- 39-Tomar la fase acuosa superior y transferir a un tubo eppendorf limpio y marcado
- 40-Repetir los pasos 36, 37, 38 y 39
- 41-Precipitar el DNA con 350 µl de acetato de amonio 10 mM y 100 ml de isopropanol
- 42-Dejar reposar 30 min a -20 °C
- 43-Centrifugar 15 min a 13000 rpm
- 44-Lavar con 500 µl de etanol al 70%
- 45-Centrifugar 3 min a 13000 rpm
- 46-Tirar sobrenadante
- 47-Resuspender el pellet en 50 µl de dH₂O

Breakdown of the one-to-one rule in Mexican fig-wasp associations inferred by molecular phylogenetic analysis

Zhi-Hui Su^{1,2,3*}, Hitoshi Iino^{1,5}, Keiko Nakamura¹, Alejandra Serrato^{4,6}, and Ken Oyama⁴

¹JT Biohistory Research Hall, 1-1 Murasaki-cho, Takatsuki, Osaka 569-1125, Japan, Email. su.zhihui@brh.co.jp;

²Department of Biological Sciences, Graduate School of Science, Osaka University, Osaka 560-0043, Japan;

³School of Life Science, Sun Yat-Sen (Zhongshan) University, Guangzhou 510275, P.R. China;

⁴Centro de Investigaciones en Ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) Campus Morelia, Antigua Carretera a Pátzcuaro No. 8701, Col. Ex-Hacienda de San José de la Huerta, C.P. 58190, Morelia, Michoacán, México;

⁵Present address: RIKEN Harima Institute, 1-1-1 Kouto, Sayo-cho, Hyogo 679-5148, Japan;

⁶Present address: Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186, Col. Vicentina, México 09340 D.F.

(Received February 20, 2007; Accepted June 17, 2007)

Abstract

The interaction between figs (*Ficus* spp., Moraceae) and fig-pollinating wasps (Chalcidoidea, Agaonidae) is one of the most species-specific cases of mutualism, and is a model system for studying coevolution and cospeciation between insects and plants. To test the specificity-breakdown hypothesis, we performed a phylogenetic analysis using mitochondrial COI gene sequences of Mexican fig-pollinating wasps collected from each fig species at various localities. Phylogenetic analysis revealed a clear division of Mexican fig pollinators into two major groups: one pollinating the *Ficus* species of subgenus *Pharmacosycea*; and the other pollinating *Ficus* subgenus *Urostigma*. In some cases, wasps pollinating the same fig species do not form clades, and in others, pollinators of different fig species have identical gene sequences. Incorporation of COI sequences retrieved from Panamanian fig-pollinating wasps also showed inconsistency between pollinator phylogeny and host fig species. These results suggest: 1) the possible breakdown of the “one-to-one rule” in Mexican fig-wasp associations; 2) the absence of phylogenetic evidence for cospeciation between the *Ficus* species and its pollinators; and 3) host switching may occur frequently among these pollinating wasps. Our findings also suggest that the *Americana*-pollinating wasps have radiated into various lineages within a short time.

Keywords: *Ficus*, fig wasp, COI, phylogenetic tree, cospeciation, coevolution

1. Introduction

The genus *Ficus* (figs: family Moraceae) is composed of about 750 species, which are widely distributed in the tropical and subtropical regions of the world (Corner, 1965; Berg, 1989). Figs play an important role in tropical rain forests because of the year-round production of fruits that are essential for the maintenance of a large number of frugivores such as birds and mammals (McKey, 1989; Lambert and Marshall, 1991), and consequently ecological networks are centralized around the fig trees. To understand and conserve the biodiversity of terrestrial ecosystems in tropical and subtropical regions, it is therefore important to

study the mechanisms maintaining the interactions and the diversification in *Ficus* and their associated animals (Janzen, 1979; Frank, 1989; Nason et al., 1998; Serrato et al., 2004).

All figs have a closed, urn-shaped inflorescence (or syconium), which is lined with unisexual florets. Figs present a unique pollinating system with fig wasps (Hymenoptera: Chalcidoidea: Agaonidae), which carry pollen grains into the syconium through the ostiole, a narrow entrance protected by bracts. In this system, fig wasps also gain benefits from figs, as they lay eggs in some of the fig ovaries, and larval development is entirely completed within the fig.

The interaction between figs and fig-pollinating wasps is probably the most species-specific case of pollination mutualism known, and is a model system for investigating coevolution and cospeciation between insects and plants

*The author to whom correspondence should be sent.

Table 1. List of the *Ficus* species from which the pollinating wasps were collected for this study.

<i>Ficus</i> species	Voucher	Sample	No.	Locality	Accession nos.
<i>F. yoponensis</i>	ASD 025	<i>Tetrapus ecuadoranus</i> M	09	Temazcal, Oaxaca	AB308322
<i>F. lapathifolia</i>	ASD 017	<i>T. sp.</i>	10	Matías Romero, Oaxaca	AB308323
	ASD 017b	<i>T. sp.</i>	29	Matías Romero, Oaxaca	AB308324
<i>F. maxima</i>	ASD 040	" <i>T. americanus</i> MA"	01a	Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Oaxaca	AB308325
	ASD 040	" <i>T. americanus</i> MA"	01b	Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Oaxaca	AB308326
<i>F. insipida</i>	GIM w/n	" <i>T. americanus</i> MB"	23	Tuxtla, Veracruz	AB308327
	ASD 028	<i>T. costaricanus</i> M	15	Valle Nacional, Oaxaca	AB308328
	GIM w/n	<i>T. costaricanus</i> M	18	Chamela, Jalisco	AB308329
	GIM w/n	<i>T. costaricanus</i> M	47a	Chamela, Jalisco	AB308330
	GIM w/n	<i>T. costaricanus</i> M	47b	Chamela, Jalisco	AB308331
	GIM w/n	<i>T. costaricanus</i> M	50	Chamela, Jalisco	AB308332
<i>F. microcarpa</i>	GIM w/n	<i>T. costaricanus</i> M	51	Chamela, Jalisco	AB308333
	ASD 015	<i>T. costaricanus</i> M	44	Matías Romero, Oaxaca	AB308334
	ASD et al. 056	<i>T. costaricanus</i> M	57 (D)	La Cañada, Cuernavaca, Morelos	AB308329
	ASD 048	<i>Eupristina</i> sp.	06	Cd. Valles, San Luis Potosí	AB308335
	ASD 023b	" <i>Pegoscopus</i> sp. 1"	21	Cuatro Caminos, Oaxaca	AB308336
<i>F. pertusa</i>	ASD 023	" <i>P. sp. 2</i> "	35	Arroyo Azul, Oaxaca	AB308337
	ASD 032	" <i>P. silvestrii</i> "	31a	Tuxtla, Veracruz	AB308340
	ASD 032	" <i>P. silvestrii</i> "	31c	Tuxtla, Veracruz	AB308341
	ASD 009	" <i>P. sp. 3</i> "	41	Tehuantepec, Oaxaca	AB308338
<i>F. americana</i>	ASD 033	" <i>P. sp. 4</i> "	40	Tuxtla, Veracruz	AB308339
	ASD 048	" <i>P. standleyi</i> "	07	Tamul, San Luis Potosí	AB308342
	ASD 010	" <i>P. sp. 5</i> "	30	Tehuantepec, Oaxaca	AB308338
<i>F. cotinifolia</i>	ASD 041	" <i>P. kraussii</i> "	36	Gómez Farías, Tamaulipas	AB308343
	ASD 052	" <i>P. kraussii</i> "	37	Tamul, San Luis Potosí	AB308344
	ASD 011	" <i>P. kraussii</i> "	45	San Pedro Huamelula, Oaxaca	AB308345
	GIM w/n	" <i>P. sp. 6</i> "	20	Chamela, Jalisco	AB308346
<i>F. glyxicarpa</i>	ASD et al. 055	<i>P. sp. 7</i>	58 (E)	La Cañada Cuernavaca, Morelos	AB308347
<i>F. aurea</i>	ASD 024	" <i>P. jimenezi</i> "	12	Temazcal, Oaxaca	AB308348
	ASD 029	" <i>P. sp. 8</i> "	13	Tuxtla, Veracruz	AB308349
	ASD 030	" <i>P. sp. 8</i> "	27	Tuxtla, Veracruz	AB308350
<i>F. calyculata</i>	ASD 042	<i>P. sp. 9</i>	04	Alta Cima, Tamaulipas	AB308351
<i>F. trigonata</i>	ASD 039	<i>P. bruneri</i>	03	Valle de Tehuacán-Cuicatlán, Oaxaca	AB308352
	ASD 014	<i>P. bruneri</i>	43	San Mateo del Mar, Oaxaca	AB308353
<i>F. petiolaris</i>	ASD 012	" <i>P. sp. 10</i> "	11	San Pedro Huamelula, Oaxaca	AB308354
	ASD et al. 060	" <i>P. sp. 10</i> "	56 (C1)	Las Estacas, Morelos	AB308355
	ASD et al. 060	" <i>P. sp. 10</i> "	56 (C2)	Las Estacas, Morelos	AB308356
	GIM w/n	" <i>P. sp. 11</i> "	32	San Carlos, Sonora	AB308357
<i>F. palmeri</i>	GIM w/n	<i>P. sp. 12</i>	14	Las Palmas, Baja California Sur	AB308358
	GIM w/n	<i>P. sp. 12</i>	16	Las Palmas, Baja California Sur	AB308359

(Wiebes, 1979; Herre, 1996; Machado et al., 2001; Weiblen, 2000). It was long thought that each fig species had only one associated species of fig wasp as its pollinator, and each wasp is only associated with one species of fig, generally called the "one-to-one" rule. Molecular phylogenetic studies generally support the hypothesis of coevolution between recognized genera of pollinating wasps and their respective sections of *Ficus* (Herre et al., 1996; Kerdelhue et al., 1999; Machado et al., 2001; Weiblen, 2001; 2004; Weiblen and Bush, 2002; Jouselin et al., 2003; Rønsted et al., 2005). However, these phylogenetic studies have focused mainly on testing the hypothesis of fig-wasp coevolution at a higher taxonomic level. Although these data suggest cospeciation between figs and pollinating wasps, the degree and extent of the "one-to-one" rule and the specifics of cospeciation between figs and wasps are not well understood. For example, Kerdelhue et al. (1997) reported three different *Ceratosolen* species as pollinators of *Ficus sur* (subgenus *Sycomorus*), and Molbo et al. (2003) suggested the existence of cryptic

species of pollinating wasps in some Panamanian fig species. A critical review of host specificity and its coevolutionary implications in fig/fig-wasp mutualism has been published recently (Machado et al., 2005). It is thus important to conduct detailed population genetic analyses by sampling throughout the distributional range for each fig species to test the degree of species-specificity in the fig-wasp mutualism. In this study, we used mitochondrial COI sequences to analyze the phylogenetic relationships of fig-pollinating wasps collected from the fig of subgenera *Pharmacosycea* and *Urostigma* growing at localities in Mexico.

2. Materials and Methods

Sampling

We collected fig-pollinating wasps from syconia of 36 fig trees distributed in 21 localities in Mexico; 4 fig species

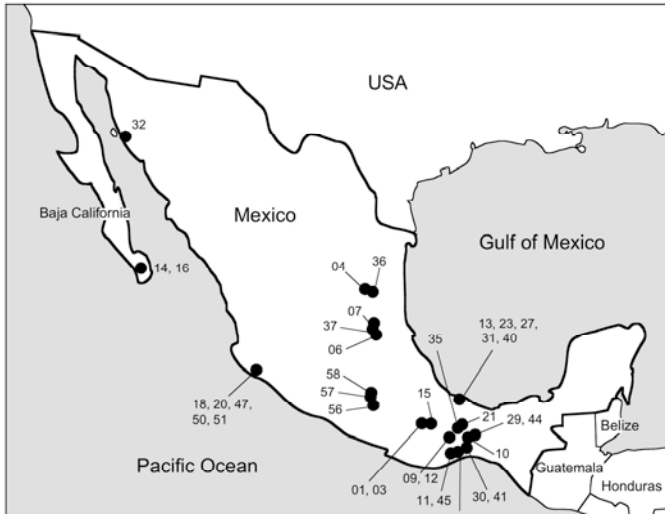


Figure 1. Locality map of samples used in this study. The sample numbers correspond to that in Table 1 and phylogenetic tree.

belonged to the subgenus *Pharmacosycea* (Miquel) section *Pharmacosycea* Miquel and 10 fig species to the subgenus *Urostigma* Gasparriani section *Americana* Miquel (Table 1 and Fig. 1). Vouchers are deposited at the herbarium of the Universidad Nacional Autónoma de México (MEXU-UNAM). The fig-pollinating wasps were preserved in 99% ethanol until used for DNA extraction.

DNA extraction, PCR and sequencing

Total DNA was extracted from a single individual wasps using a QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Germany). DNA for each specimen was finally dissolved in 200 μ l elution buffer, and 4 μ l of the DNA solution was used as a template for amplification of DNA fragments by polymerase chain reaction (PCR). A fragment of the mitochondrial DNA containing an approximately 1000 bp 5'-region of the cytochrome oxidase subunit I (COI) gene was amplified using a primer pair

(forward:

COII-1-Ple 5'-TTAATTGGAAATGATCAAATTTATAAT-3';

reverse:

COI-2M 5'-ACATAATGAAAATGTGCTACTACATAATA-3')

designed for this study. The thermal conditions for amplification were as follows: denaturation at 94°C (5 min); followed by 35 cycles of denaturation at 94°C (30 sec), annealing at 50°C (30 sec), extension at 72°C (2 min); and final extension at 7°C (7 min). Direct sequencing was performed on an automated ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Inc., HITACHI).

Phylogenetic analysis

Sequence alignments were carried out using the multiple-alignment program CLUSTAL W, version 1.81 (Thompson et al., 1994) with default settings (Gap Opening Penalty = 10.0; Gap Extension Penalty = 0.20; Delay Divergent Sequences = 30%; DNA Transitions Weight = 0.50). A NEXUS format file of the complete alignment was used for neighbor-joining (NJ) (Saitou and Nei, 1987), maximum likelihood (ML) (Felsenstein, 1981) and maximum parsimony (MP) analyses with PAUP 4.0b (Swofford, 2001). Construction of the NJ trees was performed using evolutionary distance computed by Kimura's two-parameter method (Kimura, 1980). For ML analysis, heuristic searches were carried out using the HKY85 model of the nucleotide substitutions with tree-bisection-reconnection (TBR) branch-swapping under the default settings. The starting tree was obtained via stepwise addition, and the starting branch lengths were obtained using the Rogers-Swofford approximation method (Rogers and Swofford, 1998). Trees with approximate likelihoods 5% or further from the target score were rejected without additional iteration. A heuristic search was also performed for MP analysis under the default settings. All trees were evaluated using the bootstrap test (Felsenstein, 1985) based on 1000 replicates for the NJ and MP, and 100 replicates for the ML analysis.

3. Results

Properties of the COI gene sequence

An 868 bp sequence of the COI gene was included in the analyses after excluding the end positions of the sequences due to the fact that they were missing from some samples. A total of 287 (33%) characters were variable (217 at the codon third position, 54 at the first position and 16 at the second position) among the sequences of all the pollinating wasps determined, and 207 (23.8%) characters were variable (176 at the codon third position, 25 at the first position and 6 at the second position) within the genus *Pegoscapus*. The base substitutions, which mostly occurred at silent sites (the third position of codon and a part of the first position), were randomly distributed throughout the sequences. The maximum sequence difference of the COI gene region examined for all the fig pollinating wasps was 0.181 (Kimura's two-parameter distance), which was the difference between the "*Tetrapus americanus*" (01a: one specimen of the pollinators of *Ficus maxima*) and the *Pegoscapus* sp. (04a: the pollinator of *F. calyculata*), while that within the genus *Pegoscapus* was 0.107 between the "*Pegoscapus* sp. 1" (21a: a specimen of the pollinator from *F. microcarpa*) and the "*Pegoscapus* sp. 10" (11a: a specimen of the pollinator from *F. petiolaris*).

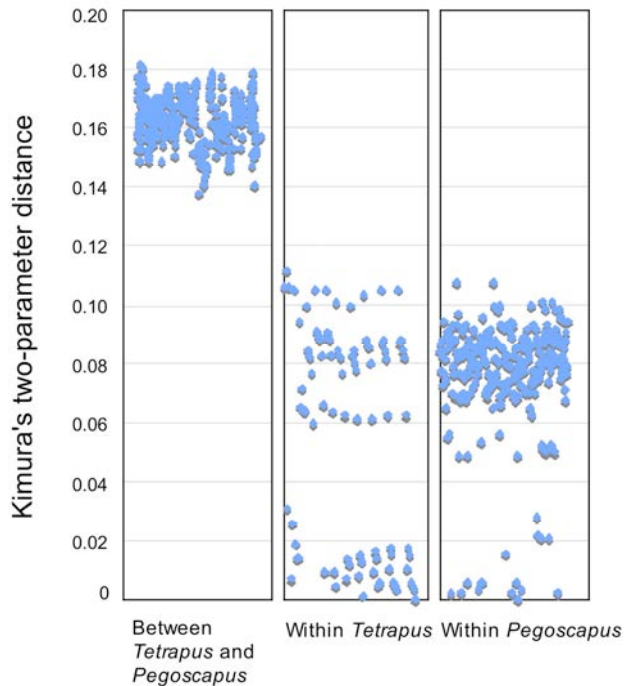


Figure 2. Kimura's two-parameter distance between both genera (*Tetrapus* and *Pegoscapus*) and within the genera.

Also, the sequence differences between the two pollinator genera, *Tetrapus* and *Pegoscapus*, were approximately 0.16 (Fig. 2). The evolutionary distances at three positions (1st, 2nd and 3rd), which were corrected for multiple substitutions with Kimura's two parameter method (Kimura, 1980), exhibited an almost linear correlation with the observed p (base substitution percentage) (Fig. 3), suggesting that the base substitution of the COI gene was not saturated within the range of the sequence differences detected in Mexican fig-pollinating wasps. The COI gene sequences were AT-rich (ranged from 72.22% to 75.79%) and their G + C contents were nearly constant.

Phylogeny of Mexican fig-pollinating wasps

We first used the mitochondrial COI gene sequence to analyze the phylogenetic relationships of fig wasps, including both the pollinating and non-pollinating wasps, collected from all the fig species (Table 1). The phylogenetic tree of the COI gene, which was constructed by the NJ method and rooted with *Apis mellifera*, *Drosophila melanogaster* and *Bombyx mori*, showed that the fig-pollinating wasps were clearly grouped into a single clade with a robust support of 99% bootstrap (BS) value, and all the non-pollinating wasps were their sister groups (data not shown). Then, we used non-pollinating wasps as the outgroup to analyze the phylogenetic relationships of

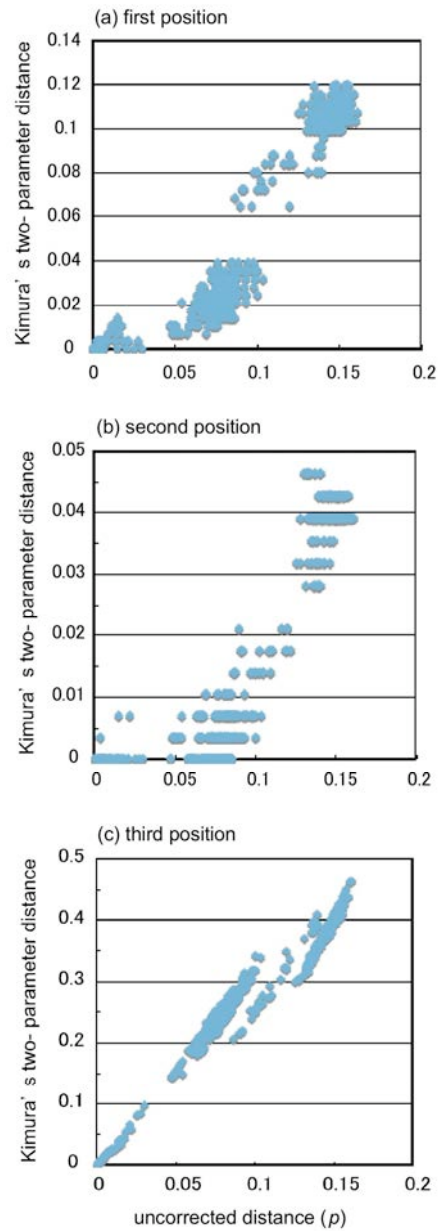


Figure 3. Saturation plots of each codon position calculated through pairwise sequence comparisons.

pollinating wasps. The three methods (NJ, ML and MP) gave essentially the same tree topology and the NJ tree was shown (Fig. 4). Although *T. americanus* (23a) appears to have different grouping between NJ and ML/MP trees, neither one has robust support with the bootstrap value (Fig. 4). The results showed *Tetrapus* (100% BS) as sister to a clade with *Pegoscapus* (87–100% BS) and *Eupristina*. The phylogenetic relationships within genera of pollinators, on the other hand, were largely inconsistent with their host

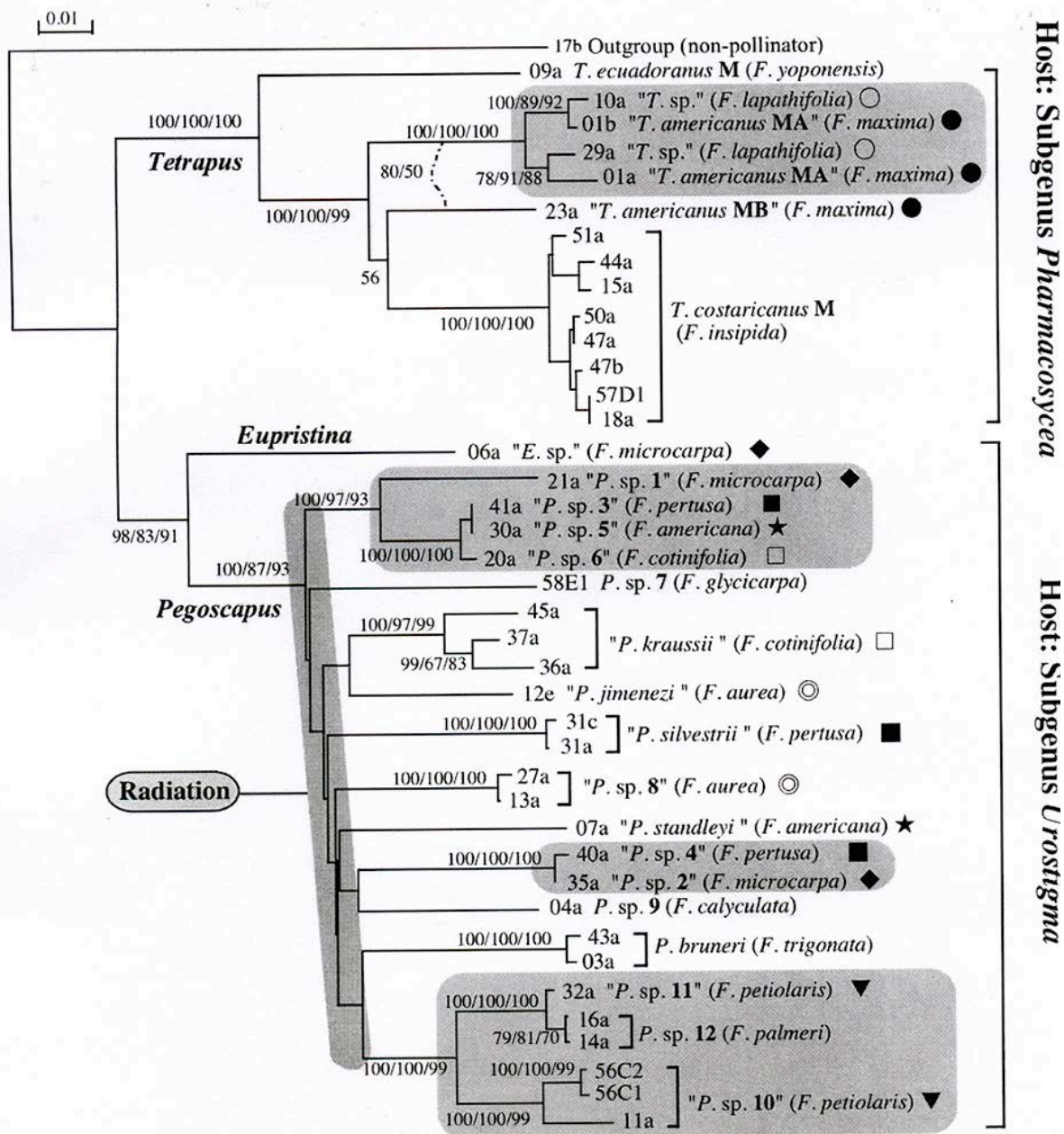


Figure 4. NJ-phylogenetic tree of Mexican fig-pollinating wasps based on the mitochondrial COI gene sequence. The numbers in each branching point indicate the bootstrap percentage of NJ/ML/MP (those less than 50% are not shown). The dotted line shows the grouping of *Tetrapus americanus* (23a) on ML and MP trees. The tree was outgroup-rooted using the COI gene sequences of a non-pollinating wasp. Locality numbers shown in the end of branches correspond to those in Table 1 and Fig. 1. The symbols after the *Ficus* species name indicate the pollinating wasps, which are from same *Ficus* species, but separated into different lineages. The clusters including the pollinating wasps from different *Ficus* species are shaded.

fig species. For example, the pollinating wasps from *F. maxima* in the *Tetrapus* clade were separated into at least two lineages (23a and 01a/01b), and one (01a/01b) of them was related to the pollinators (10a/29a) of *F. lapathifolia* so closely as to be indistinguishable on the tree (Fig. 4). In the *Pegoscapus* clade the pollinating wasps appear to have radiated into 11 lineages within a short time. Most fig species-associated wasps did not cluster into a single clade

per each host species. *Ficus pertusa* associated wasps were clearly divided into three different lineages, and two of these were each clustered with the associated wasps of *F. microcarpa* and *F. americana/F. cotinifolia*, and were hardly distinguishable from each other by sequence differences. Two independent lineages of the associated wasps were also found in *F. cotinifolia*, *F. americana*, *F. aurea* and *F. petiolaris*, respectively. In some lineages,

meanwhile, the wasp species from more than two *Ficus* species were closely clustered together with only small sequence differences; one striking case is the wasp collected in *F. petiolaris* in Sonora and the wasp collected in *F. palmeri* in Baja California, both fig species are endemics and geographically separated by the Gulf of California (Fig. 4). It is also interesting to note some lineages of wasp pollinators are differentiated within the same host fig species but in different geographic regions; such is the case of *T. costaricanus* and *F. insipida* (Fig. 4).

Relationship between the fig-pollinating wasps of the Mexico and Panama

In order to discover the biogeographical differences between the fig-pollinating wasps of Mexico and Panama, we constructed a phylogenetic tree (Fig. 5) by adding COI gene sequences (from GenBank; www.ncbi.nlm.nih.gov) of Panamanian fig-pollinating wasps (Molbo et al., 2003; Machado et al., 2005) to our data set. A 358 bp sequence overlapping the two data sets was used in this analysis. The result showed essentially the same topology as when using only Mexican samples; the two pollinator wasp genera, *Tetrapus* and *Pegoscapus* were monophyletic (Fig. 5). Within the *Tetrapus* clade, the pollinator wasps of *F. insipida* from Panama formed an independent lineage, while the Mexican wasps presented another lineage and clearly clustered with other wasp species associated with the *F. maxima*, *F. glabrata* and *F. lapathifolia* (Fig. 5). Several lineages of the pollinating wasp species of *F. maxima* were scattered throughout the *Tetrapus* clade, and only one (*T. americanus* PA) of these was independent, implying that these lineages of the *F. maxima*-associated wasps do not have a common origin. *Ficus yoponensis* associated wasps from Mexico and Panama constituted a single lineage. In the *Pegoscapus* clade, sixteen lineages of Panamanian fig-wasps were recognized in this analysis, but almost all these lineages were phylogenetically independent from Mexican wasps except for one lineage, *P. silvestrii* which showed a close relationship to the pollinator of Mexican *F. pertusa* (Fig. 5). The divergence within the two pollinator species, *T. ecuadoranus* and *P. silvestrii* probably indicates the biogeographical differentiation of the fig wasps between Mexico and Panama.

4. Discussion

Radiation of phylogenies of Pegoscapus wasps

Eleven lineages were recognized in the phylogenetic tree of *Pegoscapus* wasps. However, it is noteworthy that the branching order of these phylogenetic lineages could not be determined with certainty, because branches of only very short lengths with low bootstrap values support these

basal nodes (Fig. 4). Two possible explanations for the ambiguous branching order of these lineages may be considered: the first is that the nucleotide substitutions of the COI gene are saturated; and the second is that these *Pegoscapus* lineages radiated within a short time. The first possibility, saturation of nucleotide substitutions, does not seem to be the case because the actual percentage of substitutions is linearly correlated to the evolutionary distance that is corrected for multiple substitutions by Kimura's method (1980) (Fig. 3). Consequently, a reasonable interpretation for tree topology would be that a radiation of the *Pegoscapus* occurred. Judging from the result shown in Fig. 5, the divergence of Panamanian lineages of *Pegoscapus* would also be included in such a radiation event. The divergence time between two *Pegoscapus* species (*P. hoffmeyerii* and *P. gemellus*) was estimated to be 21 (± 6.5) million years ago (Mya) (Machado et al., 2001) originally based on fossil data of *Pegoscapus* wasps. On the other hand, the divergence of the two *Pegoscapus* species corresponds to the radiation of this genus (Fig. 5). Thus, the occurrence of the radiation of *Pegoscapus* wasps can be presumed to be about 21 Mya. According to this divergence time and the average sequence difference (8.15%) between those lineages, the evolutionary rate of the COI gene sequence of *Pegoscapus* wasps was calculated to be 0.39% per million years (Myr). The calculated rate is close to that estimated from ground beetle COI sequences, about 0.01 *D* unit (Kimura's two parameter distance) of the COI sequence corresponding to about 2.7 Myr (about 0.37% per million years) (Su et al., 2004), although the COI gene seems to evolve fast in some other insects (Brower, 1994; Farrell, 2001; Caccone and Sbordoni, 2001).

More than one lineage is detected in the pollinating wasps from the same Ficus species

The phylogenetic relationships within each genus (*Tetrapus* and *Pegoscapus*) of pollinators are largely disordered. Wasps pollinating the same fig species do not cluster together into a single group in most of the cases; rather, they are separated into more than one different lineage on the COI tree, grouping with pollinators from other fig species, while some pollinators from different fig species are clustered into the same lineage, some of which show identical sequences (Figs. 4 and 5). These results are inconsistent with the hypotheses of the "one-to-one" rule and cospeciation of fig-wasp mutualism, and strongly suggest that more than one associated wasp species per fig species. For example, the pollinating wasps (*T. americanus*) of *F. maxima* of subgenus *Pharmacosycea* are separated into at least three clearly different lineages: the "*T. americanus* MA" from Mexico; the "*T. americanus* PA" from Panama; and the "*T. americanus* MB/PB" from both regions (Fig. 5).

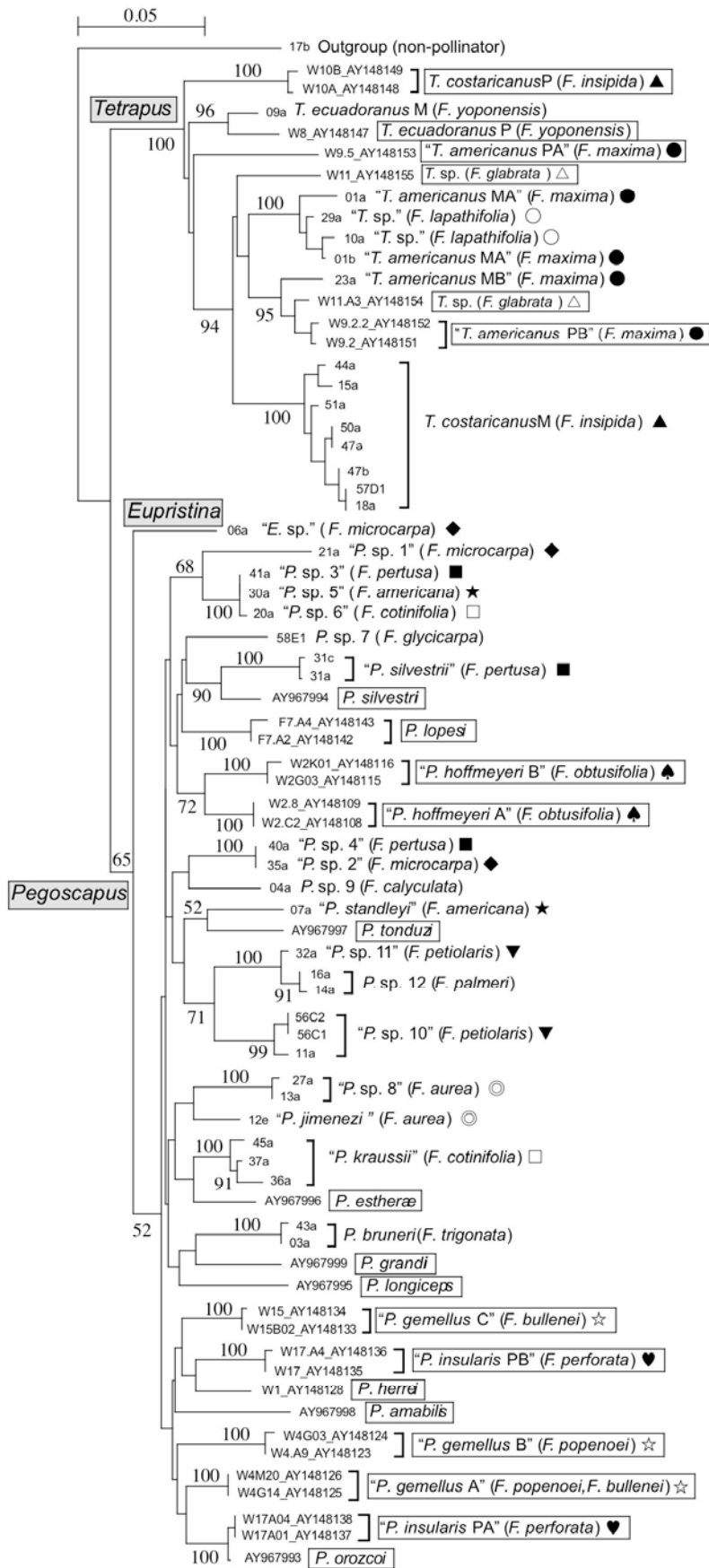


Figure 5. Phylogenetic tree (NJ) of the fig-pollinating wasps from Mexican and Panamanian *Ficus* species based on the mitochondrial COI gene sequence. For the descriptions, see Fig. 4. The sequence data of Panamanian samples (boxed) are from GenBank database, and their original sample numbers and sequence accession numbers are shown before sample name.

These results suggest that *F. maxima* may have three associated wasp species including one that was previously reported as a cryptic species of *T. americanus* in Panama (Molbo et al., 2003). Also, the pollinating wasps of *F. insipida* split into two completely independent lineages, one in Mexico and another in Panama, suggesting the existence of two wasp species pollinating *F. insipida* in different geographic regions. Similarly, multiple species of pollinating wasps were also observed in the genus *Pegoscapus*, such as the pollinators of *F. pertusa*, *F. cotinifolia*, *F. americana* and *F. petiolaris*. Combined with the previous study (Molbo et al., 2003), molecular findings strongly suggest that multiple species of pollinator wasps per fig species are likely to exist extensively in the two *Ficus* sections, *Pharmacosycea* and *Americana*.

No molecular evidence is found in this study to support the cospeciation hypothesis of fig-wasp mutualism

Morphological studies and the “one-to-one” species-specificity of the interaction between figs and pollinating wasps have led to the hypothesis of coevolution and cospeciation between them (Ramirez, 1974; Wiebes, 1979; Berg, 1989). Recent molecular phylogenetic analyses have also provided some evidence to support the presence of cladogenesis and coadaptation between recognized genera of pollinating wasps and their respective fig sections (Herre et al., 1996; Machado et al., 2001; Weiblen, 2001; 2004; Jouselin et al., 2003). However, these results do not mean that strict cospeciation between figs and pollinators has taken place at any taxonomic level or within any groups. Machado et al. (2005) suggested that a strict-sense cospeciation of one-to-one species specific figs and wasps should not be the default paradigm for formulating hypotheses to explain the diversification mode for fig and wasp species. Our results have revealed numerous cases of more than one wasp species pollinating one fig species in the two fig sections, *Pharmacosycea* (subgenus *Pharmacosycea*) and *Americana* (subgenus *Urostigma*), and, in addition, such species are not clustered into a single group, but fall into independent lineages (Figs. 4 and 5). In other words, the wasp lineages (or species) pollinating the same fig species do not always have a common origin. This suggests that host-switching has taken place in these species, and may be accompanied by a morphologically convergent (parallel) evolution to adapt to the same host fig species. An interesting example of host shift is that some *Pegoscapus* wasps are likely to pollinate *F. microcarpa* which is an introduced species in the Americas, and normally pollinated by *Eupristina* species. A pseudogene or mitochondrial introgression may be considered as explanations for these results, but a supplementary analysis of nuclear 28S rRNA gene sequence of these wasps showed essentially the same tree topology as the mitochondrial COI gene (data not shown). The coincidence of the results

between nuclear and mitochondrial genes strongly precludes the possibility of a pseudogene or mitochondrial introgression. The findings obtained in this study, therefore, do not provide total support for the cospeciation hypothesis, and indicate that host-switching occur in the figs/fig-wasp mutualism. Of course, there may be many cases where coevolutionary relationships exist in fig-wasp associations, but the occurrence of cospeciation between figs and their pollinators would depend on the strictness of the “one-to-one” relationships of the fig-wasp mutualism, which might differ between fig/wasp groups. Given such a viewpoint, there may be another implication in our results, that is, the “one-to-one” relationships between these monoecious figs and their pollinators, *Pharmacosycea-Tetrapus* and *Americana-Pegoscapus* are rather loose. This contrasts with the extremely strict one-to-one relationships, we found between Japanese dioecious figs and their pollinating wasps (Azuma and Su, data not published).

Fig species usually have wide distribution ranges, and some species are geographically separated by big barriers such as seas and mountains. Results using only one or a few specimens as the representatives of a wasp species to analyze its phylogenetic position may cause researchers to draw misleading conclusions regarding the speciation mode. This is because the possibility exists that more than one species (or phylogenetically independent lineages) of wasps pollinate one host fig species in different distribution ranges as found in the present study. In addition, fig wasps may have undergone morphologically convergent evolution under the pressure of natural selection in their adaptation to fig species. Fig taxonomy is another problem in that apparently identical or closely similar *Ficus* species growing in two different regions may be considered to be the same species and given a single name, when in fact they are distinct. For example, the Mexican *F. insipida* and the Panamanian *F. insipida* may be (phylogenetically) different species. Therefore, extensive phylogenetic studies of figs and fig-pollinating wasps are needed to test the “one-to-one” rule and the cospeciation of fig-wasp mutualism including the whole geographic distribution range of the species.

Acknowledgements

The nucleotide sequence data reported in this paper have appeared in the DDBJ, EMBL and GenBank nucleotide sequence databases with the accession nos. AB308322-AB308359 as shown in Table 1. We are grateful to Nina Rønsted for useful suggestions on the manuscript. We also thank M.A. Pérez-Pérez and A. Cabrera-Méndez for helping us to collect fig wasps, and G. Ibarra-Manríquez for assistance in fig identification. Thanks are also due to Hideko Kanda for her skillful technical assistance. This study was supported in part by DGAPA-PAPIIT, UNAM

IN205294, and Grant-in-Aid for Scientific Research from Japan Society of the Promotion of Science.

REFERENCES

- Berg, C.C. 1989. Classification and distribution of *Ficus*. *Experientia* **45**: 605–611.
- Brower, A.V. 1994. Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **91**: 6491–6495.
- Caccone, A. and Sbordoni, V. 2001. Molecular biogeography of cave life: a study using mitochondrial DNA from bathysciine beetles. *Evolution* **55**: 122–130.
- Corner, E.J.H. 1965. Check-list of *Ficus* in Asia and Australasia with keys to identification. *The Gardens' Bulletin Singapore* **21**: 1–186.
- Corner, E.J.H. 1985. *Ficus* (Moraceae) and Hymenoptera (Chalcidoidea): figs and their pollinators. *Biological Journal of the Linnean Society* **25**: 187–195.
- Farrell, B.D. 2001. Evolutionary assembly of the milkweed fauna: cytochrome oxidase I and the age of *Tetraopes* beetles. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **18**: 467–478.
- Felsenstein, J. 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* **17**: 368–376.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. *Evolution* **39**: 783–791.
- Frank, S.A. 1989. Ecological and evolutionary dynamics of fig communities. *Experientia* **45**: 674–680.
- Herre, E.A., Machado, C.A., Bermingham, E., Nason, J.D., Windsor, D.M., McCafferty, S.S., VanHouten, W., and Bachmann, K. 1996. Molecular phylogenies of figs and their pollinator wasps. *Journal of Biogeography* **23**: 521–530.
- Janzen, D.H. 1979. How to be a fig. *Annual Review of Ecology and Systematics* **10**: 13–51.
- Jousselin, E., Rasplus, J.-Y., and Kjellberg, F. 2003. Convergence and coevolution in a mutualism: evidence from a molecular phylogeny of *Ficus*. *Evolution* **57**: 1255–1269.
- Kerdelhue, C., Clainche, I.L., and Rasplus, J.-Y. 1999. Molecular phylogeny of the *Ceratosolen* species pollinating *Ficus* of the subgenus *Sycomorus sensu stricto*: biogeographical history and origins of the species-specificity breakdown cases. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **11**: 401–414.
- Kerdelhue, C., Hochberg, M.E., and Rasplus, J.-Y. 1997. Active pollination of *Ficus sur* by two sympatric fig wasp species in West Africa. *Biotropica* **29**: 69–75.
- Kimura, M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**: 111–120.
- Lambert, F.R. and Marshall, A.G. 1991. Keystone characteristics of bird-dispersed *Ficus* in a Malaysian lowland rain forest. *Journal of Ecology* **79**: 793–809.
- Machado, C.A., Jousselin, E., Kjellberg, F., Compton, S.G., and Herre, E.A. 2001. Phylogenetic relationships, historical biogeography and character evolution of fig-pollinating wasps. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* **268**: 685–694.
- Machado, C.A., Robbins, N., Gilbert, M.T.P., and Herre, E.A. 2005. Critical review of host specificity and its coevolutionary implications in the fig/fig-wasp mutualism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **102** (Supplement 1): 6558–6565.
- McKey, D. 1989. Population biology of figs: applications for conservation. *Experientia* **45**: 661–673.
- Molbo, D., Machado, C.A., Sevenster, J.G., Keller, L., and Herre, E.A. 2003. Cryptic species of fig-pollinating wasps: Implications for the evolution of the fig-wasp mutualism, sex allocation, and precision of adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* **100**: 5867–5872.
- Nason, J.D., Herre, E.A., and Hamrick, J.L. 1998. The breeding structure of a tropical keystone plant resource. *Nature* **391**: 685–687.
- Ramirez, W. 1974. Coevolution of *Ficus* and Agaonidae. *Annals of the Missouri Botanical Gardens* **64**: 296–310.
- Rogers, J.S. and Swofford, D.L. 1998. A fast method for approximating maximum likelihoods of phylogenetic trees from nucleotide sequences. *Systematic Biology* **47**: 77–89.
- Rønsted, N., Weiblen, G. D. Cook, J. M., Salamin, N., Machado, C.A., and Savolainen, V. 2005. 60 million years of co-divergence in the fig-wasp symbiosis. *Proceedings of the Royal Society of London B* **272**: 2593–2599.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406–425.
- Serrato, A., Ibarra-Manríquez, G., and Oyama K. 2004. Biogeography and conservation of the genus *Ficus* (Moraceae) in México. *Journal of Biogeography* **31**: 475–485.
- Su, Z.-H., Imura, Y., Okamoto, M., and Osawa, S. 2004. Pattern of phylogenetic diversification of the cychrini ground beetles in the world as deduced mainly from sequence comparisons of the mitochondrial genes. *Gene* **326**: 43–57.
- Swofford, D.L. 2001. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods), Version 4.0 beta version, Sinauer, Sunderland, MA.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.I. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**: 4673–4680.
- Weiblen, G.D. 2000. Phylogenetic relationships of functionally dioecious *Ficus* (Moraceae) based on ribosomal DNA sequences and morphology. *American Journal of Botany* **87**: 1342–1357.
- Weiblen, G.D. and Bush, G.L. 2002. Speciation in fig pollinators and parasited. *Molecular Ecology* **11**: 1573–1578.
- Wiebes, J.T. 1979. Co-evolution of figs and their insect pollinators. *Annual Review of Ecology and Systematics* **10**: 1–12.

CONSIDERACIONES FINALES Y PERSPECTIVAS

De los capítulos anteriores surgen una serie de consideraciones que se resumen a continuación. Además se proponen algunos estudios necesarios para continuar con el entendimiento ecológico y evolutivo de *Ficus* y sus polinizadores, las avispas Agaonidae, en México.

Consideraciones finales

La interacción entre *Ficus* y las avispas Agaonidae es antigua, específica, diversa y a diferencia de la mayoría de las interacciones en las que se ha propuesto una historia coevolutiva es un mutualismo. Es el ejemplo mas extremo de especificidad y diversidad entre planta-animal que se ha estudiado abordando diferentes procesos y patrones biológicos.

Esta tesis, forma parte del esfuerzo que se está realizando a nivel mundial para integrar aspectos ecológicos y evolutivos de este sistema, con el objetivo de conocer y comprender los factores que han llevado a que esta interacción sea tan diversa y específica.

Nuestros resultados, al igual que otros estudios recientes, no apoyan la idea que perduró durante más de tres décadas de que esta interacción sigue un modelo estricto de coevolución en el que solo existe una especie de avispa por una especie de *Ficus*. A pesar de esto, la construcción filogenética de las Agaonidae representa la taxonomía de *Ficus* a nivel de subgénero, lo cual es una evidencia de la existencia de una historia evolutiva compartida, por lo menos en niveles taxonómicos superiores.

A pesar de haber encontrado a mas de una especie de Agaonidae por una especie de *Ficus*. Al tener la oportunidad de incluir secuencias de avispas de Panamá, encontramos variación en los niveles de especificidad entre las polinizadoras incluidas en este estudio, las avispas que polinizan a *F. yoponensis* de México y Panamá, forman un solo linaje a pesar de estar separadas por mas de 2000

Km. En contraste, las polinizadoras de *F. pertusa* de México que se encuentran en clados completamente separados.

En general, era muy poco probable que se mantuviera una especificidad 1:1 en esta interacción. *Ficus* es un género muy diverso, con una distribución muy amplia, con variación en los patrones de distribución de cada especie, con especies que se encuentran en diferentes tipos de clima, con variación en formas de vida, sistemas reproductivos, densidades, fenologías florares y con un ciclo de vida muchas veces mas largo que el de las avispas. A pesar de esto, hay una gran especificidad en este mutualismo, por ejemplo, el acoplamiento de ciclos de vida de cada pareja planta-polinizador o la modificación de la fenología floral que presentan algunas especies para el mantenimiento de poblaciones de avispas en climas adversos.

Aunque no siguen el modelo de coevolución estricta, este es un mutualismo ecológica y evolutivamente muy importante que ha generado gran diversidad y mantiene una amplia red de interacciones, unas más específicas que otras, con muchos otros organismos.

Estos resultados son importantes en el estudio de interacciones porque aún en sistemas que se han propuesto como modelo de coevolución estricta, se encuentra que las interacciones son dinámicas y flexibles ecológica y evolutivamente y surge la necesidad de estudiarlas con modelos que reflejen de una manera menos simplista la historia natural de los sistemas biológicos.

Perspectivas

El saber que en México se distribuyen 22 especies de *Ficus* (21 descritas) con una gran variación morfológica y ecológica brinda la oportunidad de estudiar al género y a la interacción desde diversas perspectivas para lograr una integración de los factores ecológicos y evolutivos que mantienen y generan a este sistema. Por ejemplo, evaluar la especificidad de polinización y coespeciación en alguna de las especies de *Ficus* de amplia distribución, con muestreos en diferentes tipos de clima, que representan diferentes presiones selectivas, incluyendo áreas separadas por

diferentes tipos de barreras geográficas. También, se puede estudiar la dinámica de poblaciones de avispas que polinizan a *Ficus* que se encuentran en muy bajas densidades, como *F. lapathifolia* que es una especie endémica para la cual solo encontramos 27 registros en los herbarios, para entender el mantenimiento de poblaciones de avispas cuando es difícil encontrar un sícono en donde ovipositar.

En los síconos de *F. microcarpa*, que es una especie introducida, encontramos avispas que polinizan a las especies de *Ficus* de América. En este caso, es importante evaluar si penetraron en el sícono por no haber encontrado al higo con el que mantienen la interacción o bien se lleva a cabo polinización y oviposición de manera exitosa y así documentar un evento de colonización por parte de las avispas.

La presencia de especies endémicas en México, brinda la posibilidad de estudiar en algunas de ellas la interacción a un nivel microevolutivo. Se puede reconstruir la historia evolutiva de los linajes génicos del higo y su polinizador por medio de estudios filogeográficos. En particular este tipo de estudio resulta interesante para *F. petiolaris* que se distribuye principalmente en la costa del pacífico, desde Sonora hasta Chiapas y las polinizadoras incluidas en este estudio (de Oaxaca, Morelos y Sonora) se agrupan en un solo clado.

También hacen falta estudios para entender el proceso de colonización y establecimiento del género a México y poder explicar de una manera robusta el alto endemismo de *Ficus*.